II

(Μη νομοθετικές πράξεις)

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2019/1390 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 31ης Ιουλίου 2019

για την τροποποίηση, με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο, του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ [1], και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 2,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής [2] περιλαμβάνει τις μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας των χημικών προϊόντων, που πρέπει να εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.

(2) Ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ) αναπτύσσει εναρμονισμένες και διεθνώς συμφωνημένες κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμές χημικών προϊόντων για κανονιστικούς σκοπούς. Ο ΟΟΣΑ εκδίδει τακτικά νέες και αναθεωρημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στις οποίες λαμβάνεται υπόψη η επιστημονική πρόοδος στον τομέα αυτόν.

(3) Προκειμένου να ληφθεί υπόψη η τεχνική πρόοδος και, όπου αυτό είναι εφικτό, να μειωθεί ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς, σύμφωνα με το άρθρο 13 παράγραφος 2 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, μετά την έκδοση σχετικών κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών του ΟΟΣΑ θα πρέπει να θεσπιστούν δύο νέες μέθοδοι δοκιμών για την αξιολόγηση της οικοτοξικότητας και εννέα νέες μέθοδοι δοκιμών για τον προσδιορισμό της τοξικότητας για την υγεία του ανθρώπου και θα πρέπει να επικαιροποιηθούν επτά μέθοδοι δοκιμών. Οι έντεκα από αυτές τις μεθόδους δοκιμών αφορούν δοκιμές in vitro για τον ερεθισμό/τη διάβρωση του δέρματος και των οφθαλμών, την ευαισθητοποίηση του δέρματος, τη γονιδιοτοξικότητα και την ενδοκρινική δράση. Έχει ζητηθεί η γνώμη των ενδιαφερομένων φορέων σχετικά με την προτεινόμενη τροποποίηση.

[1] ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.

[2] Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής, της 30ής Μαΐου 2008, για τον καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) (ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1).

(4) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 θα πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.

(5) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που συστάθηκε δυνάμει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 31 Ιουλίου 2019.

Για την Επιτροπή
Ο Πρόεδρος
Jean-Claude JUNCKER

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται ως εξής:

1) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.4 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.4 **ΟΞΕΙΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 404 του ΟΟΣΑ (2015). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο των χημικών ουσιών επανεξετάζονται περιοδικά για να εξασφαλίζεται ότι αντανακλούν τις βέλτιστες διαθέσιμες επιστημονικές γνώσεις. Στο πλαίσιο της αναθεώρησης της TG 404 του ΟΟΣΑ, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις πιθανές βελτιώσεις σε σχέση με την καλή μεταχείριση των ζώων και την αξιολόγηση του συνόλου των υφιστάμενων πληροφοριών σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία προκειμένου να αποφεύγονται οι περιττές δοκιμές στα πειραματόζωα. Η επικαιροποιημένη έκδοση της TG 404 του ΟΟΣΑ (η οποία εγκρίθηκε το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) περιλαμβάνει αναφορά στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος» (1), προτείνοντας μια προσέγγιση κατά ενότητες για τις δοκιμές ερεθισμού και διάβρωσης του δέρματος. Στην IATA περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και i) παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) προτείνεται μια προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (1). Επιπλέον, όπου απαιτείται, στη συγκεκριμένη κατευθυντήρια γραμμή συνιστάται η διαδοχική αντί της ταυτόχρονης εφαρμογής των τριών επιθεμάτων στο ζώο κατά την αρχική δοκιμή *in vivo*.

2. Στο προσάρτημα της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται ορισμοί του ερεθισμού και της διάβρωσης του δέρματος.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

3. Για λόγους προαγωγής της αξιόπιστης επιστημονικής έρευνας και της καλής μεταχείρισης των ζώων, δεν θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές *in vivo* προτού αξιολογηθεί το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων που σχετίζονται με το δυναμικό δερματικής διαβρωτικότητας/ερεθισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο πλαίσιο ανάλυσης βάρους της απόδειξης, όπως παρουσιάζεται στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση για τη διάβρωση και τον ερεθισμό του δέρματος», δηλ. στα τρία μέρη της εν λόγω καθοδήγησης και στις αντίστοιχες ενότητες (1). Εν συντομία, στο μέρος 1 το θέμα των υπαρχόντων δεδομένων θίγεται σε επτά ενότητες που καλύπτουν τα δεδομένα για τον άνθρωπο, τα δεδομένα *in vivo*, τα δεδομένα *in vitro*, τα δεδομένα για τις φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. το pH, ιδίως την ισχυρή οξύτητα ή αλκαλικότητα) και τις μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν σε δοκιμές. Στο μέρος 2 διενεργείται ανάλυση βάρους της απόδειξης. Εάν η εν λόγω ανάλυση δεν καταλήξει σε οριστικά αποτελέσματα, πρέπει να εκτελείται το μέρος 3 με πρόσθετες δοκιμές, ξεκινώντας με τις μεθόδους *in vitro*, ενώ οι δοκιμές *in vivo* χρησιμοποιούνται ως έσχατη λύση. Ως εκ τούτου, η ανωτέρω ανάλυση αναμένεται να περιορίσει την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών *in vivo* για διαβρωτικότητα/ικανότητα ερεθισμού του δέρματος από υπό δοκιμή ουσίες για τις οποίες υπάρχουν ήδη επαρκή αποδεικτικά στοιχεία, προερχόμενα από άλλες μελέτες, όσον αφορά τις συγκεκριμένες δύο παραμέτρους.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ IN VIVO

4. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται εφάπαξ στο δέρμα πειραματόζωου· μη εκτεθειμένες στη χημική ουσία περιοχές του δέρματος του πειραματόζωου χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, η έκταση του ερεθισμού / της διάβρωσης παρατηρείται, βαθμολογείται και περιγράφεται λεπτομερώς με σκοπό την πλήρη αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί αν οι παρατηρούμενες επιδράσεις είναι αναστρέψιμες ή μη.

5. Τα ζώα που εμφανίζουν διαρκή σημεία έντονης αγωνίας και/ή πόνου σε οποιοδήποτε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία, οπότε η υπό δοκιμή χημική ουσία αξιολογείται ανάλογα. Τα κριτήρια για τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανώδυνη θανάτωση ετοιμοθάνατων ή βαρέως πασχόντων ζώων αποτελούν το αντικείμενο χωριστού εγγράφου καθοδήγησης (2).

ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ IN VIVO

Επιλογή ζωικού είδους

6. Το προτιμώμενο πειραματόζωο είναι το αλφικό κουνέλι και χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα κουνέλια. Η χρήση άλλων ειδών ζώων θα πρέπει να αιτιολογείται.

Προετοιμασία των ζώων

7. Ένα 24ωρο περίπου πριν από τη δοκιμή, πρέπει να αφαιρείται με κουρά το τρίχωμα από τη ραχιαία επιφάνεια του κορμού των ζώων. Η κουρά πρέπει να εκτελείται με προσοχή για να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ζώα με υγιές, ανέπαφο δέρμα.

8. Μερικές φυλές κουνελιών έχουν νησίδες πυκνού τριχώματος, που είναι πιο ανεπτυγμένες ορισμένες εποχές του έτους. Οι υπό δοκιμή ουσίες δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται σε αυτές τις επιφάνειες πυκνού τριχώματος.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης

9. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται χωριστά. Για τα κουνέλια, η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 20 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

10. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε μια μικρή επιφάνεια του δέρματος (περίπου 6 cm^2) και να καλύπτεται με ένα επίθεμα γάζας, το οποίο συγκρατείται στη θέση του με μη ερεθιστική ταινία. Σε περίπτωση όπου η απευθείας εφαρμογή δεν είναι εφικτή (π.χ. υγρά ή ορισμένες αλοιφές), θα πρέπει να τοποθετείται πρώτα η υπό δοκιμή χημική ουσία στη γάζα και κατόπιν το σύνολο στο δέρμα. Το επίθεμα θα πρέπει να διατηρείται χαλαρά σε επαφή με το δέρμα με τη βοήθεια κατάλληλου ημιπερατού επιδέσμου σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία τοποθετείται στο επίθεμα, το επίθεμα θα πρέπει να στερεώνεται στο δέρμα κατά τρόπον ώστε να εξασφαλίζεται καλή επαφή και ομοιόμορφη κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο δέρμα. Το ζώο θα πρέπει να μην μπορεί να φθάσει το επίθεμα, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος να καταπιεί/εισπνεύσει την υπό δοκιμή χημική ουσία.

11. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως χωρίς αραίωση. Όταν ελέγχονται στερεές χημικές ουσίες (που μπορούν να λειοτριβούνται, εάν κρίνεται αναγκαίο), θα πρέπει να υγραίνονται με την ελάχιστη ποσότητα νερού (ή, εάν είναι απαραίτητο, άλλου κατάλληλου φορέα) που εξασφαλίζει καλή επαφή με το δέρμα. Εάν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός του νερού, η τυχόν επίδρασή του στον ερεθισμό του δέρματος από την υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να είναι αμελητέα ή μηδενική.

12. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, που συνήθως διαρκεί 4 ώρες, τα υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να απομακρύνονται, εφόσον αυτό είναι πρακτικά εφικτό, με νερό ή κατάλληλο διαλύτη, χωρίς να αλλοιώνεται η υφιστάμενη απόκριση ούτε η ακεραιότητα της επιδερμίδας.

Επίπεδα δόσεων

13. Στο σημείο δοκιμής εφαρμόζονται εφάπαξ 0,5 ml υγρού ή 0,5 g στερεού ή αλοιφής.

Αρχική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού/διάβρωσης του δέρματος *in vivo* σε ένα ζώο)

14. Όταν μια υπό δοκιμή χημική ουσία έχει κριθεί ότι είναι διαβρωτική, ερεθιστική ή μη ταξινομημένη βάσει αναλύσεων βάρους της απόδειξης ή βάσει προηγούμενων δοκιμών *in vitro*, συνήθως δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών *in vivo*. Εντούτοις, σε περιπτώσεις που θεωρείται δικαιολογημένη η απόκτηση συμπληρωματικών δεδομένων, διεξάγεται αρχικά η δοκιμή *in vivo* με χρήση ενός ζώου και κατ' εφαρμογή της ακόλουθης προσέγγισης. Στο ζώο εφαρμόζονται διαδοχικά τρία επιθέματα κατ' ανώτατο όριο. Το πρώτο αφαιρείται μετά από τρία λεπτά. Σε περίπτωση που δεν παρατηρηθεί σοβαρή αντίδραση του δέρματος, εφαρμόζεται δεύτερο επίθεμα σε διαφορετικό σημείο, το οποίο αφαιρείται μετά από μία ώρα. Εάν οι παρατηρήσεις στο στάδιο αυτό υποδεικνύουν ότι η έκθεση του ζώου μπορεί να παραταθεί ανώδυνα μέχρι τις τέσσερις ώρες, εφαρμόζεται τρίτο επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά από τέσσερις ώρες, και διαβαθμίζεται η απόκριση.

15. Εάν μετά οποιοδήποτε από τα τρία διαδοχικά στάδια έκθεσης παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση, η δοκιμή τερματίζεται αμέσως. Εάν δεν παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση μετά την αφαίρεση του τελευταίου επιθέματος, το ζώο παραμένει υπό παρατήρηση για 14 ημέρες, εκτός εάν εκδηλωθεί διάβρωση νωρίτερα.

16. Στις περιπτώσεις όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει διάβρωση, αλλά ενδέχεται να είναι ερεθιστική, θα πρέπει να εφαρμόζεται ένα μόνο επίθεμα σε ένα ζώο για τέσσερις ώρες,

Επιβεβαιωτική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού του δέρματος *in vivo* σε επιπλέον ζώα)

17. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση κατά την αρχική δοκιμή, η ερεθιστική ή αρνητική απόκριση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με χρήση έως δύο επιπλέον ζώων, στο καθένα από τα οποία εφαρμόζεται ένα επίθεμα για περίοδο έκθεσης 4 ωρών. Εάν κατά την αρχική δοκιμή έχει παρατηρηθεί ερεθιστική επίδραση, η επιβεβαιωτική δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με διαδοχική ή ταυτόχρονη έκθεση των δύο επιπλέον ζώων. Στην εξαιρετική περίπτωση όπου δεν έχει διεξαχθεί η αρχική δοκιμή, είναι δυνατόν να υποβληθούν σε αγωγή δύο ή τρία ζώα με ένα μόνον επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά 4 ώρες. Όταν χρησιμοποιούνται δύο ζώα και εμφανίζουν και τα δύο την ίδια απόκριση, δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές. Στην αντίθετη περίπτωση, υποβάλλεται στη δοκιμή και το τρίτο ζώο. Για την αξιολόγηση αμφίβολων αποκρίσεων ενδέχεται να απαιτηθούν περισσότερα ζώα.

Περίοδος παρατήρησης

18. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί πλήρως το κατά πόσον οι παρατηρούμενες επιδράσεις είναι αναστρέψιμες. Παρόλα αυτά, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται αμέσως μόλις το ζώο εμφανίσει διαρκή σημεία ισχυρού πόνου ή αγωνίας. Για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες, τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για χρονικό διάστημα έως 14 ημερών μετά την αφαίρεση των επιθεμάτων. Εάν διαπιστωθεί ότι είναι αναστρέψιμες πριν παρέλθουν 14 ημέρες, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται εκείνη τη στιγμή.

Κλινικές παρατηρήσεις και διαβάθμιση των δερματικών αντιδράσεων

19. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται για σημεία ερυθήματος και οιδήματος και οι αποκρίσεις να βαθμολογούνται στα 60 λεπτά και, κατόπιν, στις 24, τις 48 και τις 72 ώρες από την αφαίρεση του επιθέματος. Κατά την αρχική δοκιμή σε ένα ζώο, εξετάζεται επίσης το σημείο εφαρμογής του επιθέματος αμέσως μετά την αφαίρεσή του. Οι δερματικές αντιδράσεις διαβαθμίζονται και καταγράφονται σύμφωνα με το σύστημα του πίνακα παρακάτω. Εάν σε 72 ώρες παρατηρηθεί βλάβη του δέρματος που δεν είναι δυνατόν να χαρακτηριστεί ερεθισμός ή διάβρωση, μπορεί να χρειάζεται να συνεχιστεί η παρατήρηση μέχρι τη 14η ημέρα για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες. Εκτός από την παρατήρηση του ερεθισμού, θα πρέπει να περιγράφονται πλήρως και να καταγράφονται όλες οι τοπικές τοξικές επιδράσεις, λόγου χάριν απολίπανση του δέρματος, και οι τυχόν συστηματικές δυσμενείς επιδράσεις (π.χ. στα κλινικά συμπτώματα τοξικότητας και στο βάρος του σώματος). Για τη διασαφήνιση αμφίβολων αποκρίσεων, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ιστοπαθολογικής εξέτασης.

20. Η διαβάθμιση των δερματικών αποκρίσεων είναι κατ' ανάγκην υποκειμενική. Για να διευκολυνθεί η εναρμονισμένη διαβάθμιση των δερματικών αποκρίσεων και να βοηθηθούν, αφενός, τα εργαστήρια δοκιμών και, αφετέρου, το προσωπικό που εκτελεί και ερμηνεύει τις παρατηρήσεις, απαιτείται κατάλληλη εκπαίδευση του εν λόγω προσωπικού στο χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμολόγησης (βλ. πίνακα παρακάτω). Χρήσιμος είναι επίσης ένας εικονογραφημένος οδηγός διαβάθμισης του ερεθισμού και άλλων βλαβών του δέρματος (3).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

21. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα της τελικής έκθεσης δοκιμής και να καλύπτουν όλα τα στοιχεία που απαριθμούνται στην παράγραφο 24.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

22. Η βαθμολογία του δερματικού ερεθισμού θα πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με το είδος και τη σοβαρότητα των βλαβών, καθώς και με το κατά πόσον αυτές είναι αναστρέψιμες. Οι επιμέρους βαθμοί δεν αντιπροσωπεύουν ένα απόλυτο πρότυπο για τις ερεθιστικές ιδιότητες ενός υλικού, δεδομένου ότι αξιολογούνται και άλλες επιδράσεις των υπό δοκιμή ουσιών. Αντίθετα, θα πρέπει να θεωρούνται τιμές αναφοράς, οι οποίες πρέπει να συνεκτιμώνται με όλες τις υπόλοιπες παρατηρήσεις της μελέτης.

23. Κατά την αξιολόγηση των ερεθιστικών αποκρίσεων, θα πρέπει να εξετάζεται αν οι βλάβες του δέρματος είναι αναστρέψιμες. Εφόσον αποκρίσεις όπως αλωπεκία (περιορισμένη επιφάνεια), υπερκεράτωση, υπερπλασία και απολέπιση επιμένουν μέχρι το τέλος της 14ήμερης περιόδου παρατήρησης, η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να θεωρείται ερεθιστική.

Έκθεση δοκιμής

24. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Αιτιολόγηση της διεξαγωγής δοκιμής in vivo:

— ανάλυση βάρους της απόδειξης των δεδομένων δοκιμών που προϋπήρχαν, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών,

— περιγραφή των σχετικών δεδομένων που έχουν προκύψει από προηγούμενες δοκιμές,

— δεδομένα που προέκυψαν σε κάθε στάδιο της στρατηγικής δοκιμών,

— περιγραφή των δοκιμών *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν, με λεπτομέρειες για τις διαδικασίες και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις ουσίες ελέγχου/αναφοράς,

— ανάλυση βάρους της απόδειξης προκειμένου να διεξαχθεί μελέτη *in vivo*.

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— πολυσυστατική ουσία, μείγμα και ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά (UVCB): περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Φορέας:

— ταυτοποίηση, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Πειραματόζωο/-α:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε, αιτιολόγηση της χρήσης άλλου ζώου/-ων αντί αλφικών κουνελιών,

— αριθμός ζώων κάθε φύλου,

— βάρος/-η κάθε ζώου στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής,

— ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης,

— προέλευση του ζώου/-ων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— τεχνική προπαρασκευής της περιοχής εφαρμογής της ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με το επιδεσμικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και την τεχνική της εφαρμογής του,

— λεπτομέρειες για την παρασκευή, την εφαρμογή και την απομάκρυνση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Αποτελέσματα:

— καταχώριση σε πίνακα των βαθμών ερεθιστικής/διαβρωτικής απόκρισης για κάθε ζώο σε κάθε χρονική στιγμή μέτρησης,

— περιγραφή όλων των βλαβών που παρατηρήθηκαν,

— αναλυτική περιγραφή του είδους και της έκτασης του ερεθισμού ή της διάβρωσης που παρατηρήθηκε, καθώς και τυχόν ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— περιγραφή άλλων δυσμενών τοπικών (π.χ. απολίπανση του δέρματος) επιδράσεων εκτός από δερματικό ερεθισμό ή διάβρωση και τυχόν συστηματικών επιδράσεων.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

Πινακας

Διαβαθμιση των Δερματικων Αντιδρασεων

Ερύθημα και σχηματισμός εσχάρας

Κανένα ερύθημα	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα βοείου κρέατος) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4
Μέγιστος δυνατός βαθμός	4

Οίδημα

Κανένα οίδημα	0
Πολύ ελαφρό οίδημα (μόλις αντιληπτό)	1
Ελαφρό οίδημα (περιγεγραμμένα χείλη με σαφή διόγκωση)	2
Μέτριο οίδημα (διόγκωση 1 mm περίπου)	3
Σοβαρό οίδημα (διόγκωση άνω του 1 mm εκτεινόμενη πέραν της επιφάνειας έκθεσης)	4
Μέγιστος δυνατός βαθμός	4

Για τη διασαφήνιση αμφίβολων αποκρίσεων είναι δυνατόν να γίνει ιστοπαθολογική εξέταση.

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Δερματικός ερεθισμός: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών του δέρματος μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών.

Δερματική διάβρωση: η πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης του δέρματος· συγκεκριμένα, εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση αμφίβολων βλαβών, θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.»

2) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.17 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.17 ***IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ HPRT ΚΑΙ XPRT**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 476 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και της καλής μεταχείρισης των ζώων. Η παρούσα αναθεωρημένη έκδοση της μεθόδου δοκιμών Β.17 αντικατοπτρίζει σχεδόν τριάντα χρόνια εμπειρίας με τη συγκεκριμένη δοκιμή και, επίσης, είναι το αποτέλεσμα της ανάπτυξης μιας χωριστής μεθόδου δοκιμών που αφορά τις *in vitro* δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών με χρήση του γονιδίου της θυμιδινοκινάσης. Η μέθοδος δοκιμών Β.17 αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ για τη γενετική τοξικολογία (1).

2. Ο σκοπός της *in vitro* δοκιμής γονιδιακής μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών είναι η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές αυτές μετρούν τις εξελικτικές μεταλλάξεις σε γονίδια αναφοράς, συγκεκριμένα στο ενδογενές γονίδιο της φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης υποξανθίνης–γουανίνης (Hprt σε κύτταρα τρωκτικών, HPRT σε ανθρώπινα κύτταρα· αποκαλούμενα συλλογικά «γονίδιο Hprt» και «δοκιμή HPRT» στην παρούσα μέθοδο δοκιμών), και στο διαγονίδιο φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης ξανθίνης–γουανίνης (gpt) (αποκαλούμενη «δοκιμή XPRT»). Οι δοκιμές μετάλλαξης HPRT και XPRT ανιχνεύουν διαφορετικά φάσματα γενετικών συμβάντων. Πέραν των συμβάντων μετάλλαξης που ανιχνεύονται από τη δοκιμή HPRT (π.χ. υποκαταστάσεις ζευγών βάσεων, μετατοπίσεις αναγνωστικού πλαισίου, μικρές απαλείψεις και ενθέσεις), το γεγονός ότι το διαγονίδιο gpt βρίσκεται σε αυτοσώματα μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση μεταλλάξεων που οφείλονται σε μεγάλες απαλείψεις και πιθανώς μιτωτικό ανασυνδυασμό που δεν ανιχνεύονται από τη δοκιμή HPRT, διότι το γονίδιο Hprt βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Η χρήση της δοκιμής XPRT για κανονιστικούς σκοπούς είναι επί του παρόντος λιγότερο διαδεδομένη σε σύγκριση με τη δοκιμή HPRT.

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Στις δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτείται εν γένει η χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμείται απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν *in vivo*.

5. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα, δηλ. πιθανή αλληλεπίδραση με το σύστημα δοκιμής, που δεν προκύπτουν από την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και του γενετικού υλικού του κυττάρου· στις συνθήκες αυτές περιλαμβάνονται οι μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (8) (9) (10), η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (11) (12), ή τα υπέρμετρα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (13). Η κυτταροτοξικότητα που υπερβαίνει τα συνιστώμενα μέγιστα επίπεδα κυτταροτοξικότητας, όπως ορίζονται στην παράγραφο 19, θεωρείται υπέρμετρη για τη δοκιμή HPRT.

6. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο ρυθμιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Οι εκτιμήσεις αυτές δεν είναι αναγκαίες όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου Hprt στη δοκιμή HPRT ή δραστηριότητας του ενζύμου xprt στη δοκιμή XPRT παρουσιάζουν αντοχή στα κυτταροστατικά αποτελέσματα της 6-θειογουανίνης (TG), ενός αναλόγου πουρίνης. Τα κύτταρα με δραστηριότητα Hprt (στη δοκιμή HPRT) ή gpt (στη δοκιμή XPRT) είναι ευαίσθητα στην TG, η οποία αναστέλλει τον κυτταρικό μεταβολισμό και σταματά την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία TG, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν το ένζυμο Hprt (στη δοκιμή HPRT) ή gpt (στη δοκιμή XPRT), δεν μπορούν.

8. Τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστρωματικής καλλιέργειας κύτταρα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης (βλ. παράγραφο 14), για κατάλληλο χρονικό διάστημα (3-6 ώρες) και κατόπιν ανακαλλιεργούνται για να προσδιοριστεί η κυτταροτοξικότητα και για να επιτραπεί η φαινοτυπική έκφραση πριν από την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης (14) (15) (16) (17). Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται βάσει της σχετικής επιβίωσης (RS), δηλαδή της απόδοσης της κλωνοποίησης μετρούμενης αμέσως μετά την αγωγή και διορθωμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά την αγωγή σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (παράγραφος 18 και προσάρτημα 2). Οι καλλιέργειες υπό αγωγή διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο για ικανό χρονικό διάστημα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε κυτταρικό τύπο, ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των προκληθεισών μεταλλάξεων (συνήθως 7-9 ημέρες τουλάχιστον). Μετά τη φαινοτυπική έκφραση προσδιορίζεται η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης με ανακαλλιέργεια γνωστού αριθμού κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής για την ανίχνευση αποικιών μεταλλαγμένων κυττάρων και σε θρεπτικό μέσο χωρίς παράγοντα επιλογής για τον προσδιορισμό της απόδοσης της κλωνοποίησης (βιωσιμότητα). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επώασης, μετρούνται οι αποικίες. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών, διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προπαρασκευή

Κύτταρα

9. Οι κυτταρικοί τύποι που χρησιμοποιούνται για τις δοκιμές HPRT και XPRT θα πρέπει να έχουν αποδεδειγμένη ευαισθησία σε χημικά μεταλλαξιγόνα, υψηλή απόδοση κλωνοποίησης, σταθερό καρυότυπο και σταθερή συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης. Μεταξύ των κυττάρων που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για τη δοκιμή HPRT περιλαμβάνονται οι κυτταρικές σειρές κινεζικού κρικητού CHO, CHL και V79, τα λεμφωματικά κύτταρα ποντικού L5178Y και τα ανθρώπινα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα TK6 (18) (19). Για τη δοκιμή XPRT χρησιμοποιούνται κύτταρα AS52 προερχόμενα από CHO που περιέχουν το διαγονίδιο gpt (και με απαλειφθέν το γονίδιο Hprt) (20) (21)· η δοκιμή HPRT δεν μπορεί να διεξαχθεί σε κύτταρα AS52, διότι το γονίδιο hprt έχει απαλειφθεί. Η χρήση άλλων κυτταρικών σειρών θα πρέπει να αιτιολογείται και να επικυρώνεται.

10. Θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά στις κυτταρικές σειρές η σταθερότητα του χαρακτηριστικού χρωμοσωμικού αριθμού και η απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα (22) (23) και τα κύτταρα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν έχουν μολυνθεί ή εάν έχει μεταβληθεί ο χαρακτηριστικός χρωμοσωμικός αριθμός. Η φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζεται και να είναι συνεπής με τα δημοσιευμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Η συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης στο κύριο απόθεμα κυττάρων θα πρέπει επίσης να ελέγχεται, και το απόθεμα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε περίπτωση που η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης δεν είναι αποδεκτή.

11. Πριν χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή αυτή, οι καλλιέργειες ενδέχεται να χρειάζεται να καθαριστούν από προϋπάρχοντα μεταλλαγμένα κύτταρα, π.χ. μέσω καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο HAT για τη δοκιμή HPRT και MPA για τη δοκιμή XPRT (5) (24) (βλ. προσάρτημα 1). Τα καθαρισμένα κύτταρα μπορούν να κρυοσυντηρούνται και, στη συνέχεια, να αποψύχονται για χρήση ως καλλιέργειες εργασίας. Η πρόσφατα αποψυχθείσα καλλιέργεια εργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή αφού επιτευχθούν οι φυσιολογικοί χρόνοι διπλασιασμού. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής XPRT, για τη συνήθη καλλιέργεια κυττάρων AS52 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνθήκες που διασφαλίζουν τη διατήρηση του διαγονιδίου gpt (20).

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

12. Για τη διατήρηση των καλλιεργειών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό μέσο και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2, θερμοκρασία επώασης 37 °C). Οι κυτταρικές καλλιέργειες θα πρέπει πάντοτε να διατηρούνται υπό συνθήκες που διασφαλίζουν ότι αναπτύσσονται κατά τη λογαριθμική φάση. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να επιλέγεται το θρεπτικό μέσο και οι συνθήκες καλλιέργειας έτσι ώστε να διασφαλίζεται η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου έκφρασης και η βέλτιστη απόδοση κλωνοποίησης μεταλλαγμένων και μη κυττάρων.

Ετοιμασία των καλλιεργειών

13. Οι κυτταρικές σειρές πολλαπλασιάζονται από αποθεματικές καλλιέργειες εμβολιαζόμενες σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστιβάδας κύτταρα να εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκθετικά κατά τις περιόδους αγωγής και έκφρασης (π.χ. θα πρέπει να αποφεύγεται η συρροή κυττάρων που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες).

Μεταβολική ενεργοποίηση

14. Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα με ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εξωγενή συστήματα μεταβολισμού. Το πιο κοινό σύστημα, που συνιστάται ως προεπιλογή, εκτός αντίθετης αιτιολόγησης, είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών (κατά κανόνα επιμύων) και το οποίο έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτάλης και β-ναφθοφλαβόνης (29) (30) (31) (32). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (33) και έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασών μεικτής λειτουργίας (29) (31). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 2 % (κ.ό.), αλλά οι οποίες επιτρέπεται να αυξηθούν σε 10 % (κ.ό.) στο τελικό θρεπτικό μέσο της δοκιμής. Η επιλογή του τύπου και της συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης ή μεταβολικού επαγωγέα μπορεί να επηρεαστεί από την κατηγορία των υπό δοκιμή ουσιών (34) (35) (36).

Προπαρασκευή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

15. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να παρασκευάζονται σε κατάλληλους διαλύτες και να αραιώνονται, εφόσον απαιτείται, πριν από την αγωγή των κυττάρων (βλ. παράγραφο 16). Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιτρέπεται να προστίθενται κατευθείαν στο σύστημα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την αγωγή του συστήματος δοκιμής. Οι αέριες ή πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυποποιημένων πρωτοκόλλων, π.χ. αγωγή σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (37) (38). Τα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ετοιμάζονται ακριβώς πριν από την αγωγή, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας αποδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξη.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Διαλύτες

16. Θα πρέπει να επιλέγεται διαλύτης που να προσφέρει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς τη διεξαγωγή της δοκιμής, π.χ. μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλοιώνοντας την υπό δοκιμή χημική ουσία, αντιδρώντας με τα δοχεία καλλιέργειας ή αποδυναμώνοντας το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης (ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας). Καθιερωμένοι διαλύτες είναι, για παράδειγμα, το νερό και το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει γενικά το 1 % κ.ό., προκειμένου για οργανικούς διαλύτες, και το 10 % κ.ό. στην περίπτωση των υδατικών διαλυτών (αλατούχο διάλυμα ή νερό). Εάν χρησιμοποιούνται άλλοι πλην των καθιερωμένων διαλυτών (π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη), η χρήση τους θα πρέπει να τεκμηριώνεται με στοιχεία που αποδεικνύουν τη συμβατότητά τους με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και με το σύστημα δοκιμών, καθώς και την απουσία γενετικής τοξικότητας στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Εάν δεν υπάρχουν αυτά τα στοιχεία, είναι σημαντικό να προστίθενται μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή (βλ. προσάρτημα 1) για να αποδεικνύεται ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν επάγει επιβλαβείς ή μεταλλαξιγόνες επιδράσεις.

Μέτρηση της κυτταροτοξικότητας και επιλογή συγκεντρώσεων έκθεσης

17. Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα (βλ. παράγραφο 20), καθίζηση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 21) ή έντονες μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (βλ. παράγραφο 5). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί έντονη μεταβολή του pH του θρεπτικού μέσου κατά την προσθήκη της, το pH μπορεί να ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής, με σκοπό να αποφεύγονται τα τεχνητά θετικά αποτελέσματα και να διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

18. Η επιλογή συγκεντρώσεων βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και άλλες παραμέτρους (βλ. παραγράφους 20-22). Μολονότι η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας σε αρχική προκαταρκτική δοκιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ακριβέστερο καθορισμό των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στο κύριο πείραμα, δεν είναι υποχρεωτική η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής. Ακόμη και εάν διενεργηθεί αρχική αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας, εξακολουθεί να απαιτείται η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας για κάθε καλλιέργεια στο κύριο πείραμα. Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με χρήση της RS, δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, βάσει του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων, σε σύγκριση με την προσαρμοσμένη απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %) (βλ. προσάρτημα 2 για τον τύπο).

19. Θα πρέπει να αξιολογούνται τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις δοκιμής (χωρίς τον διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες) που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (ενδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα, αριθμός κυττάρων κ.λπ.). Αν και συνιστάται η χρήση διπλών καλλιεργειών, μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής είτε πολλαπλές πανομοιότυπες καλλιέργειες (επαναλήψεις) είτε μοναδικές καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις ανεξάρτητες πανομοιότυπες καλλιέργειες σε δεδομένη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρονται χωριστά αλλά μπορούν να συνενώνονται για την ανάλυση δεδομένων (17). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα, κατάλληλες είναι συνήθως οι συγκεντρώσεις που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή ίσο με 2 ή 3 περίπου. Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν ένα πεδίο τιμών που ξεκινά από τη συγκέντρωση που προκαλεί την κυτταροτοξικότητα και φθάνει μέχρι τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μέτρια και ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα. Πολλές υπό δοκιμή χημικές ουσίες παρουσιάζουν καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης με μεγάλη κλίση και, για να καλυφθεί το συνολικό φάσμα κυτταροτοξικότητας ή για να μελετηθεί λεπτομερώς η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι αναγκαία η χρήση συγκεντρώσεων με μικρότερα διαστήματα μεταξύ τους και περισσότερων από τέσσερις συγκεντρώσεις, ιδίως σε περιπτώσεις όπου απαιτείται επανάληψη του πειράματος (βλ. παράγραφο 43). Η χρήση περισσότερων από 4 συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν χρησιμοποιούνται μονές καλλιέργειες.

20. Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αποσκοπεί στην επίτευξη μεταξύ 20 και 10 % RS. Τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν μόνο σε 10 % RS ή χαμηλότερο θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (παράγραφος 43).

21. Για δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι κυτταροτοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η αναλυόμενη μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να παράγει θολερότητα ή ίζημα ορατό με γυμνό οφθαλμό ή με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου στο τέλος της αγωγής με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ακόμη και αν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, συνιστάται να διεξάγεται η δοκιμή σε μία μόνο συγκέντρωση που παράγει θολερότητα ή ορατό ίζημα, διότι μπορεί να προκύψουν τεχνητές επιδράσεις από το ίζημα. Στη συγκέντρωση που παράγει ίζημα, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι αυτό δεν παρεμποδίζει τη διεξαγωγή της δοκιμής. Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πριν από το πείραμα μπορεί να είναι χρήσιμος.

22. Εάν δεν παρατηρηθεί ίζημα ούτε περιοριστική κυτταροτοξικότητα, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 10 mM, 2 mg/ml ή 2 μl/ml (39) (40). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει καθορισμένη σύνθεση, π.χ. ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά [δηλ. χημικές ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης (UVCB)] (41), εκχυλίσματα από το περιβάλλον κ.λπ., η ανώτατη συγκέντρωση θα πρέπει ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (π.χ. 5 mg/ml), ελλείψει επαρκούς κυτταροτοξικότητας, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του κάθε συστατικού. Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (42).

Μάρτυρες

23. Για κάθε συνθήκη του πειράματος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 16), αποτελούμενοι μόνο από τον διαλύτη στο θρεπτικό μέσο της αγωγής και υποβαλλόμενοι στην ίδια μεταχείριση όπως και οι καλλιέργειες.

24. Απαιτούνται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται αφενός η ικανότητα του εργαστηρίου να αναγνωρίζει τα μεταλλαξιγόνα υπό τις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου δοκιμής και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα του εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, κατά περίπτωση. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων παρέχονται κατωτέρω στον πίνακα 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές ουσίες-θετικοί μάρτυρες, εφόσον η χρήση τους αιτιολογείται. Επειδή οι δοκιμές *in vitro* γενετικής τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών είναι επαρκώς τυποποιημένες, επιτρέπεται η διεξαγωγή δοκιμών με χρήση αγωγών με και χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση με χρήση ενός μόνο θετικού μάρτυρα για τον οποίο απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση. Στην περίπτωση αυτή, η εν λόγω μοναδική απόκριση στον θετικό μάρτυρα θα καταδείξει τόσο τη δραστηριότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης όσο και την αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμών. Κάθε θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις που αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση σε σχέση με την τιμή υποβάθρου, για να καταδεικνύεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής, και η απόκριση δεν θα πρέπει να διακυβεύεται εξαιτίας κυτταροτοξικότητας που υπερβαίνει τα όρια που προβλέπονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (βλ. παράγραφο 20).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου και την επιλογή θετικών μαρτύρων

Συνθήκη μεταβολικής ενεργοποίησης	Γενετικός τόπος	Ουσία και αριθ. CAS
Απουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	*Hprt*	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας [αριθ. CAS 62-50-0] Αιθυλονιτροζουρία [αριθ. CAS 759-73-9] 4-Νιτροκινολιν-Ν-οξείδιο [αριθ. CAS 56-57-5]
	xprt	Στρεπτονιγρίνη [αριθ. CAS 3930-19-6] Μιτομυκίνη C [αριθ. CAS 50-07-7]
Παρουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	*Hprt*	3-Μεθυλοχολανθρένιο [αριθ. CAS 56-49-5] 7,12-Διμεθυλοβενζανθρακένιο [αριθ. CAS 57-97-6] Βενζο[a]πυρένιο [αριθ. CAS 50-32-8]
	xprt	Βενζο[a]πυρένιο [αριθ. CAS 50-32-8]

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία

25. Πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 3 έως 6 ώρες αρκούν).

26. Ο ελάχιστος αριθμός χρησιμοποιούμενων κυττάρων για κάθε καλλιέργεια (μάρτυρα και αγωγής) δοκιμής σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στην αυθόρμητη συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης. Μια γενική κατεύθυνση είναι η αγωγή και ανακαλλιέργεια επαρκούς αριθμού κυττάρων ώστε να διατηρούνται 10 προϊόντα αυθόρμητης μετάλλαξης σε κάθε καλλιέργεια, σε όλες τις φάσεις της δοκιμής (17). Η συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης κυμαίνεται γενικά μεταξύ 5 και 20×10^{-6}. Για συχνότητα προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης 5×10^{-6} και για τη διατήρηση επαρκούς αριθμού προϊόντων αυθόρμητης μετάλλαξης (10 ή περισσότερα) ακόμη και για καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή σε συγκεντρώσεις που προκαλούν 90 % κυτταροτοξικότητα στη διάρκεια της αγωγής (10 % RS), θα χρειαστεί να υποβληθούν σε αγωγή τουλάχιστον 20×10^{6} κύτταρα. Επιπλέον, επαρκής αριθμός κυττάρων (ποτέ λιγότερα από 2 εκατομμύρια) πρέπει να καλλιεργείται κατά την περίοδο έκφρασης και να επιστρώνεται για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης (17).

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης και μέτρηση της συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης

27. Μετά την περίοδο αγωγής, τα κύτταρα καλλιεργούνται με σκοπό να καταστεί δυνατή η έκφραση του μεταλλαγμένου φαινοτύπου. Γενικά, ένα ελάχιστο χρονικό διάστημα 7 έως 9 ημερών αρκεί ώστε να επιτευχθεί σχεδόν βέλτιστη φαινοτυπική έκφραση των νέων προκληθεισών μεταλλάξεων Hprt και xprt (43) (44). Στη διάρκεια της περιόδου αυτής, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται τακτικά ώστε να αναπτύσσονται συνεχώς με εκθετικούς ρυθμούς. Μετά τη φαινοτυπική έκφραση, τα κύτταρα επιστρώνονται εκ νέου σε θρεπτικό μέσο με και χωρίς παράγοντα επιλογής (6-θειογουανίνη) με σκοπό τον προσδιορισμό του αριθμού των προϊόντων μετάλλαξης και της απόδοσης κλωνοποίησης, αντίστοιχα, κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής. Η εν λόγω επίστρωση μπορεί να πραγματοποιείται με τρυβλία για καλλιέργειες μονοστιβάδας ή τρυβλία μικροτιτλοδότησης για κύτταρα υπό μορφή εναιωρήματος. Για την επιλογή προϊόντων μετάλλαξης, τα κύτταρα θα πρέπει να επιστρώνονται σε πυκνότητα τέτοια ώστε να διασφαλίζεται η βέλτιστη ανάκτηση των προϊόντων μετάλλαξης (δηλ. να αποφεύγεται η μεταβολική συνεργασία) (17). Τα τρυβλία επωάζονται για κατάλληλο χρονικό διάστημα με σκοπό τη βέλτιστη ανάπτυξη αποικιών (π.χ. 7-12 ημέρες) και καταμετράται ο αριθμός των αποικιών. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών, διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης (βλ. προσάρτημα 2 για τους τύπους).

Τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου

28. Για να εξασφαλίσει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν την εντάξει στην τρέχουσα πρακτική του, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει πραγματοποιήσει σειρά πειραμάτων με θετικές χημικές ουσίες αναφοράς που ενεργούν μέσω διαφόρων μηχανισμών (τουλάχιστον μία που ενεργεί με και μία που ενεργεί χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, επιλεγμένες μεταξύ των χημικών ουσιών που απαριθμούνται στον πίνακα 1) και διάφορους αρνητικούς μάρτυρες (περιλαμβανομένων διαφόρων διαλυτών/φορέων). Οι αποκρίσεις των εν λόγω θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αυτό δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 30 έως 33.

29. Θα πρέπει να διερευνάται ένα σύνολο επιλεγμένων χημικών ουσιών (βλ. πίνακα 1 στην παράγραφο 25) απουσία και παρουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, προκειμένου να καταδεικνύεται η τεχνική ικανότητα ανίχνευσης μεταλλαξιγόνων χημικών ουσιών, να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης και να καταδεικνύεται η καταλληλότητα των συνθηκών ανάπτυξης κυττάρων στη διάρκεια της αγωγής, της φαινοτυπικής έκφρασης και της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης, καθώς και των διαδικασιών καταμέτρησης. Θα πρέπει να επιλέγεται ένα εύρος συγκεντρώσεων των επιλεγμένων χημικών ουσιών που να επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη συγκέντρωση αυξήσεις σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου, για να αποδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής.

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

30. Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες,

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς αγωγή, με διαλύτη).

31. Κατά την αρχική συγκέντρωση δεδομένων για ιστορική κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες (22). Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της εν λόγω κατανομής (17) (45) (46).

32. Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει αρχικά να δημιουργείται με δεδομένα από τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (47)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους που αφορούν τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και να αποδεικνύουν ότι έχουν τη μεθοδολογία υπό έλεγχο (46). Περαιτέρω συστάσεις για τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων (δηλ. κριτήρια προσθήκης στοιχείων στα ιστορικά δεδομένα και αποκλεισμού στοιχείων από αυτά, καθώς και κριτήρια αποδοχής συγκεκριμένου πειράματος) έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (45).

33. Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να αποτελούνται από τις συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης από μονές καλλιέργειες ή, κατά προτίμηση, από πανομοιότυπες καλλιέργειες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 23. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου σε επίπεδο 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (17) (45) (46). Όταν τα δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός του ορίου ελέγχου σε επίπεδο 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην ιστορική κατανομή μαρτύρων, εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι υπό έλεγχο (βλ. ανωτέρω) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

34. Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να μελετάται υπό το πρίσμα της συμφωνίας της με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

35. Στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα δεδομένα που είναι απαραίτητα για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας (εκφραζόμενης ως RS). Στα δεδομένα, τόσο για τις καλλιέργειες αγωγής όσο και για τις καλλιέργειες-μάρτυρες, θα πρέπει να περιλαμβάνεται ο αριθμός των κυττάρων στο τέλος της αγωγής, ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώθηκαν αμέσως μετά την αγωγή και οι καταμετρηθείσες αποικίες (ή ο αριθμός των κοιλοτήτων χωρίς αποικίες για τη μέθοδο μικροτιτλοδότησης). Η RS για κάθε καλλιέργεια θα πρέπει να εκφράζεται ως ποσοστό επί του παράλληλου μάρτυρα με διαλύτη (για ορισμούς, ανατρέξτε στο προσάρτημα 1).

36. Στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνονται επίσης όλα τα δεδομένα που είναι απαραίτητα για τον υπολογισμό της συχνότητας των προϊόντων μετάλλαξης. Στα δεδομένα για τις καλλιέργειες αγωγής και τις καλλιέργειες μάρτυρες θα πρέπει να περιλαμβάνονται: 1) ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώνονται με και χωρίς παράγοντα επιλογής (κατά τη χρονική στιγμή που επιστρώνονται τα κύτταρα για επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης) και 2) ο αριθμός των καταμετρούμενων αποικιών (ή ο αριθμός των κοιλοτήτων χωρίς αποικίες για τη μέθοδο μικροτιτλοδότησης) από τα τρυβλία με και χωρίς παράγοντα επιλογής. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών (στα τρυβλία με τον παράγοντα επιλογής), διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης (από τα τρυβλία χωρίς παράγοντα επιλογής). Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων ανά εκατομμύριο βιώσιμων κυττάρων (για ορισμούς, ανατρέξτε στο προσάρτημα 1).

37. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται σε μορφή πίνακα.

Κριτήρια αποδοχής

38. Η αποδοχή μιας δοκιμής βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας θεωρείται αποδεκτός για προσθήκη στη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 33.

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 24) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

— Διεξήχθησαν δοκιμές και στις δύο πειραματικές συνθήκες (με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση), εκτός εάν σε μία από αυτές τα αποτελέσματα ήταν θετικά (βλ. παράγραφο 25).

— Επαρκής αριθμός κυττάρων και συγκεντρώσεων είναι αναλύσιμος (παράγραφοι 25, 26 και 19).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης συγκέντρωσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 20, 21 και 22.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

39. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν:

— τουλάχιστον σε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— η αύξηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 33).

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών σε αυτό το σύστημα δοκιμής. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (46) (48).

40. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν:

— σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν παρατηρείται αύξηση σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης,

— όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 33).

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

41. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

42. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, όπως περιγράφεται ανωτέρω, ή για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση. Η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με τη χρήση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [π.χ. διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων, άλλες συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης (δηλ. συγκέντρωση ή προέλευση του S9)] θα μπορούσε να είναι χρήσιμη.

43. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει να συναχθούν θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, η απόκριση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να κρίνεται αμφίβολη (να ερμηνεύεται ως εξίσου δυνάμενη να είναι είτε θετική είτε αρνητική).

Έκθεση δοκιμής

44. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη,

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κύτταρα:

Για κύριες εργαστηριακές καλλιέργειες:

— τύπος, προέλευση κυτταρικών σειρών,

— αριθμός ανακαλλιεργειών, εάν υπάρχει, και ιστορικό στο εργαστήριο,

— χαρακτηριστικά καρυότυπου και/ή χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων,

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών,

— απουσία μυκοπλάσματος,

— χρόνοι διπλασιασμού των κυττάρων.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων π.χ. δεδομένων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας,

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2, επίπεδο υγρασίας,

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκφραζόμενη ως τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (π.χ. μg ή mg/mL ή mM θρεπτικού μέσου καλλιέργειας),

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του διαλύτη και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας,

— θερμοκρασία επώασης,

— χρόνος επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την αγωγή,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (πηγή του S9, μέθοδος παρασκευής του μείγματος S9, συγκέντρωση ή όγκος του μείγματος S9 και του S9 στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ποιοτικοί έλεγχοι του S9),

— χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, τελικές συγκεντρώσεις για κάθε συνθήκη αγωγής,

— διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιεργηθέντων κυττάρων και των χρονοδιαγραμμάτων ανακαλλιέργειας και τροφοδοσίας, κατά περίπτωση),

— ταυτότητα του παράγοντα επιλογής και συγκέντρωσή του,

— κριτήρια αποδοχής των δοκιμών,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας,

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε,

— διάρκεια των χρόνων επώασης μετά την επίστρωση,

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του pH, της ωσμωμοριακότητας και της καθίζησης.

Αποτελέσματα:

— αριθμός κυττάρων που υποβλήθηκαν σε αγωγή και αριθμός κυττάρων ανακαλλιέργειας για κάθε καλλιέργεια,

— μετρήσεις κυτταροτοξικότητας, και άλλες παρατηρήσεις, εφόσον υπάρχουν,

— σημεία καθίζησης και χρόνος προσδιορισμού,

— αριθμός κυττάρων που επιστρώθηκαν σε επιλεκτικό και μη επιλεκτικό μέσο,

— αριθμός αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο και αριθμός ανθεκτικών αποικιών σε επιλεκτικό μέσο, και αντίστοιχες συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες),

— ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις και διάστημα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %) καθώς και το πλήθος των δεδομένων,

— στατιστικές αναλύσεις (για μεμονωμένες καλλιέργειες και συγκεντρωτικές πανομοιότυπες καλλιέργειες, ανάλογα με την περίπτωση), και τιμές p, εάν υπάρχουν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells· Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Χειρόγραφο υπό επεξεργασία).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Στο: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol.*, 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP). Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Στο: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OECD (2014). Έγγραφο που τεκμηριώνει την απόφαση WNT για την εφαρμογή αναθεωρημένων κριτηρίων για την επιλογή της μέγιστης συγκέντρωσης στις *in vitro* δοκιμές γονιδιοτοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών (κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών 473, 476 και 487). Διατίθεται κατόπιν αιτήσεως από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Μεταλλαξιγόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων: χημικές ουσίες που προκαλούν υποκατάσταση ζευγών βάσεων στο DNA.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Απόδοση κλωνοποίησης: Το ποσοστό των κυττάρων που επιστρώνονται σε χαμηλή πυκνότητα και μπορούν να αναπτυχθούν σε καταμετρήσιμη αποικία.

Συγκεντρώσεις: τελικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κυτταροτοξικότητα: για τις δοκιμές που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών, η κυτταροτοξικότητα ορίζεται ως μείωση της σχετικής επιβίωσης των κυττάρων υπό αγωγή σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. τη σχετική παράγραφο).

Εξελικτική μετάλλαξη: γονιδιακή μετάλλαξη από τον γονικό τύπο προς το προϊόν μετάλλαξης, που προκαλεί τροποποίηση ή απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας ή της λειτουργίας της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης.

Μεταλλαξιγόνα μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου: χημικές ουσίες που προκαλούν προσθήκη ή απάλειψη ενός ή πολλών ζευγών βάσεων στο μόριο DNA.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει όλα τα είδη βλαβών του DNA ή των χρωμοσωμάτων, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις προσθήκες, τις αναδιατάξεις, τις μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Θρεπτικό μέσο HAT: θρεπτικό μέσο που περιέχει υποξανθίνη, αμινοπτερίνη και θυμιδίνη, και το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων μετάλλαξης Hprt.

Μιτωτικός ανασυνδυασμός: στη διάρκεια της μίτωσης, ο ανασυνδυασμός μεταξύ ομολόγων χρωματίδων που ενδεχομένως προκαλεί επαγωγή δίκλωνων ρήξεων του DNA ή απώλεια ετεροζυγωτικότητας.

Θρεπτικό μέσο MPA: θρεπτικό μέσο που περιέχει ξανθίνη, αδενίνη, θυμιδίνη, αμινοπτερίνη και μυκοφαινολικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων μετάλλαξης Xprt.

Μεταλλαξιγόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων αλληλουχιών ζευγών βάσεων του DNA σε γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (mutant frequency, MF): ο αριθμός των παρατηρούμενων μεταλλαγμένων αποικιών διά του αριθμού των κυττάρων που επιστρώνονται στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο, διορθωμένος ως προς την απόδοση κλωνοποίησης (ή βιωσιμότητα) κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής.

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης: περίοδος μετά την αγωγή κατά την οποία η γενετική αλλοίωση εγκαθίσταται στο γονιδίωμα και τυχόν προϋπάρχοντα γονιδιακά προϊόντα μειώνονται σε βαθμό τέτοιο ώστε να αλλοιώνεται το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό.

Σχετική επιβίωση (relative survival, RS): η RS χρησιμοποιείται ως το μέτρο της σχετιζόμενης με την αγωγή κυτταροτοξικότητας. Η RS είναι η απόδοση κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένη ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %).

Ηπατικά κλάσματα S9: υπερκείμενο υγρό ομογενοποιήματος ήπατος μετά από φυγοκέντρηση σε 9 000 g, δηλ. ανεπεξέργαστο εκχύλισμα ήπατος.

Μείγμα S9: μείγμα του ηπατικού κλάσματος S9 με συμπαράγοντες αναγκαίους για τη δράση των μεταβολικών ενζύμων.

Μάρτυρας με διαλύτη: γενικός όρος για τον προσδιορισμό των καλλιεργειών μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο τον διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή: καλλιέργειες που δεν υφίστανται καμία αγωγή (ούτε με την υπό δοκιμή χημική ουσία ούτε με διαλύτη), αλλά ετοιμάζονται ταυτόχρονα με τις καλλιέργειες που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία και με τον ίδιο τρόπο.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά.

Προσάρτημα 2

ΤΥΠΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Η κυτταροτοξικότητα αξιολογείται βάσει της σχετικής επιβίωσης, δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %) (βλ. τύπο RS κατωτέρω).

Η προσαρμοσμένη CE για καλλιέργεια υπό αγωγή με χημική ουσία υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{προσαρμοσμΧνη CE} = \frac{\text{αριθμός κυττΦρων στο τΧλος της ανωγψς}}{\text{αριαμος κυττΦρων στην αρχψ της αγωγψς}}$$

Η RS για καλλιέργεια υπό αγωγή με χημική ουσία υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{RS} = \frac{\text{προσαρμιοσμΧνη CE στην καλλιΧέργεια ανωγψς}}{\text{προσαρμιοσμΧνη CE στον μΦρτυρα με διαλύτη}} \times 100$$

Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης είναι η απόδοση κλωνοποίησης μεταλλαγμένων αποικιών σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο διά της απόδοσης κλωνοποίησης σε μη επιλεκτικό μέσο μετρούμενης για την ίδια καλλιέργεια κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής.

$$\text{συχνότητα προϊόντων μετΦλλαξης} = \frac{\text{CE στις μεταλλογμΧνες αποικΩες σε επιλεκτικό μΧσο}}{\text{CE σε μη επιλεκτικό μΧσο}}$$

Σε περίπτωση χρήσης τρυβλίων για την απόδοση κλωνοποίησης:

CE = αριθμός αποικιών / αριθμός επιστρωμένων κυττάρων

Σε περίπτωση χρήσης τρυβλίων μικροτιτλοδότησης για την απόδοση κλωνοποίησης:

Ο αριθμός των αποικιών ανά κοιλότητα στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης ακολουθεί κατανομή Poisson.

απόδοση κλωνοποίησης = -LnP(0) / αριθμός επιστρωμένων κυττάρων ανά κοιλότητα

Όπου -LnP(0) είναι ο πιθανός αριθμός κενών κοιλοτήτων μεταξύ των κοιλοτήτων ανακαλλιέργειας, ο οποίος περιγράφεται βάσει του ακόλουθου τύπου

LnP(0)= -Ln (αριθμός κενών κοιλοτήτων / αριθμός επιστρωμένων κοιλοτήτων)»

3) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.22 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«**ΔΟΚΙΜΗ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 478 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και παραμέτρων που αφορούν την καλή μεταχείριση των ζώων. Η παρούσα τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου δοκιμών αντικατοπτρίζει πάνω από τριάντα έτη εμπειρίας με τη συγκεκριμένη δοκιμή και παρέχει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης ή συνδυασμού αυτής της δοκιμής με άλλες δοκιμές τοξικότητας, όπως μελέτες ανάπτυξης, τοξικότητας στην αναπαραγωγή ή γονιδιοτοξικότητας· εντούτοις, λόγω των περιορισμών της και της χρήσης μεγάλου αριθμού ζώων, η παρούσα δοκιμή δεν προορίζεται για χρήση ως κύρια μέθοδος, αλλά μάλλον ως συμπληρωματική μέθοδος δοκιμών, που μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον δεν υπάρχει εναλλακτική λύση σε σχέση με τις κανονιστικές απαιτήσεις. Ο συνδυασμός δοκιμών τοξικότητας παρέχει τη δυνατότητα σημαντικής μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε αυτές. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών γενετικής τοξικότητας του ΟΟΣΑ (1).

2. Σκοπός της δοκιμής θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα (DL) είναι να διερευνήσει το κατά πόσον οι χημικές ουσίες προκαλούν μεταλλάξεις οφειλόμενες σε χρωμοσωμικές εκτροπές σε γεννητικά κύτταρα. Επιπλέον, η δοκιμή θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα είναι σημαντική για την αξιολόγηση της γονιδιοτοξικότητας, διότι οι παράγοντες των διεργασιών μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και επιδιόρθωσης του DNA *in vivo*, αν και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών, είναι ενεργοί και συμβάλλουν στην απόκριση. Επαγωγή μετάλλαξης DL μετά από έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία δείχνει ότι η χημική ουσία επηρέασε γεννητικούς ιστούς του πειραματόζωου.

3. Οι μεταλλάξεις DL προκαλούν θάνατο κατά το πρώιμο ή όψιμο εμβρυϊκό στάδιο. Επαγωγή μετάλλαξης DL μετά από έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία δείχνει ότι η χημική ουσία επηρέασε τα γεννητικά κύτταρα του πειραματόζωου.

4. Μια δοκιμή DL είναι χρήσιμη για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων δοκιμών που χρησιμοποιούν σωματικές παραμέτρους *in vivo* και αποτελεί χρήσιμη παράμετρο για την πρόβλεψη της επικινδυνότητας για τον άνθρωπο και του κινδύνου γενετικών ασθενειών που μεταδίδονται μέσω της σειράς γεννητικών κυττάρων. Ωστόσο, η εν λόγω δοκιμή απαιτεί μεγάλο αριθμό ζώων και εντατική εργασία· ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα δαπανηρή και χρονοβόρος. Δεδομένου ότι η αυθόρμητη συχνότητα μεταλλάξεων θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα είναι αρκετά υψηλή, η ευαισθησία της δοκιμασίας ως προς την ανίχνευση μικρών αυξήσεων της συχνότητας μεταλλάξεων είναι σε γενικές γραμμές περιορισμένη.

5. Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

6. Η δοκιμή διεξάγεται συνήθως σε ποντικούς (2) (3) (4), χωρίς να αποκλείεται, σε ορισμένες περιπτώσεις και εφόσον είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο, να είναι κατάλληλα άλλα είδη, όπως οι επίμυες (5) (6) (7) (8). Παρότι οι μεταλλάξεις DL είναι, γενικά, αποτέλεσμα αδρών χρωμοσωμικών εκτροπών (δομικών και αριθμητικών ανωμαλιών) (9) (10) (11), δεν μπορούν να αποκλειστούν οι γονιδιακές μεταλλάξεις. Μια μετάλλαξη DL είναι μετάλλαξη που εμφανίζεται στο ίδιο το γεννητικό κύτταρο ή εγκαθίσταται μετά τη γονιμοποίηση στο πρώιμο έμβρυο, η οποία δεν προκαλεί δυσλειτουργία του γαμέτη αλλά είναι θανατηφόρα για το γονιμοποιημένο ωάριο ή το αναπτυσσόμενο έμβρυο.

7. Μεμονωμένα αρσενικά ζευγαρώνονται αλληλοδιάδοχα με παρθένα θηλυκά ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα. Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή εξαρτάται από τον τελικό σκοπό της μελέτης DL (παράγραφος 23) και θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να διασφαλίζεται η αξιολόγηση όλων των φάσεων της ωρίμανσης των αρσενικών γεννητικών κυττάρων για DL (12).

8. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία, ή ο/οι μεταβολίτης/-ες της, δεν θα φθάσει στους όρχεις, δεν είναι κατάλληλη για χρήση στην παρούσα δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

9. Γενικά, τα αρσενικά ζώα εκτίθενται σε υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω της κατάλληλης οδού έκθεσης και ζευγαρώνονται με παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή. Μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή διάφορα είδη γεννητικών κυττάρων με χρήση αλληλοδιάδοχων διαστημάτων ζευγαρώματος. Μετά το ζευγάρωμα, τα θηλυκά θανατώνονται με ευθανασία μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα και οι μήτρες τους εξετάζονται για να διαπιστωθεί ο αριθμός των εμφυτευμένων, των ζωντανών και των νεκρών εμβρύων. Η επίδραση θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζεται μέσω σύγκρισης των ζωντανών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό της ομάδας αγωγής με τα ζωντανά εμφυτευμένα έμβρυα ανά θηλυκό της ομάδας μαρτύρων με φορέα/διαλύτη. Η αύξηση των νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με τα νεκρά εμφυτευμένα έμβρυα ανά θηλυκό στην ομάδα μαρτύρων αντανακλά την επαχθείσα από την υπό δοκιμή χημική ουσία μετεμφυτευματική απώλεια. Η μετεμφυτευματική απώλεια υπολογίζεται με βάση την αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων προς τα συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα στην ομάδα αγωγής, συγκρινόμενη με την αναλογία νεκρών προς συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα στην ομάδα μαρτύρων. Η προεμφυτευματική απώλεια μπορεί να εκτιμηθεί με σύγκριση των αριθμών των ωχρών σωματίων μείον τα συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα, ή των συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα αγωγής και στην ομάδα μαρτύρων.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

10. Για να διαπιστωθεί η τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της παρούσας δοκιμής, πρέπει να καταδεικνύεται η ικανότητα αναπαραγωγής των συχνοτήτων θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα των δημοσιευμένων δεδομένων [π.χ. (13) (14) (15) (16) (17) (18)] με ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες (συμπεριλαμβανομένων των ασθενών αποκρίσεων), όπως οι ουσίες που απαριθμούνται στον πίνακα 1, και με μάρτυρες με φορέα, και των συχνοτήτων αρνητικών μαρτύρων που συμφωνούν με τα αποδεκτά πεδία τιμών δεδομένων (βλ. παραπομπές ανωτέρω) ή με την κατανομή ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για τους μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή, σεξουαλικώς ώριμα ζώα που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Συνήθως χρησιμοποιούνται ποντικοί, αλλά μπορεί να είναι κατάλληλοι και οι επίμυες. Η χρήση άλλων κατάλληλων ειδών θηλαστικών επιτρέπεται, εφόσον αιτιολογείται επιστημονικά στην έκθεση.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

12. Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία στον θάλαμο των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς ανάμειξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Πριν από την αγωγή ή το ζευγάρωμα, τα τρωκτικά θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε) του ίδιου φύλου, εφόσον δεν αναμένεται ούτε παρατηρείται επιθετική συμπεριφορά, κατά προτίμηση σε κλωβούς με συμπαγές δάπεδο με κατάλληλο εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Εάν αιτιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά.

Προετοιμασία των ζώων

13. Χρησιμοποιούνται υγιή και σεξουαλικώς ώριμα αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα τα οποία κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Τα ζώα ταυτοποιούνται μοναδικά με χρήση ανώδυνης, ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου (π.χ. δακτύλιοι, ετικέτες, μικροτσίπ ή βιομετρική ταυτοποίηση, αλλά όχι αποκοπή τμήματος αυτιού ή δακτύλου) και εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου για τουλάχιστον πέντε ημέρες. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα και την υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές βάρους των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

Παρασκευή των δόσεων

14. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτης/φορέας

15. Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στους χρησιμοποιούμενους όγκους δόσεων, ούτε να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης/φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατών διαλυτών/φορέων είναι, μεταξύ άλλων, το νερό, ο φυσιολογικός ορός (ισότονο αλατούχο διάλυμα), το διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης, το διάλυμα άλατος της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με νάτριο, το ελαιόλαδο και το αραβοσιτέλαιο.

Θετικοί μάρτυρες

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα που χρησιμεύουν ως παράλληλοι θετικοί μάρτυρες, εκτός εάν το εργαστήριο δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της δοκιμής και χρησιμοποιεί τη δοκιμή σε τακτική βάση κατά το πρόσφατο παρελθόν (π.χ. τουλάχιστον κατά τα τελευταία 5 έτη). Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητη η αγωγή των ζώων θετικών μαρτύρων διά της ίδιας οδού με αυτήν που χρησιμοποιείται για τα ζώα που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, ούτε είναι απαραίτητη η δειγματοληψία σε όλα τα διαστήματα ζευγαρώματος. Οι ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν εξακριβωμένα DL στις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Με εξαίρεση την αγωγή, τα ζώα των ομάδων μαρτύρων πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα των ομάδων αγωγής.

17. Οι δόσεις των ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να προκαλούν ασθενείς ή μέτριες επιδράσεις μέσω των οποίων κρίνονται ορθά οι επιδόσεις και η ευαισθησία της δοκιμής, αλλά θα πρέπει και να προκαλούν σταθερά θετικές επιδράσεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα. Παραδείγματα χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες, και οι κατάλληλες δόσεις, περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες

Ουσία [αριθ. CAS] (αριθ. αναφοράς)	Κλίμακα αποτελεσματικών δόσεων (mg/kg) (είδη τρωκτικών)	Χρόνος χορήγησης (ημέρες)
Τριαιθυλενομελαμίνη [51-18-3] (15)	0,25 (ποντικοί)	1
Κυκλοφωσφαμίδιο [50-18-0] (19)	50-150 (ποντικοί)	5
Κυκλοφωσφαμίδιο [50-18-0] (5)	25-100 (επίμυες)	1
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας [62-50-0] (13)	100-300 (ποντικοί)	5
Μονομερές ακρυλαμίδιο [79-06-1] (17)	50 (ποντικοί)	5
Χλωραμβουκίλη [305-03-3] (14)	25 (ποντικοί)	1

Αρνητικοί μάρτυρες

18. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και ζώα που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες, στα οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης ή ο φορέας και τα οποία, κατά τα άλλα, υφίστανται την ίδια μεταχείριση όπως οι ομάδες αγωγής (20). Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες από τα οποία προκύπτει ότι ο επιλεγμένος διαλύτης/φορέας δεν επάγει επιδράσεις DL ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, ζώα που χρησιμεύουν ως μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή ώστε να διαπιστώνεται η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με τον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός ζώων

19. Μεμονωμένα αρσενικά ζευγαρώνονται αλληλοδιάδοχα σε κατάλληλα προκαθορισμένα διαστήματα (π.χ. εβδομαδιαία διαστήματα, παράγραφοι 21 & 23), κατά προτίμηση με ένα παρθένο θηλυκό ζώο. Ο αριθμός των αρσενικών ανά ομάδα θα πρέπει να καθορίζεται εκ των προτέρων (σε συνδυασμό με τον αριθμό των ζευγαρωμένων θηλυκών σε κάθε διάστημα ζευγαρώματος) κατά τρόπο ώστε να μπορεί να παράσχει τη στατιστική ισχύ που είναι απαραίτητη για τη διαπίστωση τουλάχιστον ενός διπλασιασμού της συχνότητας DL (παράγραφος 44).

20. Ο αριθμός των θηλυκών ανά διάστημα ζευγαρώματος θα πρέπει επίσης να καθορίζεται εκ των προτέρων βάσει υπολογισμών της στατιστικής ισχύος ώστε να επιτρέπει τη διαπίστωση τουλάχιστον του διπλασιασμού της συχνότητας DL (δηλ. επαρκής αριθμός εγκύων θηλυκών ώστε να παρέχονται τουλάχιστον 400 συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα) (20) (21) (22) (23) και προκειμένου να αναμένεται τουλάχιστον ένα νεκρό εμφυτευμένο έμβρυο ανά μονάδα ανάλυσης (δηλ. ομάδα ζευγαρώματος ανά δόση) (24).

Περίοδος χορήγησης και διαστήματα ζευγαρώματος

21. Ο αριθμός των διαστημάτων ζευγαρώματος μετά την αγωγή καθορίζεται βάσει του χρονοδιαγράμματος αγωγής και θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να διασφαλίζεται η αξιολόγηση της επαγωγής DL σε όλες τις φάσεις ωρίμανσης των αρσενικών γεννητικών κυττάρων (12) (25). Για μοναδική αγωγή έως πέντε ημερήσιων χορηγήσεων δόσης, θα πρέπει να πραγματοποιούνται 8 ζευγαρώματα (ποντικών) ή 10 (επιμύων) σε εβδομαδιαία διαστήματα μετά την τελευταία αγωγή. Για πολλαπλές χορηγήσεις δόσης, ο αριθμός των διαστημάτων ζευγαρώματος μπορεί να μειωθεί κατ' αναλογία προς τον αυξημένο χρόνο της περιόδου χορήγησης, αλλά διατηρώντας τον στόχο της αξιολόγησης όλων των φάσεων της σπερματογένεσης (π.χ. μετά από έκθεση 28 ημερών, 4 μόνο εβδομαδιαία ζευγαρώματα αρκούν για την αξιολόγηση όλων των φάσεων σπερματογένεσης στον ποντικό). Όλα τα χρονοδιαγράμματα αγωγής και ζευγαρώματος θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά.

22. Τα θηλυκά θα πρέπει να παραμένουν με τα αρσενικά τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα ενός κύκλου οίστρου (π.χ. μια εβδομάδα καλύπτει έναν κύκλο οίστρου στους ποντικούς και τους επίμυες). Τα θηλυκά που δεν ζευγάρωσαν στη διάρκεια χρονικού διαστήματος μιας εβδομάδας μπορούν να χρησιμοποιούνται σε επακόλουθο διάστημα ζευγαρώματος ή, εναλλακτικά, μέχρι να πραγματοποιηθεί ζευγάρωμα, όπως αυτό διαπιστώνεται από την παρουσία σπέρματος στον κόλπο ή την παρουσία κολπικού βύσματος.

23. Το χρησιμοποιούμενο σχήμα έκθεσης και ζευγαρώματος εξαρτάται από τον απώτερο σκοπό της μελέτης DL. Εάν ο σκοπός είναι να διαπιστωθεί κατά πόσον μια συγκεκριμένη χημική ουσία επάγει μεταλλάξεις DL, τότε η αποδεκτή μέθοδος θα είναι η έκθεση ενός ολόκληρου κύκλου σπερματογένεσης (π.χ. 7 εβδομάδες στον ποντικό, 5-7 αγωγές ανά εβδομάδα) και ένα ζευγάρωμα στο τέλος. Ωστόσο, εάν ο σκοπός είναι η ταυτοποίηση του ευαίσθητου τύπου γεννητικού κυττάρου ως προς την επαγωγή DL, τότε προτιμάται μία μοναδική έκθεση ή έκθεση 5 ημερών, ακολουθούμενη από εβδομαδιαίο ζευγάρωμα.

Επίπεδα δόσης

24. Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών επειδή δεν υπάρχουν ήδη κατάλληλα δεδομένα για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με τη χρήση του ίδιου είδους, φυλής, φύλου ζώων και σχήματος αγωγής όπως στην κύρια μελέτη (26). Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η ανώτατη δόση που μπορεί να γίνει ανεκτή χωρίς εκδήλωση τοξικότητας η οποία θα περιόριζε τη μελέτη, σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης (π.χ. ασυνήθη συμπεριφορά ή ασυνήθεις αντιδράσεις, μικρή μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα στο αιμοποιητικό σύστημα), αλλά όχι θάνατο ή εκδήλωση πόνου, οδύνης ή αγωνίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση με ευθανασία (27).

25. Επίσης, η ΜΑΔ δεν πρέπει να επηρεάζει δυσμενώς το επιτυχές ζευγάρωμα (21).

26. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ειδική βιολογική δράση σε χαμηλές, μη τοξικές δόσεις (όπως οι ορμόνες και τα μιτογόνα), καθώς και χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό των τοξικοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις των κριτηρίων καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

27. Για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει ομάδα αρνητικών μαρτύρων και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων, τα οποία κατά κανόνα διαφέρουν κατά έναν συντελεστή ίσο με το 2, αλλά πάντως όχι μεγαλύτερο του 4. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προκαλεί τοξικότητα σε μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών ή με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, η ανώτατη δόση για εφάπαξ χορήγηση θα πρέπει να είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους. Ωστόσο, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, η ΜΑΔ θα πρέπει να είναι η ανώτατη χορηγούμενη δόση και τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καλύπτουν το φάσμα από τη μέγιστη δόση μέχρι τη δόση που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όσον αφορά μη τοξικές χημικές ουσίες, η οριακή δόση για περίοδο χορήγησης 14 ημερών και άνω είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρος/ημέρα, ενώ για περιόδους χορήγησης κάτω των 14 ημερών, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα.

Χορήγηση των δόσεων

28. Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, με τοπική εφαρμογή, μέσω της εισπνοής, από το στόμα (με στομαχικό καθετήρα) ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η οδός έκθεσης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής έκθεση του ή των στοχευόμενων ιστών. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται κατά κανόνα, διότι δεν αποτελεί σκοπούμενη οδό έκθεσης του ανθρώπου, και θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με ειδική επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, ιδίως στην περίπτωση των εφάπαξ δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το διάστημα μεταξύ της κατανάλωσης νερού και τροφής και του ζευγαρώματος να επαρκεί για την ανίχνευση των επιδράσεων (παράγραφος 31). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων, όπου επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά μέγιστο όριο 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου (εφόσον το επιτρέπει η νομοθεσία για την καλή μεταχείριση των ζώων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση σταθερού όγκου σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

Παρατηρήσεις

29. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και τα κλινικά σημεία να καταγράφονται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα/-ες και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως κατά την περίοδο της χορήγησης για τη διαπίστωση τυχόν νοσηρότητας και θνησιμότητας. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της μελέτης, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως κατά τη διεξαγωγή μελετών επαναλαμβανόμενων δόσεων, και κατά τη χρονική στιγμή της ευθανασίας. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής (27).

Συλλογή και επεξεργασία ιστών

30. Τα θηλυκά υποβάλλονται σε ευθανασία κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης, τη 13η ημέρα κύησης στον ποντικό και τη 14η-15η ημέρα κύησης στον επίμυ. Οι μήτρες εξετάζονται για επιδράσεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των εμφυτευμένων, των ζωντανών και των νεκρών εμβρύων, καθώς και των ωχρών σωματίων.

31. Τα κέρατα της μήτρας και οι ωοθήκες αποκαλύπτονται με σκοπό την καταμέτρηση των ωχρών σωματίων, και τα διαμορφωμένα έμβρυα αφαιρούνται, καταμετρώνται και ζυγίζονται. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε οι μήτρες να εξετάζονται για επαναπορροφηθέντα έμβρυα που είναι δυσδιάκριτα λόγω ζωντανών εμβρύων και να εξασφαλίζεται η καταμέτρηση όλων των επαναπορροφηθέντων εμβρύων. Καταγράφεται η θνησιμότητα των διαμορφωμένων εμβρύων. Καταγράφεται επίσης ο αριθμός των γονιμοποιημένων θηλυκών και ο αριθμός των συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων, οι προεμφυτευματικές απώλειες και η μετεμφυτευματική θνησιμότητα (περιλαμβάνονται τα επαναπορροφηθέντα πρώιμα και όψιμα έμβρυα). Επιπλέον, τα ορατά διαμορφωμένα έμβρυα μπορούν να διατηρηθούν σε μονιμοποιητικό διάλυμα Bouin για τουλάχιστον 2 εβδομάδες, και, στη συνέχεια, να υποβληθούν σε εξέταση για σοβαρές εξωτερικές δυσπλασίες (28) για την εξαγωγή πρόσθετων πληροφοριών σχετικά με τις επιδράσεις της υπό δοκιμή ουσίας στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

32. Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα για να δείχνουν τον αριθμό των ζευγαρωμένων αρσενικών, τον αριθμό των εγκύων θηλυκών και τον αριθμό των μη εγκύων θηλυκών ζώων. Τα αποτελέσματα κάθε ζευγαρώματος, συμπεριλαμβανομένης της ταυτότητας κάθε αρσενικού και θηλυκού, πρέπει να εκτίθενται χωριστά. Πρέπει να αναφέρεται το διάστημα ζευγαρώματος, το επίπεδο δόσης για τα αρσενικά, και οι αριθμοί των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων για τα θηλυκά.

33. Η μετεμφυτευματική απώλεια υπολογίζεται με βάση την αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων προς τα συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα από την ομάδα αγωγής, συγκρινόμενη με την αναλογία νεκρών προς συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα από την ομάδα μαρτύρων με φορέα/διαλύτη.

34. Η προεμφυτευματική απώλεια υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ του αριθμού των ωχρών σωματίων και του αριθμού των εμφυτευμένων εμβρύων, ή ως η μείωση του μέσου αριθμού των εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό σε σύγκριση με τα ζευγαρώματα μαρτύρων. Πρέπει να αναφερθεί, εφόσον έχει εκτιμηθεί, η προεμφυτευματική απώλεια.

35. Ο συντελεστής θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα εκτιμάται ως εξής: (μετεμφυτευματικοί θάνατοι/συνολικές εμφυτεύσεις ανά θηλυκό) × 100.

36. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία (σύμφωνα με την παράγραφο 29).

Κριτήρια αποδοχής

37. Τα ακόλουθα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή μιας δοκιμής.

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας συμφωνεί με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς μάρτυρες, καθώς και με τα ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τους μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν (βλ. παραγράφους 10 και 18).

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες επάγουν αποκρίσεις που συμφωνούν με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για θετικούς μάρτυρες ή με τη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για θετικούς μάρτυρες, εφόσον υπάρχει, και προκαλούν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παραγράφους 17 και 18).

— Αναλύεται επαρκής αριθμός συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων και δόσεων (παράγραφος 20).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 24 και 27.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

38. Προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για ανάλυση της σχέσης δόσης–απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν δόσεις.

39. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

— τουλάχιστον σε μία από τις δόσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— η αύξηση σχετίζεται με τις δόσεις σε τουλάχιστον μία πειραματική συνθήκη (π.χ. εβδομαδιαίο διάστημα ζευγαρώματος) όταν εκτιμάται με κατάλληλο στατιστικό έλεγχο, και

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες του εργαστηρίου (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα σε γεννητικά κύτταρα των πειραματόζωων. Συστάσεις για τις προσφορότερες στατιστικές μεθόδους παρατίθενται στην παράγραφο 44, ενώ άλλες συνιστώμενες στατιστικές προσεγγίσεις έχουν επίσης διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (20) (21) (22) (24) (29). Η πειραματική μονάδα στους χρησιμοποιούμενους στατιστικούς ελέγχους θα πρέπει να είναι το ζώο.

40. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν:

— σε καμία από τις δόσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν υφίσταται αύξηση που σχετίζεται με τις δόσεις σε καμία πειραματική συνθήκη, και

— όλα τα αποτελέσματα εμπίπτουν εντός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες του εργαστηρίου (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα σε γεννητικά κύτταρα των πειραματόζωων.

41. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποκρίσεων.

42. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, και προκειμένου να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος (π.χ. ασθενής ή οριακή αύξηση), τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση με χρήση των υπαρχόντων πειραματικών δεδομένων, όπως το κατά πόσον το θετικό αποτέλεσμα είναι εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου (30).

43. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, η έκβαση κρίνεται αμφίβολη.

44. Η πειραματική μονάδα στους χρησιμοποιούμενους στατιστικούς ελέγχους θα πρέπει να είναι το αρσενικό ζώο. Παρότι τα αριθμητικά δεδομένα (π.χ. ο αριθμός εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό) μπορεί να παρουσιάζουν κατανομή Poisson και/ή οι αναλογίες (π.χ. αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων) μπορεί να παρουσιάζουν διωνυμική κατανομή, συχνά τα δεδομένα αυτά παρουσιάζουν υπερδιασπορά (31). Επομένως, κατά τη στατιστική ανάλυση θα πρέπει πρώτα να χρησιμοποιείται έλεγχος για υπερδιασπορά και υποδιασπορά με χρήση ελέγχων διασποράς όπως ο έλεγχος διωνυμικής διασποράς Cochran (32) ή ο έλεγχος διωνυμικής υπερδιασποράς Tarone C(α) (31) (33). Εάν δεν διαπιστωθεί απόκλιση από τη διωνυμική διασπορά, μπορούν να ελεγχθούν οι τάσεις των αναλογιών στα επίπεδα δόσεων με χρήση του ελέγχου τάσεων Cochran-Armitage (34), και μπορούν να ελεγχθούν συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μάρτυρα με χρήση του ακριβούς ελέγχου του Fisher (35). Παρομοίως, εάν δεν διαπιστωθεί απόκλιση από τη διασπορά Poisson, μπορούν να ελεγχθούν οι τάσεις στις καταμετρήσεις με χρήση της παλινδρόμησης Poisson (36) και μπορούν να ελεγχθούν συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μάρτυρα στο πλαίσιο του μοντέλου Poisson, με χρήση αντιθέσεων κατά ζεύγη (36). Εάν διαπιστωθεί σημαντική υπερδιασπορά ή υποδιασπορά, συνιστάται η χρήση μη παραμετρικών μεθόδων (23) (31). Τέτοιες μέθοδοι είναι οι έλεγχοι τάξεων μεγέθους, όπως ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra για τάση (37) και οι έλεγχοι Mann-Whitney (38) για συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μαρτύρων φορέα/διαλύτη, καθώς και οι έλεγχοι αντιμετάθεσης, επαναδειγματοληψίας ή bootstrap για τάση και οι συγκρίσεις κατά ζεύγη με την ομάδα μαρτύρων (31) (39).

45. Η θετική δοκιμασία DL παρέχει αποδεικτικά στοιχεία για τη γονιδιοτοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα γεννητικά κύτταρα των αρσενικών του δοκιμαζόμενου ζωικού είδους μετά από αγωγή.

46. Αν εξεταστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες τιμές περικλείονται στο ιστορικό πεδίο τιμών για τους μάρτυρες, είναι δυνατόν να προκύψουν ενδείξεις για την αξιολόγηση της βιολογικής σημασίας της απόκρισης (40).

Έκθεση δοκιμής

47. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Συνοπτική παρουσίαση

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές,

— παρασκευή σκευασμάτων για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής,

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις), όταν έχουν διενεργηθεί.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής του,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— μέθοδος ατομικής ταυτοποίησης των ζώων,

— για βραχυπρόθεσμες μελέτες: βάρος κάθε αρσενικού ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής, για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατανάλωση τροφής. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται το εύρος τιμών, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς μάρτυρες και τους αρνητικούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη,

— δεδομένα από τη μελέτη καθορισμού εύρους,

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων, εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικών ή αιματολογικών αναλύσεων και της συχνότητας με την οποία πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ή μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων,

— μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφτασε στον στοχευόμενο ιστό ή εισήλθε στη γενική κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά,

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, κατά περίπτωση,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομέρειες σχετικά με τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος του κλωβού,

— λεπτομερής περιγραφή των χρονοδιαγραμμάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών,

— μέθοδος αναλγησίας,

— μέθοδος ευθανασίας,

— διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των ιστών,

— προέλευση και αριθμοί παρτίδας όλων των έτοιμων αντιδραστηρίων (κιτ) και των αντιδραστηρίων (κατά περίπτωση),

— μέθοδοι αρίθμησης των DL,

— χρονοδιάγραμμα ζευγαρώματος,

— μέθοδοι για την διαπίστωση του ζευγαρώματος,

— χρόνος ευθανασίας,

— κριτήρια βαθμολόγησης των επιδράσεων DL, περιλαμβανομένων των ωχρών σωματίων, των εμφυτευμένων εμβρύων, των επαναπορροφημένων εμβρύων και των μετεμφυτευματικών απωλειών, των ζωντανών και των νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας,

— σωματικό βάρος των αρσενικών κατά τη διάρκεια των περιόδων αγωγής και ζευγαρώματος,

— αριθμός ζευγαρωμένων θηλυκών,

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν,

— δεδομένα για τους παράλληλους και τους ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— δεδομένα για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες,

— στοιχεία με μορφή πινάκων για κάθε μητέρα: αριθμός ωχρών σωματίων ανά μητέρα, αριθμός εμφυτευμένων εμβρύων ανά μητέρα, αριθμός επαναπορροφημένων εμβρύων και προεμφυτευματικών απωλειών ανά μητέρα, αριθμός ζωντανών εμφυτευμένων εμβρύων ανά μητέρα, αριθμός νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων ανά μητέρα, βάρη διαμορφωμένων εμβρύων,

— τα ανωτέρω στοιχεία εν συνόψει για κάθε περίοδο ζευγαρώματος και δόση, με συχνότητες θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα,

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol.*, 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen.*, 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Ωχρό σωμάτιο: η δομή που σχηματίζεται στην ωοθήκη, στο σημείο ενός ωοθυλακίου που έχει απελευθερώσει ωάριο, και η οποία εκκρίνει ορμόνες. Ο αριθμός των ωχρών σωματίων στις ωοθήκες αντιστοιχεί στον αριθμό των ωαρίων που παρήχθησαν κατά την ωορρηξία.

Επικρατούσα θανατηφόρα μετάλλαξη: μετάλλαξη που εμφανίζεται σε γεννητικό κύτταρο, ή εγκαθίσταται μετά τη γονιμοποίηση, και η οποία προκαλεί θάνατο πρώιμου ή όψιμου εμβρύου.

Ποσοστό γονιμότητας: ο αριθμός των ζευγαρωμένων εγκύων θηλυκών προς τον αριθμό των ζευγαρωμένων θηλυκών.

Διάστημα ζευγαρώματος: το χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους της έκθεσης και του ζευγαρώματος των αρσενικών αγωγής. Με κατάλληλη ρύθμιση του διαστήματος αυτού μπορούν να αξιολογηθούν οι χημικές επιδράσεις στους διάφορους τύπους γεννητικών κυττάρων. Στον ποντικό, το ζευγάρωμα κατά την 1η, 2η, 3η, 4η, 5η, 6η, 7η και 8η εβδομάδα μετά το τέλος της έκθεσης εξετάζει τις επιδράσεις στα σπερματοζωάρια, στις συμπυκνωμένες σπερματίδες, τις στρογγυλές σπερματίδες, τα παχυταινικά σπερματοκύτταρα, τα πρώιμα σπερματοκύτταρα, τα διαφοροποιημένα σπερματογόνια, τα διαφοροποιούμενα σπερματογόνια και τα βλαστοκυτταρικά σπερματογόνια.

Προεμφυτευματική απώλεια: η διαφορά μεταξύ του αριθμού των εμφυτευμένων εμβρύων και του αριθμού ωχρών σωματίων. Μπορεί να υπολογιστεί και με σύγκριση των συνολικών εμφυτευμένων εμβρύων ανά θηλυκό στις ομάδες αγωγής και μαρτύρων.

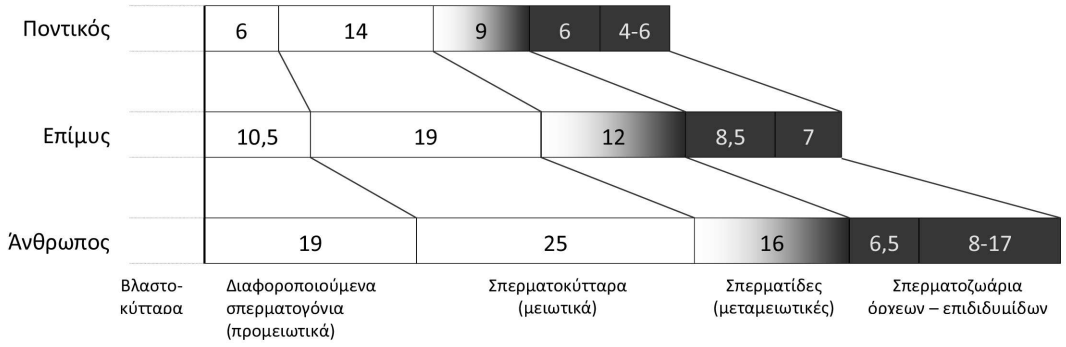
Μετεμφυτευματική απώλεια: η αναλογία νεκρών εμφυτευμένων εμβρύων στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με την αναλογία νεκρών προς συνολικά εμφυτευμένα έμβρυα στην ομάδα μαρτύρων.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά.

Προσάρτημα 2

ΧΡΟΝΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ



Σχ. 1: Σύγκριση της διάρκειας (ημέρες) της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων σε αρσενικούς ποντικούς, επίμυες και ανθρώπους. Στη διάρκεια των περιόδων που είναι σκιασμένες δεν πραγματοποιείται επιδιόρθωση DNA.

Παραπάνω παρουσιάζεται σχηματικό διάγραμμα της σπερματογένεσης στον ποντικό, τον επίμυ και τον άνθρωπο (Adler, 1996). Μεταξύ των μη διαφοροποιημένων σπερματογονίων περιλαμβάνονται: μονά (A-single)· ζευγαρωτά (A-paired)· και στοιχισμένα (A-aligned) σπερματογόνια (Hess and de Franca, 2008). Τα μονά (A-single) θεωρούνται τα καθαυτό βλαστοκύτταρα· ως εκ τούτου, προκειμένου να αξιολογηθούν οι επιδράσεις στα βλαστοκύτταρα πρέπει να παρέλθουν τουλάχιστον 49 ημέρες (στον ποντικό) μεταξύ της τελευταίας ένεσης με την υπό δοκιμή χημική ουσία και του ζευγαρώματος.

Παραπομπές

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Στο: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.»

4) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.23 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.23 **ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 483 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και παραμέτρων που αφορούν την καλή μεταχείριση των ζώων. Η παρούσα τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου δοκιμών αντικατοπτρίζει πολλά έτη εμπειρίας με τη συγκεκριμένη δοκιμή και παρέχει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης ή συνδυασμού της εν λόγω δοκιμής με άλλες δοκιμές τοξικότητας ή γονιδιοτοξικότητας. Ο συνδυασμός μελετών τοξικότητας παρέχει τη δυνατότητα σημαντικής μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές τοξικότητας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών γενετικής τοξικότητας του ΟΟΣΑ (1).

2. Σκοπός της *in vivo* δοκιμής σπερμογονιακής χρωμοσωμικής εκτροπής σε θηλαστικά είναι ο εντοπισμός εκείνων των χημικών ουσιών που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακά κύτταρα θηλαστικών (2) (3) (4). Επιπλέον, η παρούσα δοκιμή είναι σημαντική για την αξιολόγηση της γονιδιοτοξικότητας, διότι οι παράγοντες των διεργασιών μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και επιδιόρθωσης του DNA *in vivo*, αν και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών, είναι ενεργοί και συμβάλλουν στην απόκριση. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί για μέτρηση των αριθμητικών ανωμαλιών· η δοκιμασία δεν χρησιμοποιείται συνήθως για αυτόν τον σκοπό.

3. Η παρούσα δοκιμή μετρά τις δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές (τόσο χρωμοσωμικού όσο και χρωματιδικού τύπου) σε διαιρούμενα σπερμογονιακά γεννητικά κύτταρα και, ως εκ τούτου, αναμένεται να μπορεί να προβλέπει την επαγωγή κληρονομήσιμων μεταλλάξεων στα εν λόγω γεννητικά κύτταρα.

4. Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά, αλλά μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να είναι κατάλληλα και άλλα είδη, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Τα τυποποιημένα κυτταρογενετικά σκευάσματα όρχεων τρωκτικών παράγουν μιτωτικές (σπερματογόνια) και μειωτικές (σπερματοκύτταρο) μεταφάσεις. Οι μιτωτικές και μειωτικές μεταφάσεις προσδιορίζονται βάσει της μορφολογίας των χρωμοσωμάτων (4). Λυτή η *in vivo* κυτταρογενετική δοκιμή ανιχνεύει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακές μιτώσεις. Άλλα κύτταρα στόχοι δεν αποτελούν αντικείμενο της μεθόδου αυτής.

6. Για την ανίχνευση εκτροπών χρωματιδικού τύπου σε σπερμογονιακά κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται η πρώτη μιτωτική κυτταρική διαίρεση μετά την αγωγή, προτού οι εν λόγω εκτροπές μετατραπούν σε εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου σε επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις. Πρόσθετες πληροφορίες από τα σπερματοκύτταρα μπορούν να ληφθούν μέσω ανάλυσης μειωτικών κυττάρων για χρωμοσωμικές δομικές εκτροπές κατά τη διακίνηση-μετάφαση Ι και τη μετάφαση ΙΙ.

7. Στους όρχεις υπάρχει σειρά γενεών σπερματογονίων (5), και οι εν λόγω διαφορετικοί τύποι γεννητικών κυττάρων ενδέχεται να παρουσιάζουν ένα φάσμα ευαισθησίας στην αγωγή με χημικές ουσίες. Ως εκ τούτου, οι ανιχνευόμενες εκτροπές αντιπροσωπεύουν συνολική απόκριση των πληθυσμών σπερμογονιακών κυττάρων αγωγής. Η πλειονότητα των μιτωτικών κυττάρων σε σκευάσματα όρχεων είναι σπερματογόνια Β, με κυτταρικό κύκλο περίπου 26 ωρών (3).

8. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία, ή ο μεταβολίτης/-ες της, δεν θα φθάσει στους όρχεις, τότε αυτή δεν είναι κατάλληλη για χρήση στην παρούσα δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

9. Γενικά, τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία από κατάλληλη οδό έκθεσης και θανατώνονται με ευθανασία σε εύθετο χρόνο μετά την αγωγή. Πριν από την ευθανασία, τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή με παράγοντα διακοπής της μετάφασης (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid®). Στη συνέχεια, παρασκευάζονται και χρωματίζονται χρωμοσώματα από γεννητικά κύτταρα και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται προς εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών εκτροπών.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

10. Για να διαπιστωθεί η τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της παρούσας δοκιμής, πρέπει να καταδεικνύεται η ικανότητα αναπαραγωγής των αναμενόμενων αποτελεσμάτων για τις συχνότητες δομικής χρωμοσωμικής εκτροπής στα σπερματογόνια με ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες (περιλαμβανομένων των ασθενών αποκρίσεων) όπως οι ουσίες που απαριθμούνται στον πίνακα 1, και να λαμβάνονται συχνότητες αρνητικών μαρτύρων που συμφωνούν με το αποδεκτό πεδίο τιμών των δεδομένων για μάρτυρες στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία [π.χ. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)] ή με την ιστορική κατανομή για τους μάρτυρες του εργαστηρίου, εάν υπάρχει.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Επιλογή ζωικού είδους

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Συνήθως χρησιμοποιούνται αρσενικοί ποντικοί· ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά άλλων κατάλληλων ειδών θηλαστικών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά και προκειμένου να είναι εφικτή η διεξαγωγή της παρούσας δοκιμής σε συνδυασμό με άλλη μέθοδο δοκιμών. Η επιστημονική αιτιολόγηση της χρήσης άλλων ειδών εκτός από τρωκτικά θα πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής.

Συνθήκες στέγασης και σίτισης των ζώων

12. Για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία στον θάλαμο των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Η σχετική υγρασία, η ιδανική τιμή της οποίας είναι 50-60 %, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς ανάμειξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα τρωκτικά θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε ανά κλωβό), εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά, κατά προτίμηση σε κλωβούς με συμπαγές δάπεδο με κατάλληλο εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Εάν αιτιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά.

Προετοιμασία των ζώων

13. Συνήθως χρησιμοποιούνται υγιή, νεαρά, ενήλικα αρσενικά ζώα (ηλικίας 8-12 εβδομάδων κατά την έναρξη της αγωγής), τα οποία κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Τα ζώα ταυτοποιούνται μοναδικά με χρήση ανώδυνης, ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου (π.χ. δακτύλιοι, ετικέτες, μικροτσίπ ή βιομετρική ταυτοποίηση, αλλά όχι αποκοπή τμήματος αυτιού ή δακτύλου) και εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου για τουλάχιστον πέντε ημέρες. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα και την υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές βάρους μεταξύ των μεμονωμένων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 %.

Παρασκευή των δόσεων

14. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή αερόλυμα στερεού/υγρού, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της καταδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξή της και καθορίζουν τις κατάλληλες συνθήκες φύλαξης.

Συνθήκες της δοκιμής - Διαλύτης/φορέας

15. Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων ούτε ικανότητα χημικής αντίδρασης με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης/φορέας εκτός των καθιερωμένων, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύτη/φορέα. Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατών διαλυτών/φορέων είναι, μεταξύ άλλων, το νερό, ο φυσιολογικός ορός (ισότονο αλατούχο διάλυμα), το διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης, το διάλυμα άλατος της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με νάτριο, το ελαιόλαδο και το αραβοσιτέλαιο. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες που να αποδεικνύουν ότι ένας άτυπος διαλύτης/φορέας δεν επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές και άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να διενεργείται μια αρχική μελέτη για να διαπιστωθεί η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με διαλύτη/φορέα.

Θετικοί μάρτυρες

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα που χρησιμεύουν ως παράλληλοι θετικοί μάρτυρες, εκτός εάν το εργαστήριο δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική ικανότητα διεξαγωγής της δοκιμής και χρησιμοποιεί τη δοκιμή σε τακτική βάση κατά το πρόσφατο παρελθόν (π.χ. τουλάχιστον κατά τα τελευταία 5 έτη). Εάν δεν συμπεριλαμβάνεται ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων, κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες καταμέτρησης (μονιμοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες χωρίς χρώση). Αυτοί μπορούν να ληφθούν με την προσθήκη κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς κατά την καταμέτρηση στο πλαίσιο της μελέτης, τα οποία έχουν ληφθεί και φυλαχθεί από χωριστό πείραμα με θετικούς μάρτυρες που εκτελείται σε τακτά διαστήματα (π.χ. ανά 6 έως 18 μήνες) στο εργαστήριο διεξαγωγής της δοκιμής· για παράδειγμα, κατά τον έλεγχο της τεχνικής ικανότητας και, στη συνέχεια, σε τακτική βάση, όποτε είναι αναγκαίο.

17. Οι ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να επιφέρουν με αξιοπιστία ανιχνεύσιμη αύξηση της συχνότητας των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σχέση με τα αυθόρμητα επίπεδα. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε οι επιδράσεις να είναι σαφείς αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων δειγμάτων στον εξεταστή. Παραδείγματα ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες

Ουσίες [αριθ. CAS] (αρ. αναφοράς)
Κυκλοφωσφαμίδιο (μονοένυδρο) [αριθ. CAS 50-18-0 (αριθ. CAS 6055-19-2)] (9)
Κυκλοεξυλαμίνη [αριθ. CAS 108-91-8] (7)
Μιτομυκίνη C [αριθ. CAS 50-07-7] (6)
Μονομερές ακρυλαμίδιο [CAS 79-06-1] (10)
Τριαιθυλενομελαμίνη [CAS 51-18-3] (8)

Αρνητικοί μάρτυρες

18. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και ζώα που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες, στα οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης ή ο φορέας και τα οποία, κατά τα άλλα, υφίστανται την ίδια μεταχείριση όπως οι ομάδες αγωγής. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες από τα οποία προκύπτει ότι ο επιλεγμένος διαλύτης/φορέας δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, ζώα που χρησιμεύουν ως μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή ώστε να διαπιστώνεται η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με τον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός ζώων

19. Κατά την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να προσδιορίζονται τα μεγέθη των ομάδων κατά τρόπο ώστε κάθε ομάδα να περιλαμβάνει τουλάχιστον 5 αρσενικά ζώα. Αυτός ο αριθμός ζώων ανά ομάδα θεωρείται επαρκής ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητική στατιστική ισχύς (επιτρέπει δηλαδή, κατά κανόνα, την ανίχνευση τουλάχιστον ενός διπλασιασμού της συχνότητας χρωμοσωμικών εκτροπών όταν το επίπεδο αρνητικών μαρτύρων είναι 1,0 % και άνω, με πιθανότητα 80 % σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05) (3) (11). Ενδεικτικά, όσον αφορά τις τυπικές απαιτήσεις για τον μέγιστο αριθμό ζώων, για μια μελέτη με δύο χρόνους δειγματοληψίας, τρεις ομάδες δόσης και μια ομάδα παράλληλων αρνητικών μαρτύρων, συν μια ομάδα θετικών μαρτύρων (κάθε ομάδα αποτελούμενη από πέντε ζώα), θα απαιτούνταν 45 ζώα.

Χρονοδιάγραμμα αγωγής

20. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες χορηγούνται συνήθως εφάπαξ (δηλ. ως εφάπαξ αγωγή)· μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα δοσολογικά σχήματα, εφόσον αυτό δικαιολογείται επιστημονικά.

21. Στην ομάδα στην οποία δίνεται η υψηλότερη δόση, γίνονται δύο δειγματοληψίες μετά την αγωγή. Επειδή ο απαιτούμενος χρόνος για την πρόσληψη και τον μεταβολισμό των υπό δοκιμή ουσιών, καθώς και η επίδρασή τους στην κινητική του κυτταρικού κύκλου, μπορούν να επηρεάσουν τον βέλτιστο χρόνο για την ανίχνευση χρωμοσωμικών εκτροπών, πραγματοποιείται μια πρώτη δειγματοληψία και μια δεύτερη δειγματοληψία αργότερα, κατά προσέγγιση 24 και 48 ώρες μετά την αγωγή. Για τις υπόλοιπες δόσεις εκτός από την υψηλότερη, θα πρέπει να πραγματοποιείται μια πρώτη δειγματοληψία 24 ώρες μετά την αγωγή (χρόνος μικρότερος ή ίσος προς τον χρόνο κυτταρικού κύκλου των σπερματογονίων Β, ο οποίος, ως εκ τούτου, βελτιστοποιεί την πιθανότητα καταμέτρησης των πρώτων μεταφάσεων μετά την αγωγή), εκτός εάν είναι γνωστό ότι υπάρχει άλλος καταλληλότερος και αιτιολογημένος χρόνος δειγματοληψίας.

22. Μπορούν να πραγματοποιηθούν δειγματοληψίες και σε άλλες χρονικές στιγμές. Για παράδειγμα, στην περίπτωση χημικών ουσιών που ασκούν επιδράσεις ανεξάρτητες της φάσης S, ίσως είναι καλό να γίνει νωρίτερα η δειγματοληψία (δηλ. σε λιγότερες από 24 ώρες).

23. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σχήμα αγωγής επανειλημμένων δόσεων, όπως π.χ. σε συνδυασμό με δοκιμή σχετικά με άλλη παράμετρο στο πλαίσιο της οποίας χρησιμοποιείται περίοδος χορήγησης 28 ημερών (π.χ. μέθοδος δοκιμών Β.58)· ωστόσο, για την πραγματοποίηση δειγματοληψιών σε διαφορετικούς χρόνους θα απαιτηθεί η χρήση πρόσθετων ομάδων ζώων. Επομένως, η καταλληλότητα ενός τέτοιου χρονοδιαγράμματος πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά κατά περίπτωση.

24. Πριν από την ευθανασία, στα ζώα εγχέεται ενδοπεριτοναϊκώς κατάλληλη δόση χημικής ουσίας αναστολής μετάφασης (π.χ. Colcemid® ή κολχικίνη). Σε κατάλληλη χρονική στιγμή πραγματοποιείται δειγματοληψία στα ζώα. Για τους ποντικούς και τους επίμυες το εν λόγω διάστημα είναι περίπου 3–5 ώρες.

Επίπεδα δόσεων

25. Εάν χρειάζεται προκαταρκτική μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών επειδή δεν υπάρχουν ήδη κατάλληλα δεδομένα για να υποβοηθήσουν την επιλογή δόσεων, η εν λόγω μελέτη θα πρέπει να διεξάγεται στο ίδιο εργαστήριο, με χρήση του ίδιου είδους, φυλής και σχήματος αγωγής όπως στην κύρια μελέτη, σύμφωνα με τις συστάσεις για τη διεξαγωγή μελετών προσδιορισμού εύρους δόσεων (12). Η μελέτη θα πρέπει να αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης (ΜΑΔ), η οποία ορίζεται ως η δόση που επάγει ελαφρές τοξικές επιδράσεις σε σχέση με τη διάρκεια της μελέτης (π.χ. ασυνήθης συμπεριφορά ή ασυνήθεις αντιδράσεις, μικρή μείωση του σωματικού βάρους ή κυτταροτοξικότητα στο αιμοποιητικό σύστημα), αλλά όχι θάνατο ή εκδήλωση πόνου, οδύνης ή αγωνίας που καθιστούν αναγκαία τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία (13).

26. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παράγει ενδείξεις τοξικότητας στα σπερμογονιακά κύτταρα (π.χ. ελάττωση του λόγου των σπερμογονιακών μιτώσεων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση). Η ελάττωση αυτή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 %.

27. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ειδική βιολογική δράση σε χαμηλές, μη τοξικές δόσεις (όπως οι ορμόνες και τα μιτογόνα), καθώς και χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό των τοξικοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις των κριτηρίων καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση.

28. Για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει ομάδα αρνητικών μαρτύρων (παράγραφος 18) και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων, τα οποία κατά κανόνα διαφέρουν κατά έναν συντελεστή ίσο με το 2, αλλά πάντως όχι μεγαλύτερο του 4. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προκαλεί τοξικότητα σε μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών ή με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, η υψηλότερη δόση για εφάπαξ χορήγηση θα πρέπει να είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους. Ωστόσο, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, η ΜΑΔ θα πρέπει να είναι η υψηλότερη χορηγούμενη δόση και τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καλύπτουν το φάσμα από τη μέγιστη δόση μέχρι τη δόση που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Όταν παρατηρείται τοξικότητα στον στοχευόμενο ιστό (δηλ. όρχεις) σε όλα τα ελεγχόμενα επίπεδα δόσεων, συνιστάται η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης με μη τοξικές δόσεις. Οι μελέτες που αποσκοπούν στον πληρέστερο χαρακτηρισμό των ποσοτικών στοιχείων σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης ενδέχεται να απαιτούν πρόσθετες ομάδες δόσης. Για ορισμένα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο) που καλύπτονται από ειδικές απαιτήσεις, αυτά τα όρια μπορεί να διαφέρουν. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί τοξικότητα, θα πρέπει να επιλέγεται η οριακή δόση συν δύο χαμηλότερες δόσεις (όπως περιγράφεται ανωτέρω). Η οριακή δόση για περίοδο χορήγησης 14 ημερών και άνω είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρος/ημέρα, ενώ για περιόδους χορήγησης κάτω των 14 ημερών, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα.

Χορήγηση των δόσεων

29. Κατά τον σχεδιασμό της δοκιμής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Επιτρέπεται επομένως η αιτιολογημένη επιλογή οδών έκθεσης όπως μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, με τοπική εφαρμογή, με υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, από το στόμα (με στοματικό καθετήρα), μέσω της εισπνοής, ή η εμφύτευση. Σε κάθε περίπτωση, η οδός έκθεσης θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής έκθεση του στοχευόμενου ιστού. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται κατά κανόνα, εκτός εάν είναι επιστημονικά αιτιολογημένη, διότι συνήθως δεν αποτελεί σημαντική οδό έκθεσης του ανθρώπου από απόψεως φυσιολογίας. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, ιδίως στην περίπτωση των εφάπαξ δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το διάστημα μεταξύ της κατανάλωσης νερού και τροφής και της δειγματοληψίας να επαρκεί για την ανίχνευση των επιδράσεων (βλ. παράγραφο 33). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στοματικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων όπου επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά μέγιστο όριο 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου (εφόσον το επιτρέπει η νομοθεσία για την καλή μεταχείριση των ζώων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση σταθερού όγκου σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

Παρατηρήσεις

30. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενική κλινική εξέταση και τα κλινικά σημεία να καταγράφονται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, κατά προτίμηση τις ίδιες ώρες και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της μελέτης, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των μελετών επαναλαμβανόμενων δόσεων, και κατά τη θανάτωση. Σε μελέτες διάρκειας τουλάχιστον μίας εβδομάδας, η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωσή νερού θα πρέπει να μετράται σε κάθε αλλαγή νερού και, τουλάχιστον, εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανατηφόρους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από τη λήξη της περιόδου δοκιμής (13).

Παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων

31. Αμέσως μετά την ευθανασία, λαμβάνονται από τον ένα ή και τους δύο όρχεις εναιωρήματα κυττάρων που εκτίθενται σε υποτονικό διάλυμα και μονιμοποιούνται σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα [π.χ. (2) (14) (15)]. Κατόπιν, τα κύτταρα επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζονται (16) (17). Όλες οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να λαμβάνουν έναν κωδικό ώστε η ταυτότητά τους να μην αποκαλύπτεται στον εξεταστή.

Ανάλυση

32. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 200 καλά επιστρωμένες μεταφάσεις (3) (11). Εάν η ιστορική συχνότητα αρνητικών μαρτύρων είναι < 1 %, θα πρέπει να εξετάζονται πάνω από 200 κύτταρα/ζώο ώστε να αυξάνεται η στατιστική ισχύς (3). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι χρώσης που επιτρέπουν τον εντοπισμό του κεντρομεριδίου.

33. Οι χρωμοσωμικού και χρωματιδικού τύπου εκτροπές θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά και να ταξινομούνται σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές). Τα χάσματα θα πρέπει να καταγράφονται αλλά να μη λαμβάνονται υπόψη στον προσδιορισμό τυχόν σημαντικής αύξησης της επίπτωσης των κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο θα πρέπει να διασφαλίζουν τη διενέργεια της ανάλυσης χρωμοσωμικών εκτροπών από επαρκώς καταρτισμένους εξεταστές. Επειδή αναγνωρίζεται ότι οι διαδικασίες ετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών προκαλούν συχνά θραύση ενός ποσοστού μεταφασικών κυττάρων με συνακόλουθη απώλεια χρωμοσωμάτων, τα εξεταζόμενα κύτταρα θα πρέπει να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων τουλάχιστον ίσο με $2n \pm 2$, όπου n είναι ο απλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων για το εξεταζόμενο ζωικό είδος.

34. Παρότι σκοπός της δοκιμής είναι η ανίχνευση δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών, είναι σημαντικό να καταγράφονται οι συχνότητες των πολυπλοειδών κυττάρων και των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα όταν παρατηρούνται τέτοια συμβάντα (βλ. παράγραφο 44).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

35. Τα δεδομένα για κάθε ζώο θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζεται ο αριθμός των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές και ο αριθμός των χρωμοσωμικών εκτροπών ανά κύτταρο. Οι χρωματιδικού και οι χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές, ταξινομημένες σε υποκατηγορίες (ρήξεις, ανταλλαγές), θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά, με τον αριθμό και τη συχνότητα με τα οποία εμφανίζονται στις πειραματικές ομάδες και στις ομάδες μαρτύρων. Τα χάσματα καταγράφονται χωριστά. Η συχνότητα των χασμάτων αναφέρεται αλλά συνήθως δεν περιλαμβάνεται στην ανάλυση της συχνότητας των συνολικών δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών. Αναφέρεται το ποσοστό πολυπλοειδίας και κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα, εφόσον παρατηρούνται.

36. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία (σύμφωνα με την παράγραφο 30).

Κριτήρια αποδοχής

37. Τα ακόλουθα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή μιας δοκιμής.

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας συμφωνεί με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες, τα οποία αναμένεται γενικά να είναι > 0 % και ≤ 1,5 % κύτταρα με χρωμοσωμικές εκτροπές, καθώς και με τα ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τους μάρτυρες, εφόσον υπάρχουν (βλ. παραγράφους 10 και 18).

— Οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες επάγουν αποκρίσεις που συμφωνούν με τα δημοσιευμένα πρότυπα για τα ιστορικά δεδομένα για θετικούς μάρτυρες ή με τη βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για θετικούς μάρτυρες, εφόσον υπάρχει, και προκαλούν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (βλ. παραγράφους 17, 18).

— Αναλύεται επαρκής αριθμός κυττάρων και δόσεων (βλ. παραγράφους 28 και 32).

— Τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης δόσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 25 και 26.

38. Εάν παρατηρηθεί τόσο μίτωση όσο και μείωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο λόγος των σπερμογονιακών μιτώσεων προς την πρώτη και τη δεύτερη μειωτική μετάφαση ως μέτρο της κυτταροτοξικότητας για όλα τα ζώα αγωγής και αρνητικού μάρτυρα σε συνολικό δείγμα 100 διαιρούμενων κυττάρων ανά ζώο. Εφόσον παρατηρείται μόνο μίτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο μιτωτικός δείκτης σε 1 000 τουλάχιστον κύτταρα για κάθε ζώο.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

39. Προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν δόσεις.

40. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν:

— τουλάχιστον σε μία από τις δόσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— η αύξηση σχετίζεται με τη δόση σε τουλάχιστον έναν χρόνο δειγματοληψίας, και

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή της κατανομής των ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακά κύτταρα των πειραματόζωων. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν επίσης διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (11) (18). Η πειραματική μονάδα στις χρησιμοποιούμενες στατιστικές δοκιμασίες θα πρέπει να είναι το ζώο.

41. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν:

— σε καμία από τις δόσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

— δεν υφίσταται αύξηση που σχετίζεται με τις δόσεις σε καμία πειραματική συνθήκη, και

— όλα τα αποτελέσματα εμπίπτουν στο αποδεκτό πεδίο τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson), εφόσον υπάρχουν.

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στα σπερμογονιακά κύτταρα των πειραματόζωων. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν επίσης διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (11) (18). Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει το ενδεχόμενο η χημική ουσία να επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε μεταγενέστερες φάσεις ανάπτυξης που δεν έχουν μελετηθεί, να επάγει ή γονιδιακές μεταλλάξεις.

42. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποκρίσεων.

43. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, και προκειμένου να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος (π.χ. ασθενής ή οριακή αύξηση), τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση ειδικών και/ή με περαιτέρω διερεύνηση με χρήση των υπαρχόντων πειραματικών δεδομένων, όπως το κατά πόσον το θετικό αποτέλεσμα είναι εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών των δεδομένων αρνητικού μάρτυρα, ή των ιστορικών δεδομένων αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου (19).

44. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και, κατά συνέπεια, η έκβαση κρίνεται αμφίβολη.

45. Η αύξηση του αριθμού πολυπλοειδών κυττάρων μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να αναστέλλει τις μιτωτικές διεργασίες και να επάγει αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές (20). Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα ενδέχεται να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (21) (22), δηλαδή να δρα μέσω ενός μηχανισμού επαγωγής αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλαγών διαφορετικού από την αναστολή των μιτωτικών διεργασιών (βλ. παράγραφο 2). Επομένως, η επίπτωση των πολυπλοειδών κυττάρων και των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα θα πρέπει να καταγράφεται χωριστά.

Έκθεση δοκιμής

46. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Συνοπτική παρουσίαση.

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές·

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα·

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα.

— σκευάσματα για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής,

— αναλυτικοί προσδιορισμοί στα σκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις), όταν έχουν διενεργηθεί.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης του/της,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— μέθοδος ατομικής ταυτοποίησης των ζώων,

— για βραχυπρόθεσμες μελέτες: βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής, για μελέτες διάρκειας μεγαλύτερης της μίας εβδομάδας: βάρος κάθε ζώου κατά τη διάρκεια της μελέτης και κατανάλωση τροφής. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται το εύρος τιμών, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— δεδομένα για τους θετικούς μάρτυρες και τους αρνητικούς μάρτυρες με φορέα/διαλύτη,

— δεδομένα από τη μελέτη προσδιορισμού εύρους τιμών, εάν πραγματοποιήθηκε,

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης,

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— αιτιολογία του χρονικού σημείου της θανάτωσης,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων, εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικών ή αιματολογικών αναλύσεων και της συχνότητας με την οποία πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ή μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων,

— μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έφτασε στον στοχευόμενο ιστό ή εισήλθε στη γενική κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά,

— πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, κατά περίπτωση,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των χρονοδιαγραμμάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών,

— μέθοδος ευθανασίας,

— μέθοδος αναλγησίας (εάν χρησιμοποιείται),

— διαδικασίες απομόνωσης ιστών,

— ταυτότητα της χημικής ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,

— μέθοδοι ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών,

— κριτήρια για την καταμέτρηση των εκτροπών,

— αριθμός εξεταισθέντων κυττάρων ανά ζώο,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή αμφίβολης.

Αποτελέσματα:

— κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας,

— βάρη σώματος και οργάνων κατά τη θανάτωση (σε περίπτωση εφαρμογής πολλαπλών αγωγών, τα βάρη σώματος που μετρήθηκαν στη διάρκεια του σχήματος αγωγής),

— σημεία τοξικότητας,

— μιτωτικός δείκτης,

— λόγος σπερμογονιακών κυττάρων μιτώσεων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση, ή άλλα αποδεικτικά στοιχεία έκθεσης στον στοχευόμενο ιστό,

— τύπος και αριθμός εκτροπών, χωριστά για κάθε ζώο,

— ολικός αριθμός εκτροπών ανά ομάδα, με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— αριθμός κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα, με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν,

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι,

— δεδομένα για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες,

— ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις και διάστημα εμπιστοσύνης σε επίπεδο 95 % (εφόσον υπάρχουν) ή δημοσιευμένα ιστορικά δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες που χρησιμοποιούνται για τη δυνατότητα αποδοχής των αποτελεσμάτων της δοκιμής,

— δεδομένα για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες,

— μεταβολές της πλοειδίας, εφόσον παρατηρήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των συχνοτήτων των κυττάρων με πολυπλοειδία και/ή ενδοαναδιπλασιασμό.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Στο: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Στο: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Στο: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων κατά ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Κεντρομερίδιο: περιοχή του χρωμοσώματος με την οποία συνδέονται τα νημάτια της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, με στόχο την οργανωμένη κίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Πολυμορφία των χρωμοσωμάτων: η πολυμορφία των σχημάτων (π.χ. μετακεντρικά, ακροκεντρικά κ.λπ.) και των μεγεθών των χρωμοσωμάτων.

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματίδων ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματίδων.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εκδηλώνεται ως ρήξη ή ρήξη και επανένωση και των δύο χρωματίδων στην ίδια θέση.

Κλαστογόνο: κάθε χημική ουσία που προκαλεί δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε πληθυσμούς κυττάρων ή οργανισμών.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη αποστοίχιση των χρωματιδών.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει τους παράγοντες που προκαλούν κάθε είδους βλάβη του DNA ή του χρωμοσώματος, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις απαλείψεις, τις χημικές προσθήκες, τις τροποποιήσεις και συνδέσεις νουκλεοτιδίων, τις αναδιατάξεις, τις μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Μιτωτικός δείκτης (Mitotic index/MI): ο λόγος του αριθμού κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού πολλαπλασιασμού του εν λόγω πληθυσμού.

Μίτωση: διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα, η οποία συνήθως χωρίζεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Μεταλλαξιογόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων αλληλουχιών ζευγών βάσεων του DNA σε γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Αριθμητική ανωμαλία: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιουμένων ζώων.

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (*n*) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλαδή 3*n*, 4*n* κ.ο.κ.).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκοπική εξέταση του σταδίου της μετάφασης της κυτταρικής διαίρεσης και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ανταλλαγών.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά»

5) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.40 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.40 **ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ IN VITRO: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 430 του ΟΟΣΑ (2015). Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα, που εκδηλώνεται με τη μορφή ορατής νέκρωσης καθ' όλο το πάχος της επιδερμίδας και μέχρι το χόριο, μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας [όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών (GHS) (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1])]. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.40 περιλαμβάνει *in vitro* διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ (1) και τον κανονισμό CLP.

2. Η εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα πραγματοποιείται κατά κανόνα με τη χρήση πειραματόζωων (μέθοδος δοκιμών Β.4, ισοδύναμη με την TG 404 του ΟΟΣΑ που εγκρίθηκε αρχικά το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) (2). Πέραν της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.40, και άλλες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* για τον έλεγχο του δυναμικού δερματικής διάβρωσης των χημικών ουσιών έχουν επικυρωθεί και εγκριθεί ως μέθοδος δοκιμών ΤΜ Β.40α (ισοδύναμη με την TG 431 του ΟΟΣΑ) (3) και μέθοδος δοκιμών Β.65 (ισοδύναμη με την TG 435 του ΟΟΣΑ) (4), οι οποίες μπορούν επίσης να προσδιορίζουν υποκατηγορίες διαβρωτικών χημικών ουσιών, όταν απαιτείται. Αρκετές επικυρωθείσες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* έχουν εγκριθεί ως μέθοδος δοκιμών Β.46 [ισοδύναμη με την TG 439 του ΟΟΣΑ (5)], προς χρήση για τον έλεγχο του ερεθισμού του δέρματος. Σε έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις στη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (ΙΑΤΑ) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με i) τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) μια προτεινόμενη προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (6).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «διάβρωση του δέρματος». Βασίζεται στη μέθοδο δοκιμών διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε δέρμα επίμυος, κατά την οποία χρησιμοποιούνται δίσκοι δέρματος για τον προσδιορισμό των διαβρωτικών ουσιών με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν απώλεια της φυσιολογικής ακεραιότητας και της λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στιβάδας. Η αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ εγκρίθηκε αρχικά το 2004 και επικαιροποιήθηκε το 2015 ώστε να παραπέμπει στο έγγραφο καθοδήγησης ΙΑΤΑ.

4. Για να αξιολογηθούν οι δοκιμές *in vitro* διάβρωσης του δέρματος για κανονιστικούς σκοπούς, διενεργήθηκαν προεπικυρωτικές μελέτες (7), ακολουθούμενες από επίσημη μελέτη επικύρωσης της μεθόδου δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος για την αξιολόγηση της διάβρωσης του δέρματος (8) (9) (10) (11). Το αποτέλεσμα των εν λόγω μελετών οδήγησε στη διατύπωση σύστασης σύμφωνα με την οποία η μέθοδος δοκιμών TER (που χαρακτηρίστηκε επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς – VRM) μπορεί να χρησιμοποιείται για κανονιστικούς σκοπούς για την αξιολόγηση της *in vivo* διαβρωτικότητας στο δέρμα (12) (13) (14).

5. Για να καταστεί δυνατή η χρήση μιας παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών *in vitro* TER για τη διάβρωση του δέρματος, διαφορετική από την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αξιοπιστία, η καταλληλότητα (ορθότητα) και οι περιορισμοί της σε σχέση με την προτεινόμενη χρήση της, ούτως ώστε να διασφαλίζεται η ομοιότητά της με την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων επιδόσεων (PS) (15). Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων του ΟΟΣΑ θα διασφαλίζεται μόνον αφού τυχόν προτεινόμενη νέα ή επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών που συμμορφώνεται με τα πρότυπα επιδόσεων επανεξεταστεί και συμπεριληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ.

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Σε μελέτη επικύρωσης (10) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (16) (17) έχει αναφερθεί ότι η μέθοδος δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος είναι ικανή να διακρίνει μεταξύ των γνωστών διαβρωτικών του δέρματος ουσιών και των μη διαβρωτικών ουσιών με συνολική ευαισθησία 94 % (51/54) και ειδικότητα 71 % (48/68) για βάση δεδομένων 122 ουσιών.

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008

8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά τη διάβρωση του δέρματος *in vitro*. Επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και των διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP. Ένας περιορισμός της παρούσας μεθόδου δοκιμών, όπως αποδεικνύεται βάσει των μελετών επικύρωσης (8) (9) (10) (11), είναι ότι δεν επιτρέπει την κατάταξη των διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σε υποκατηγορίες σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP. Ο τρόπος χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών καθορίζεται βάσει του ισχύοντος κανονιστικού πλαισίου. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον ερεθισμό του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών B.46 αφορά ειδικά τον ερεθισμό του δέρματος *in vitro* (5). Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την ΙΑΤΑ (6).

9. Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών προϊόντων, κυρίως μεμονωμένων ουσιών, η δε εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης περιλαμβάνει 60 ουσίες οι οποίες καλύπτουν με τη σειρά τους ένα ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών (8) (9). Με βάση τα συνολικά διαθέσιμα δεδομένα, η μέθοδος δοκιμών είναι εφαρμοστέα σε ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών και φυσικών καταστάσεων, περιλαμβανομένων υγρών, ημιστερεών, στερεών και κηρών. Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία δοκιμών με κατάλληλα δεδομένα αναφοράς για συγκεκριμένες φυσικές καταστάσεις, θα πρέπει να επισημανθεί ότι κατά την επικύρωση αξιολογήθηκε συγκριτικά μικρός αριθμός κηρών και διαβρωτικών στερεών. Τα υγρά μπορεί να είναι υδατικά ή μη, και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών. Επιπλέον, η παρούσα μέθοδος δοκιμών θεωρείται ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μείγματα κατ' επέκταση της εφαρμοσιμότητάς της σε ουσίες. Εντούτοις, λόγω του γεγονότος ότι τα μείγματα καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών και συστάσεων, καθώς και του ότι οι πληροφορίες σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όταν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων (π.χ. βάσει στρατηγικής όπως προτείνεται από τους Eskes *et al.*, 2012) (18), η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με μελέτες επικύρωσης (8) (9). Παρότι η μέθοδος δοκιμών TER μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται για διάστημα 24 ωρών, κατά μέγιστο όριο, στην επιδερμική επιφάνεια δίσκων δέρματος σε σύστημα δοκιμών αποτελούμενο από δύο διαμερίσματα, όπου οι δίσκοι δέρματος λειτουργούν ως διαχωριστικό στοιχείο μεταξύ των διαμερισμάτων. Οι δίσκοι δέρματος λαμβάνονται από επίμυες ηλικίας 28-30 ημερών που θανατώνονται με ευθανασία. Οι διαβρωτικές χημικές ουσίες προσδιορίζονται βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν απώλεια της φυσιολογικής ακεραιότητας και λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στιβάδας, η οποία μετράται ως μείωση της διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε επίπεδα χαμηλότερα μιας τιμής κατωφλίου (16) (βλ. παράγραφο 32). Για την TER σε δέρμα επιμύων έχει επιλεγεί τιμή αποκοπής 5 kΩ, βάσει σωρείας δεδομένων για ευρύ φάσμα ουσιών, όπου η πλειονότητα των τιμών ήταν είτε σαφώς μεγαλύτερη (συχνά > 10 kΩ) είτε σαφώς μικρότερη (συχνά < 3 kΩ) από την τιμή αυτή (16). Κατά κανόνα, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαβρωτικές σε ζώα, αλλά είναι ερεθιστικές ή μη ερεθιστικές δεν μειώνουν την TER σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτή την τιμή αποκοπής. Επιπλέον, η χρήση άλλων δερματικών παρασκευασμάτων ή άλλου εξοπλισμού ενδέχεται να μεταβάλει την τιμή αποκοπής, με αποτέλεσμα να χρειάζεται περαιτέρω επικύρωση.

11. Στη διαδικασία της δοκιμής περιλαμβάνεται μια φάση δέσμευσης χρωστικής για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων της TER, συμπεριλαμβανομένων των τιμών γύρω από τα 5 kΩ. Με τη φάση δέσμευσης χρωστικής προσδιορίζεται αν η αύξηση της ιοντικής διαπερατότητας οφείλεται σε φυσική καταστροφή της κεράτινης στιβάδας. Η μέθοδος TER με χρήση δέρματος επίμυος αποδείχθηκε ότι παρέχει πρόβλεψη της διαβρωτικότητας *in vivo* σε κουνέλια, η οποία εκτιμάται με τη μέθοδο δοκιμών B.4 (2).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

12. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη μέθοδο δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος που συμμορφώνεται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις δώδεκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που συνιστώνται στον πίνακα 1. Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον αυτό δικαιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (16)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας (1)

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία (2)	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ / CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* (3)	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro*	Φυσική κατάσταση	pH (4)
Διαβρωτικά *in vivo*						
N,N'-Διμεθυλο-διπροπυλενοτριαμίνη	10563-29-8	οργανική βάση	1A	6 × C	Υ	8,3
1,2-Διαμινοπροπάνιο	78-90-0	οργανική βάση	1A	6 × C	Υ	8,3
Θειικό οξύ (10 %)	7664-93-9	ανόργανο οξύ	(1A/)1B/1C	5 × C1 - × NC	Υ	1,2
Υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 10 %)	1310-58-3	ανόργανη βάση	(1A/)1B/1C	6 × C	Υ	13,2
Οκτανικό (καπρυλικό) οξύ	124-07-2	οργανικό οξύ	1B/1C	4 × C2 - × NC	Υ	3,6
2-tert-Βουτυλοφαινόλη	88-18-6	φαινόλη	1B/1C	4 × C2 - × NC	Υ	3,9
Μη διαβρωτικά *in vivo*						
Ισοστεατικό οξύ	2724-58-5	οργανικό οξύ	NC	6 × NC	Υ	3,6
4-Αμινο-1,2,4-τριαζόλιο	584-13-4	οργανική βάση	NC	6 × NC	Σ	5,5
Φαιναιθυλοβρωμίδιο	103-63-9	ηλεκτρονιόφιλο	NC	6 × NC	Υ	3,6
4-(Μεθυλοθειο)-βενζαλδεΰδη	3446-89-7	ηλεκτρονιόφιλο	NC	6 × NC	Υ	6,8
1,9-Δεκαδιένιο	1647-16-1	ουδέτερη οργανική	NC	6 × NC	Υ	3,9
Τετραχλωροαιθυλένιο	127-18-4	ουδέτερη οργανική	NC	6 × NC	Υ	4,5

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, VRM = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, C = διαβρωτικό, NC = μη διαβρωτικό.

(1) Οι ουσίες ελέγχου ικανότητας, ταξινομημένες πρώτα βάσει της διάκρισης διαβρωτικές (C) / μη διαβρωτικές (NC), κατόπιν βάσει υποκατηγορίας διαβρωτικών ουσιών και, στη συνέχεια, βάσει χημικής κατηγορίας, επιλέχτηκαν από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης ECVAM της μεθόδου δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος (8) (9). Εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά, οι ουσίες υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο επίπεδο της καθαρότητας που είχαν κατά την αγορά τους από εμπορική πηγή (8). Η επιλογή περιλάμβανε, στο μέτρο του δυνατού, ουσίες οι οποίες: i) είναι αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων διαβρωτικότητας (π.χ. μη διαβρωτικές, ήπια έως ισχυρά διαβρωτικές) το οποίο η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς είναι ικανή να μετρά ή να προβλέπει, ii) είναι αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιούνται στη μελέτη επικύρωσης, iii) αντικατοπτρίζουν τα χαρακτηριστικά επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, iv) έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές, v) επάγουν οριστικά αποτελέσματα στη μέθοδο δοκιμών *in vivo* αναφοράς, vi) διατίθενται στο εμπόριο, και vii) δεν έχουν απαγορευτικό κόστος απόρριψης.

(2) Η χημική κατηγορία αποδίδεται κατά Barratt *et al.* (8).

(3) Οι αντίστοιχες ομάδες συσκευασίας του ΟΗΕ είναι I, II και III αντίστοιχα για τις κατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP.

(4) Οι τιμές pH ελήφθησαν από Fentem *et al.* (9) και Barratt *et al.* (8).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

13. Υπάρχουν διαθέσιμες τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) για τη μέθοδο δοκιμών διάβρωσης TER σε δέρμα επίμυος (19). Οι μέθοδοι δοκιμών TER σε δέρμα επίμυος που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να εκπληρώνουν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

Ζώα

14. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επίμυες λόγω της ήδη αποδεδειγμένης ευαισθησίας του δέρματός τους σε ουσίες με την παρούσα μέθοδο δοκιμών (12) και διότι είναι η μόνη πηγή δέρματος που έχει επικυρωθεί επίσημα (8) (9). Η ηλικία (όταν λαμβάνεται το δέρμα) καθώς και η φυλή του επίμυος είναι ιδιαίτερα σημαντικοί παράγοντες για να εξασφαλιστεί ότι οι θύλακες των τριχών βρίσκονται στο τελογενές στάδιο, πριν από την έναρξη της ανάπτυξης του τριχώματος του ενήλικου ζώου.

15. Αφαιρείται προσεκτικά με μικρό ψαλίδι το ραχιαίο και λαγόνιο τρίχωμα από νεαρούς (ηλικίας περίπου 22 ημερών) αρσενικούς ή θηλυκούς επίμυες της φυλής Wistar ή συγκρίσιμης ποικιλίας. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα πλένονται προσεκτικά με σφούγγισμα ενώ η αποτριχωμένη περιοχή εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικό διάλυμα (το οποίο περιέχει, επί παραδείγματι, στρεπτομυκίνη, πενικιλλίνη, χλωραμφενικόλη και αμφοτερικίνη σε συγκεντρώσεις κατάλληλες για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης). Τα πειραματόζωα πλένονται εκ νέου με αντιβιοτικά την τρίτη ή τέταρτη ημέρα μετά την πρώτη πλύση και χρησιμοποιούνται εντός 3 ημερών από τη δεύτερη πλύση, αφού έχει αποκατασταθεί η κεράτινη στιβάδα μετά την αφαίρεση του τριχώματος.

Παρασκευή των δίσκων δέρματος

16. Τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία σε ηλικία μεταξύ 28-30 ημερών· η ηλικία είναι κρίσιμης σημασίας. Το ραχιαίο-λαγόνιο δέρμα κάθε ζώου αφαιρείται και απαλλάσσεται από την περίσσεια υποδορίου λίπους με προσεκτική αποκόλλησή του από το δέρμα. Αποκόπτονται δίσκοι δέρματος, διαμέτρου περίπου 20 mm ο καθένας. Το δέρμα μπορεί να αποθηκευτεί πριν από τη χρήση των δίσκων, εφόσον αποδεικνύεται ότι τα σχετικά με τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες δεδομένα είναι ισοδύναμα με αυτά που λαμβάνονται με πρόσφατο δέρμα.

17. Κάθε δίσκος δέρματος τοποθετείται επάνω από ένα από τα άκρα σωλήνα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE), κατά τρόπον ώστε η επιφάνεια της επιδερμίδας να βρίσκεται σε επαφή με τον σωλήνα. Το δέρμα συγκρατείται στη θέση του με τη βοήθεια ελαστικού δακτυλίου ο οποίος στερεώνεται με πίεση στο άκρο του σωλήνα, ενώ η περίσσεια ιστού αποκόπτεται. Στη συνέχεια, η ένωση του ελαστικού δακτυλίου με το άκρο του σωλήνα PTFE στεγανοποιείται με χρήση βαζελίνης. Ο σωλήνας στερεώνεται με ελατηριωτό σφιγκτήρα μέσα σε υποδοχέα που περιέχει διάλυμα θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$) 154 mM (σχήμα 1). Ο δίσκος δέρματος πρέπει να είναι πλήρως βυθισμένος στο διάλυμα $MgSO_4$. Από το δέρμα ενός και μόνο επίμυος μπορούν να ληφθούν μέχρι 10-15 δίσκοι δέρματος. Οι διαστάσεις του σωλήνα και του δακτυλίου φαίνονται στο σχήμα 2.

18. Πριν από την έναρξη των δοκιμών πραγματοποιείται μέτρηση της TER σε δύο δίσκους δέρματος εν είδει διαδικασίας ελέγχου ποιότητας για το δέρμα κάθε ζώου. Αμφότεροι οι δίσκοι πρέπει να εμφανίζουν τιμές ηλεκτρικής αντίστασης μεγαλύτερες των 10 kΩ για να χρησιμοποιηθούν οι υπόλοιποι δίσκοι στη μέθοδο δοκιμών. Εάν η τιμή αντίστασης είναι μικρότερη από 10 kΩ, οι εναπομένοντες δίσκοι από το εν λόγω δέρμα πρέπει να απορρίπτονται.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

19. Πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα), ώστε να εξασφαλίζονται ικανοποιητικές επιδόσεις του πειραματικού μοντέλου. Σε κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δίσκοι δέρματος από ένα μεμονωμένο ζώο. Συνιστάται το υδροχλωρικό οξύ 10 M και το απεσταγμένο νερό για χρήση ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα.

20. Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (150 μL) εφαρμόζονται ομοιόμορφα στην επιδερμική επιφάνεια που βρίσκεται στο εσωτερικό του σωλήνα. Όταν εξετάζονται στερεά υλικά, εφαρμόζεται ομοιόμορφα στον δίσκο επαρκής ποσότητα του στερεού υλικού ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η επιφάνεια της επιδερμίδας. Στη συνέχεια προστίθεται απιονισμένο νερό (150 μL) επάνω στο στερεό υλικό και ο σωλήνας ανακινείται ηπίως. Για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή επαφή με το δέρμα, τα στερεά υλικά ενδέχεται να χρειάζονται θέρμανση στους 30 °C ώστε η υπό δοκιμή χημική ουσία να τηχθεί ή να μαλακώσει, ή λειοτρίβηση ώστε να παραχθεί κοκκώδες υλικό ή σκόνη.

21. Σε κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα), για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για κάθε μάρτυρα χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι δέρματος. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες εφαρμόζονται για 24 ώρες στους 20-23 °C. Η υπό δοκιμή χημική ουσία απομακρύνεται με έκπλυση με εκτόξευση νερού βρύσης σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου να μην είναι δυνατή η απομάκρυνση περαιτέρω υλικού.

Μετρήσεις της TER

22. Η εμπέδηση του δέρματος μετράται ως TER με τη χρήση γέφυρας Wheatstone εναλλασσόμενου ρεύματος χαμηλής τάσης (18). Οι γενικές προδιαγραφές της γέφυρας είναι: τάση λειτουργίας 1-3 Volt, ημιτονοειδές ή ορθογώνιο εναλλασσόμενο ρεύμα 50-1 000 Hz και κλίμακα μέτρησης τουλάχιστον 0,1-30 kΩ. Η γέφυρα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης μετρούσε την επαγωγή, τη χωρητικότητα και την αντίσταση σε επίπεδα τιμών μέχρι 2 000 H, 2 000 μF και 2 MΩ αντιστοίχως, σε συχνότητες 100 Hz ή 1 kHz, με τη χρήση σειριακών ή παραλλήλων τιμών. Για τους σκοπούς της δοκιμής διαβρωτικότητας TER, οι μετρήσεις καταγράφονται ως αντίσταση, σε συχνότητα 100 Hz και με τη χρήση σειριακών τιμών. Πριν από τη μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, ελαττώνεται η επιφανειακή τάση του δέρματος με την προσθήκη αιθανόλης 70 %, στην ποσότητα που απαιτείται για να καλυφθεί η επιδερμίδα. Λίγα δευτερόλεπτα αργότερα, απομακρύνεται η αιθανόλη από τον σωλήνα και ο ιστός ενυδατώνεται με την προσθήκη 3 ml διαλύματος $MgSO_4$ (154 mM). Τα ηλεκτρόδια Databridge τοποθετούνται ανά ένα σε κάθε πλευρά του δίσκου δέρματος για τη μέτρηση της αντίστασης σε kΩ/δίσκο δέρματος (σχήμα 1). Οι διαστάσεις των ηλεκτροδίων και το μήκος του τμήματος του ηλεκτροδίου που μένει ακάλυπτο κάτω από τους σφιγκτήρες δίνονται στο σχήμα 2. Ο σφιγκτήρας του εσωτερικού ηλεκτροδίου ακουμπά στην κορυφή του σωλήνα PTFE κατά τη μέτρηση της αντίστασης, ώστε να εξασφαλίζεται η εμβάπτιση σταθερού τμήματος του ηλεκτροδίου στο διάλυμα $MgSO_4$. Το εξωτερικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται μέσα στον υποδοχέα κατά τρόπο ώστε να ακουμπά στον πυθμένα του. Η απόσταση μεταξύ του ελατηριωτού σφιγκτήρα και του πυθμένα του σωλήνα PTFE διατηρείται σταθερή (σχήμα 2), καθώς αυτό επηρεάζει τη λαμβανόμενη τιμή αντίστασης. Κατά συνέπεια, η απόσταση μεταξύ του εσωτερικού ηλεκτροδίου και του δίσκου δέρματος πρέπει να είναι σταθερή και ελάχιστη (1-2 mm).

23. Εάν η μετρούμενη τιμή αντίστασης υπερβαίνει τα 20 kΩ, αυτό οφείλεται ενδεχομένως σε κατάλοιπα της ελεγχόμενης ουσίας που επικαλύπτουν την επιδερμική επιφάνεια του δίσκου δέρματος. Μπορεί να επιχειρηθεί περαιτέρω απομάκρυνση της εν λόγω επικάλυψης, λόγου χάριν με ανακίνηση του σωλήνα PTFE επί 10 δευτερόλεπτα περίπου αφού κλειστεί το στόμιό του με γαντοφορεμένο δάκτυλο. Το διάλυμα $MgSO_4$ απορρίπτεται και η μέτρηση της αντίστασης επαναλαμβάνεται με νέο διάλυμα $MgSO_4$.

24. Τα χαρακτηριστικά και οι διαστάσεις της χρησιμοποιούμενης συσκευής δοκιμών καθώς και η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία ενδέχεται να επηρεάσουν τις λαμβανόμενες τιμές TER. Το όριο διαβρωτικότητας των 5 kΩ υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα τα οποία ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη συσκευή και διαδικασία που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Σε περίπτωση μεταβολής των συνθηκών της δοκιμής ή χρήσης άλλης συσκευής είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά όρια και διαφορετικές τιμές για τους μάρτυρες. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η βαθμονόμηση των μεθοδολογικών παραγόντων και των τιμών κατωφλίου της αντίστασης, με τη δοκιμή σειράς ουσιών ελέγχου ικανότητας, επιλεγμένων από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (8) (9), ή από κατηγορίες παρόμοιες με αυτές των υπό διερεύνηση ουσιών. Στον πίνακα 1 εμφαίνεται μια σειρά κατάλληλων ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Μέθοδοι δέσμευσης χρωστικής

25. Η έκθεση σε ορισμένα μη διαβρωτικά υλικά μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της αντίστασης κάτω από την τιμή αποκοπής των 5 kΩ, καθώς επιτρέπει τη δίοδο ιόντων διαμέσου της κεράτινης στιβάδας και μειώνει, συνεπώς, την ηλεκτρική αντίσταση (9). Λόγου χάριν, ουδέτερες οργανικές ενώσεις και επιφανειοδραστικές χημικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένων των απορρυπαντικών, των γαλακτωματοποιητών και άλλων επιφανειοδραστικών παραγόντων) μπορούν να απομακρύνουν τα δερματικά λιπίδια, αυξάνοντας τη διαπερατότητα του φραγμού στα ιόντα. Εάν λοιπόν οι τιμές TER που προκύπτουν από τέτοιες χημικές ουσίες είναι μικρότερες των 5 kΩ ή γύρω από αυτή την τιμή και δεν παρατηρείται ορατή βλάβη των δίσκων δέρματος, πρέπει να διενεργείται εκτίμηση της διείσδυσης χρωστικής στους ιστούς μάρτυρες και στους ιστούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή, ώστε να διαπιστώνεται αν οι τιμές TER οφείλονται σε αυξημένη διαπερατότητα ή σε διάβρωση του δέρματος (7) (9). Στη δεύτερη περίπτωση, όπου εμφανίζεται λύση της συνέχειας της κεράτινης στιβάδας, η χρωστική σουλφοροδαμίνη Β διεισδύει γρήγορα και χρωματίζει τον υποκείμενο ιστό εάν απλωθεί στην επιφάνεια του δέρματος. Η συγκεκριμένη χρωστική είναι σταθερή σε ευρύ φάσμα χημικών ουσιών και δεν επηρεάζεται από την κατωτέρω περιγραφόμενη εκχυλιστική διαδικασία.

Εφαρμογή και απομάκρυνση της χρωστικής σουλφοροδαμίνης Β

26. Μετά την εκτίμηση της TER, το θειικό μαγνήσιο αποχύνεται από τον σωλήνα και το δέρμα εξετάζεται προσεκτικά για εμφανείς βλάβες. Εάν δεν υπάρχει εμφανής σοβαρή βλάβη (π.χ. διάτρηση), 150 μl διαλύματος χρωστικής σουλφοροδαμίνης Β (ερυθρά χρωστική Acid Red 52, C.I. 45100, αριθ. CAS 3520-42-1) 10 % κ.ό. σε απεσταγμένο νερό εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια κάθε δίσκου δέρματος για 2 ώρες. Στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος εκπλένονται με νερό βρύσης θερμοκρασίας όχι μεγαλύτερης από τη θερμοκρασία δωματίου για 10 περίπου δευτερόλεπτα, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν πλεονάζουσα/αδέσμευτη χρωστική. Κάθε δίσκος δέρματος αφαιρείταιπροσεκτικά

από τον σωλήνα PTFE και τοποθετείται σε φιαλίδιο (π.χ. γυάλινο φιαλίδιο σπινθηρισμού των 20 ml) που περιέχει απιονισμένο νερό (8 ml). Τα φιαλίδια ανακινούνται ηπίως επί 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν εναπομένουσα αδέσμευτη χρωστική. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση και, στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται και τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 ml διαλύματος δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) 30 % κ.ό. σε απεσταγμένο νερό και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 60 °C.

27. Μετά την επώαση, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται από τα φιαλίδια και απορρίπτονται, ενώ το εναπομένον διάλυμα φυγοκεντρείται επί 8 λεπτά στους 21 °C (σχετική φυγόκεντρος δύναμη ~175 g). Από την υπερκείμενη στιβάδα λαμβάνεται δείγμα 1 ml και αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 5 κ.ό. [1 ml + 4 ml] με διάλυμα SDS 30 % κ.ό. σε απεσταγμένο νερό. Μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύματος σε μήκος κύματος 565 nm.

Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε χρωστική

28. Η περιεκτικότητα κάθε δίσκου σε χρωστική σουλφοροδαμίνη Β υπολογίζεται με βάση τις τιμές OD (9) (μοριακή απορροφητικότητα της σουλφοροδαμίνης Β στα 565 nm = $8,7 \times 10^4$, μοριακό βάρος = 580). Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα κάθε δίσκου δέρματος σε χρωστική με τη χρήση κατάλληλης καμπύλης βαθμονόμησης και στη συνέχεια υπολογίζεται η μέση περιεκτικότητα σε χρωστική για τα πανομοιότυπα δείγματα.

Κριτήρια αποδοχής

29. Οι προκύπτοντες μέσοι όροι TER γίνονται δεκτοί εφόσον οι τιμές για τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα, οι οποίοι ελέγχθηκαν ταυτόχρονα, περικλείονται στα αποδεκτά για τη μέθοδο πεδία τιμών στο εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή. Τα αποδεκτά πεδία τιμών αντίστασης, για τη μεθοδολογία και τη συσκευή που περιγράφονται ανωτέρω, παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (kΩ)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 10M	0,5 - 1,0
Αρνητικός	Απεσταγμένο νερό	10 - 25

30. Οι προκύπτουσες μέσες τιμές δέσμευσης χρωστικής γίνονται δεκτές εφόσον οι τιμές για τους μάρτυρες, οι οποίοι ελέγχθηκαν ταυτόχρονα, περικλείονται στα αποδεκτά για τη μέθοδο πεδία τιμών. Τα υποδεικνυόμενα αποδεκτά πεδία τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική για τις ουσίες μάρτυρες, για τη μεθοδολογία και τη συσκευή που περιγράφονται ανωτέρω, παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική (μg/δίσκο)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 10M	40 - 100
Αρνητικός	Απεσταγμένο νερό	15 - 35

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

31. Η τιμή αποκοπής TER, η οποία αποτελεί το μέτρο διάκρισης μεταξύ διαβρωτικών και μη διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθορίστηκε κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου δοκιμών, ελέγχθηκε κατά τη διάρκεια μιας προεπικυρωτικής φάσης και επιβεβαιώθηκε σε επίσημη μελέτη επικύρωσης.

32. Το μοντέλο πρόβλεψης για τη μέθοδο δοκιμών διάβρωσης του δέρματος επίμυος TER (9) (19), που σχετίζεται το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, δίνεται παρακάτω:

Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται μη διαβρωτική για το δέρμα εάν:

i) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή ουσία είναι μεγαλύτερη (>) των 5 kΩ, ή

ii) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή ουσία είναι μικρότερη ή ίση (≤) των 5 kΩ, και

— οι δίσκοι δέρματος δεν παρουσιάζουν εμφανή βλάβη (π.χ. διάτρηση), και

— η μέση περιεκτικότητα των δίσκων σε χρωστική είναι μικρότερη (<) της μέσης περιεκτικότητας που λαμβάνεται ταυτόχρονα με τον θετικό μάρτυρα HCl 10M (βλ. παράγραφο 30 για τις τιμές θετικού μάρτυρα).

Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται διαβρωτική για το δέρμα εάν:

i) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή χημική ουσία είναι μικρότερη ή ίση (≤) των 5 kΩ και οι δίσκοι δέρματος παρουσιάζουν εμφανή βλάβη (π.χ. διάτρηση), ή

ii) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την υπό δοκιμή ουσία είναι μικρότερη ή ίση (≤) των 5 kΩ, και

— οι δίσκοι δέρματος δεν παρουσιάζουν εμφανή βλάβη (π.χ. διάτρηση) αλλά

— η μέση περιεκτικότητα των δίσκων σε χρωστική είναι μεγαλύτερη ή ίση (≥) της μέσης περιεκτικότητας που λαμβάνεται ταυτόχρονα με τον θετικό μάρτυρα HCl 10M (βλ. παράγραφο 30 για τις τιμές θετικού μάρτυρα).

33. Για υπό δοκιμή χημική ουσία της οποίας η ταξινόμηση δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αναμένεται να αρκεί μία μόνο σειρά δοκιμών (πείραμα) με τουλάχιστον τρεις πανομοιότυπους δίσκους δέρματος. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως π.χ. σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων των πανομοιότυπων δειγμάτων και/ή με μέση τιμή TER ίση με 5 ± 0,5 kΩ, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης ανεξάρτητης σειράς δοκιμών (πείραμα), ή ακόμη και τρίτης σειράς σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών δοκιμών (πειραμάτων).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

34. Οι τιμές αντίστασης (kΩ) και οι τιμές περιεκτικότητας σε χρωστική (μg/δίσκο), κατά περίπτωση, για την υπό δοκιμή χημική ουσία, καθώς και για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να αναφέρονται υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένων δεδομένων για κάθε μεμονωμένο πανομοιότυπο δίσκο σε κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα) και των μέσων τιμών ± SD. Κάθε επανάληψη πειράματος θα πρέπει να αναφέρεται. Η παρατηρούμενη βλάβη στους δίσκους δέρματος θα πρέπει να αναφέρεται για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Έκθεση δοκιμής

35. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Πειραματόζωα:

— χρησιμοποιούμενη φυλή και φύλο,

— ηλικία των ζώων όταν χρησιμοποιήθηκαν ως ζώα δότες,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— λεπτομέρειες για το δερματικό παρασκεύασμα.

Συνθήκες δοκιμής:

— καμπύλες βαθμονόμησης της συσκευής της δοκιμής,

— καμπύλες βαθμονόμησης για την εκτέλεση της δοκιμής δέσμευσης χρωστικής, ζώνη διάβασης που εφαρμόστηκε για τη μέτρηση των τιμών OD, και γραμμική κλίμακα τιμών OD της συσκευής μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο), ανάλογα με την περίπτωση,

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών που εφαρμόστηκε για τις μετρήσεις της TER,

— κατά περίπτωση, λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών που εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της δέσμευσης χρωστικής,

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις δοκιμής, διάρκεια περιόδου/-ων έκθεσης και θερμοκρασία/-ες έκθεσης,

— λεπτομέρειες της διαδικασίας πλύσης που εφαρμόστηκε μετά την περίοδο έκθεσης,

— αριθμός πανομοιότυπων δίσκων δέρματος που χρησιμοποιήθηκαν ανά χημική ουσία και μάρτυρα δοκιμής (θετικός και αρνητικός μάρτυρας),

— περιγραφή τυχόν τροποποίησης της διαδικασίας δοκιμών,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

i) Δυνατότητα αποδοχής των τιμών TER αρνητικού και θετικού μάρτυρα (σε kl) με παραπομπή στα πεδία τιμών αντίστασης θετικού και αρνητικού μάρτυρα

ii) Δυνατότητα αποδοχής των τιμών περιεκτικότητας αρνητικού και θετικού μάρτυρα σε χρωστική (σε μg/δίσκο) με παραπομπή στα πεδία τιμών περιεκτικότητας θετικού και αρνητικού μάρτυρα σε χρωστική

iii) Δυνατότητα αποδοχής των αποτελεσμάτων της δοκιμής με παραπομπή στην ιστορική διακύμανση μεταξύ των πανομοιότυπων δίσκων δέρματος

— Περιγραφή των κριτηρίων απόφασης/μοντέλου πρόβλεψης που εφαρμόστηκαν.

Αποτελέσματα:

— καταχώριση σε πίνακα των δεδομένων από τις δοκιμές TER και δέσμευσης χρωστικής (ανάλογα με την περίπτωση) για μεμονωμένες υπό δοκιμή χημικές ουσίες και μάρτυρες, για κάθε σειρά δοκιμών (πείραμα) και κάθε πανομοιότυπο δίσκο δέρματος (μεμονωμένα ζώα και μεμονωμένα δείγματα δέρματος), μέσες τιμές, SD και CV,

— περιγραφή κάθε επίδρασης που παρατηρήθηκε,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης και/ή των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(3) Κεφάλαιο B.40α του παρόντος παραρτήματος: Μοντέλο δέρματος *in vitro*.

(4) Κεφάλαιο B.65 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης *in vitro*.

(5) Κεφάλαιο B.46 του παρόντος παραρτήματος: Δερματικός ερεθισμός *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(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), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 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. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

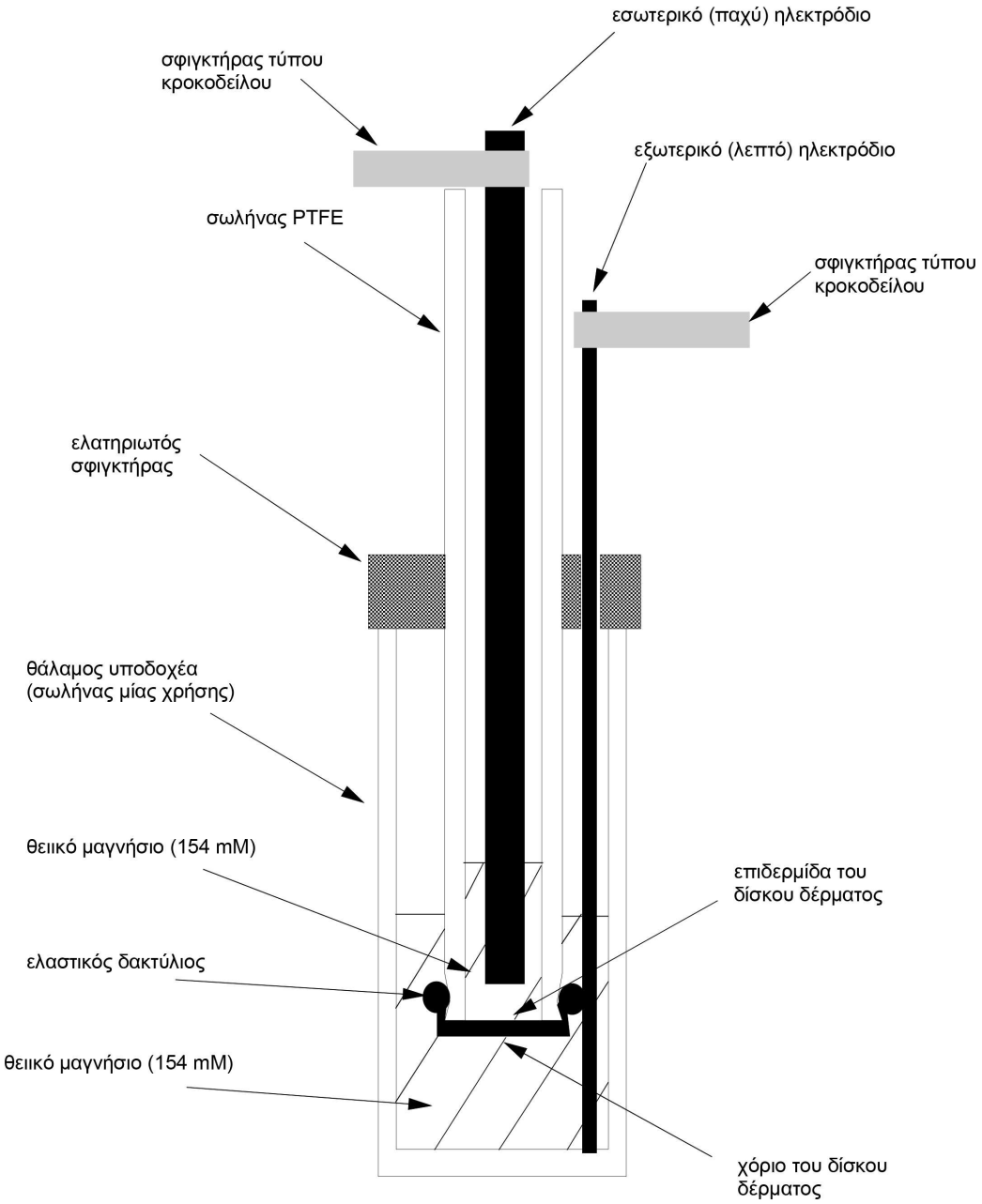
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

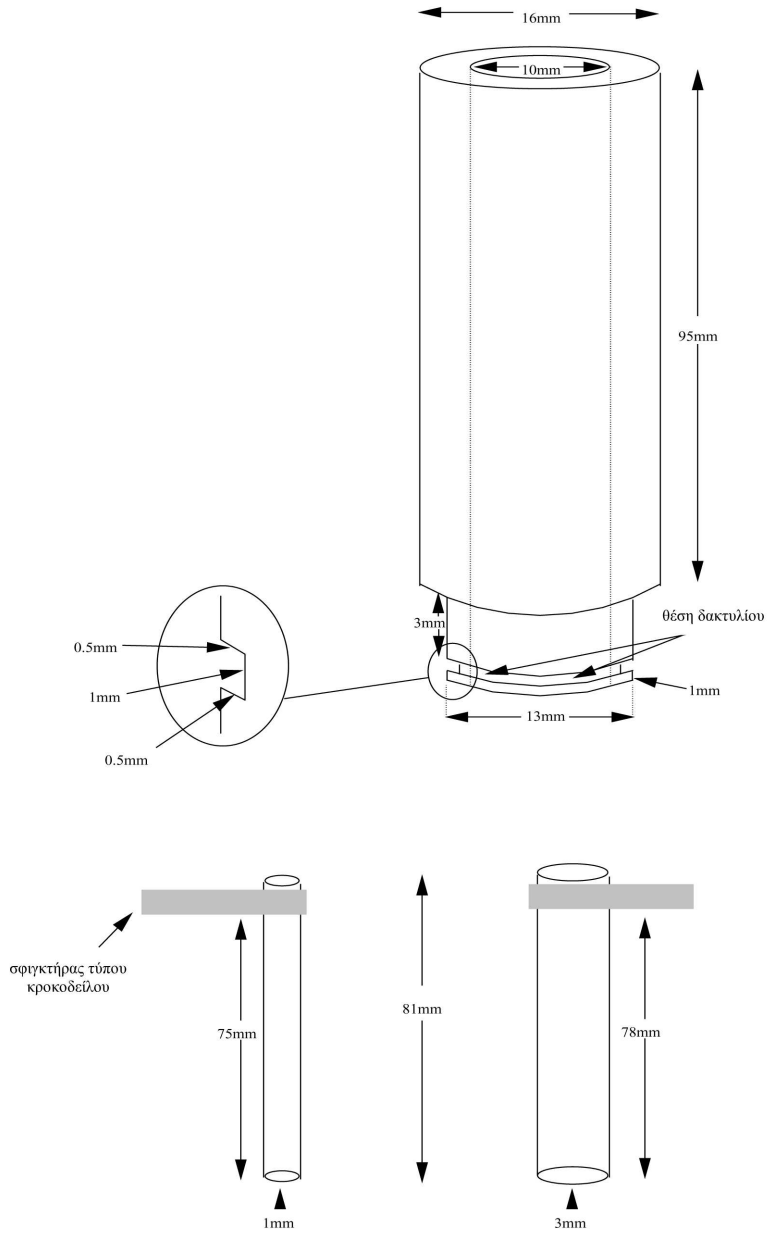
Σχημα 1

Συσκευη για τη Δοκιμη ter σε Δερμα Επιμυοσ



Σχημα 2

Διαστασεισ του Σωληνα Πολυτετραφθοροαιθυλενιου (PFTE), του Υποδοχεα και των Ηλεκτροδιων που Χρησιμοποιηθηκαν



Κρίσιμοι παράγοντες στην ανωτέρω συσκευή:

— η εσωτερική διάμετρος του σωλήνα PTFE,

— το μήκος των ηλεκτροδίων σε σχέση με τον σωλήνα PTFE και τον υποδοχέα, ώστε ο δίσκος δέρματος να μην ακουμπά στα ηλεκτρόδια και ένα σταθερού μήκους τμήμα ηλεκτροδίου να βρίσκεται σε επαφή με το διάλυμα $MgSO_4$,

— η ποσότητα διαλύματος $MgSO_4$ στον υποδοχέα πρέπει να εξασφαλίζει βάθος του υγρού, σε σχέση με τη στάθμη του στον σωλήνα PFTE, όπως εμφαίνεται στο σχήμα 1,

— ο δίσκος δέρματος πρέπει να στερεώνεται ικανοποιητικά στον σωλήνα PFTE, ώστε η ηλεκτρική αντίσταση να αποτελεί πραγματικό μέτρο των ιδιοτήτων του δέρματος.

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: Ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (20).

C: Διαβρωτικό

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (20).

GHS [Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals – Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων (ΟΗΕ)]: σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση).

Μείγμα: Ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NC: Μη διαβρωτικό.

OD: Οπτική πυκνότητα.

PC: Θετικός μάρτυρας, πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και iii) τα ανάλογα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελάχιστων ουσιών αναφοράς.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της μεθόδου δοκιμών με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η μέθοδος δοκιμών μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (20).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (20).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (20).

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (20).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Σειρά (δοκιμών): δοκιμή μιας μεμονωμένης χημικής ουσίας σε τουλάχιστον τρεις πανομοιότυπους δίσκους δέρματος.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER): μέτρο της ηλεκτρικής σύνθετης αντίστασης (εμπέδησης) του δέρματος, σε μονάδες αντίστασης kΩ. Πρόκειται για απλή και αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της λειτουργίας φραγμού, με καταγραφή της διόδου ιόντων μέσω του δέρματος με τη βοήθεια συσκευής που λειτουργεί με γέφυρα Wheatstone.

UVCB: Ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.»

6) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.40α αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.40α **ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ (RhE)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 431 του ΟΟΣΑ (2016). Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα που εκδηλώνεται με τη μορφή ορατής νέκρωσης που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας [όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1])]. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.40α περιλαμβάνει διαδικασία *in vitro* που επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Επιτρέπει επίσης τη μερική ταξινόμηση των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες.

2. Η εκτίμηση της διαβρωτικότητας χημικών ουσιών στο δέρμα πραγματοποιείται κατά κανόνα με τη χρήση πειραματόζωων (μέθοδος δοκιμών Β.4, ισοδύναμη με την TG 404 του ΟΟΣΑ, η οποία εγκρίθηκε αρχικά το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) (2). Πέραν της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.40α έχουν επικυρωθεί και εγκριθεί άλλες δύο μέθοδοι δοκιμών *in vitro* για τον έλεγχο της διαβρωτικότητας χημικών ουσιών στο δέρμα, ως μέθοδος δοκιμών Β.40 (ισοδύναμη με την TG 430 του ΟΟΣΑ) (3) και μέθοδος δοκιμών Β.65 (ισοδύναμη με την TG 435 του ΟΟΣΑ) (4). Επιπλέον, η μέθοδος δοκιμών *in vitro* Β.46 (ισοδύναμη με την TG 439 του ΟΟΣΑ) (5) έχει εγκριθεί για τον έλεγχο του δυναμικού ερεθισμού του δέρματος. Σε έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις στη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με i) τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) μια προτεινόμενη προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (6).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «διάβρωση του δέρματος». Χρησιμοποιεί ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE) (που λαμβάνεται από μη μετασχηματισμένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης) η οποία μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις ιστολογικές, μορφολογικές, βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Η αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ εγκρίθηκε αρχικά το 2004, επικαιροποιήθηκε το 2013 προκειμένου να συμπεριλάβει πρόσθετες μεθόδους δοκιμών στις οποίες χρησιμοποιείται το μοντέλο RhE και να δοθεί η δυνατότητα χρήσης των μεθόδων αυτών για την υποστήριξη της ταξινόμησης των διαβρωτικών χημικών ουσιών σε υποκατηγορίες, και επικαιροποιήθηκε και το 2015 προκειμένου να περιλαμβάνει αναφορά στο έγγραφο καθοδήγησης IATA και να εισαγάγει τη χρήση εναλλακτικής διαδικασίας για τη μέτρηση της βιωσιμότητας.

4. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνονται τέσσερα επικυρωμένα και διαθέσιμα στο εμπόριο μοντέλα RhE. Προεπικυρωτικές μελέτες (7), ακολουθούμενες από επίσημη μελέτη επικύρωσης για την αξιολόγηση της διάβρωσης του δέρματος (8)(9)(10), διενεργήθηκαν (11) (12) για δύο από αυτά τα διαθέσιμα στο εμπόριο μοντέλα δοκιμών, το τυποποιημένο μοντέλο EpiSkin™ και τη δοκιμή διαβρωτικότητας στο δέρμα EpiDerm™ (EPI-200) (στο κείμενο που ακολουθεί αναφέρονται ως «επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς», VRM). Το αποτέλεσμα των εν λόγω μελετών είχε ως αποτέλεσμα να διατυπωθεί σύσταση περί της δυνατότητας χρήσης των δύο αυτών VRM για κανονιστικούς σκοπούς για τη διάκριση των διαβρωτικών (C) από τις μη διαβρωτικές (NC) ουσίες, και περί της δυνατότητας επιπλέον χρήσης του EpiSkin™ με σκοπό την υποστήριξη της ταξινόμησης των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες (13)(14)(15). Δύο ακόμη διαθέσιμα στο εμπόριο μοντέλα δοκιμών RhE *in vitro* έχουν δώσει αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς EpiDerm™ κατόπιν επικύρωσης βάσει προτύπων επιδόσεων (16)(17)(18). Αυτά είναι το SkinEthic™ RHE ([2]) και το epiCS® (πρώην EST-1000), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κανονιστικούς σκοπούς για τη διάκριση των διαβρωτικών από τις μη διαβρωτικές ουσίες (19)(20). Στο πλαίσιο μετεπικυρωτικών μελετών που διενήργησαν οι παραγωγοί του μοντέλου RhE τα έτη 2012 έως 2014 με χρήση εξελιγμένου πρωτοκόλλου διόρθωσης της παρεμποδιστικής δράσης μη ειδικής αναγωγής MTT από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες βελτιώθηκαν οι επιδόσεις τόσο ως προς τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ C και NC όσο και ως προς την υποστήριξη της ταξινόμησης των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες (21)(22). Διενεργήθηκαν περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις των μετεπικυρωτικών δεδομένων που ελήφθησαν με τα EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και EpiCS® για τον προσδιορισμό εναλλακτικών μοντέλων πρόβλεψης που βελτίωσαν την ικανότητα πρόβλεψης ως προς την ταξινόμηση σε υποκατηγορίες (23).

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008

([2]) Το αρκτικόλεξο RhE (=Reconstructed human Epidermis, ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα) χρησιμοποιείται για όλα τα μοντέλα που βασίζονται στην τεχνολογία RhE. Το αρκτικόλεξο RHE, όπως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το μοντέλο SkinEthic™, έχει την ίδια σημασία, αλλά, ως μέρος του ονόματος της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμών, όπως αυτή διατίθεται στο εμπόριο, γράφεται ολόκληρο με κεφαλαία γράμματα.

5. Για να καταστεί δυνατή η χρήση μιας παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών *in vitro* RhE για τη διάβρωση του δέρματος, διαφορετική από τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αξιοπιστία, η καταλληλότητα (ορθότητα) και οι περιορισμοί της σε σχέση με την προτεινόμενη χρήση της, ούτως ώστε να διασφαλίζεται η ομοιότητά της με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων επιδόσεων (PS) (24) που καθορίζονται σύμφωνα με τις αρχές του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 34 του ΟΟΣΑ (25). Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων θα διασφαλίζεται μόνο αφού μια προτεινόμενη νέα ή επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών που συμμορφώνεται με τα πρότυπα επιδόσεων επανεξεταστεί και συμπεριληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών. Τα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην εν λόγω κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών με μεθόδους *in vitro* για τη διάβρωση του δέρματος, ενώ αξιοποιείται παράλληλα η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων.

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και των διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Υποστηρίζει επίσης την ταξινόμηση των διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων στην προαιρετική υποκατηγορία 1A, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ (1), καθώς και σε συνδυασμό των υποκατηγοριών 1B και 1C (21)(22)(23). Ένας περιορισμός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι ότι δεν επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των υποκατηγοριών διαβρωτικών 1B και 1C, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP, λόγω του περιορισμένου αριθμού γνωστών διαβρωτικών χημικών ουσιών *in vivo* που ανήκουν στην υποκατηγορία 1C. Τα μοντέλα δοκιμών EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS® παρέχουν τη δυνατότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες (δηλαδή 1A έναντι 1B+1C έναντι NC)

8. Ευρύ φάσμα χημικών ουσιών που αντιπροσωπεύουν κυρίως μεμονωμένες ουσίες έχουν υποβληθεί σε δοκιμή στο πλαίσιο της επικύρωσης και υποστηρίζουν τα μοντέλα δοκιμών της παρούσας μεθόδου δοκιμών, όταν χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μη διαβρωτικών και των διαβρωτικών ουσιών· η εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης περιλάμβανε 60 χημικές ουσίες που κάλυπταν ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών (8)(9)(10). Προκειμένου να καταδείξουν την ευαισθησία, την ειδικότητα, την ορθότητα και την αναπαραγωγιμότητα στο εργαστήριο της δοκιμής για ταξινόμηση σε υποκατηγορίες, οι φορείς ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών διεξήγαγαν δοκιμές, τα αποτελέσματα των οποίων επανεξέτασε ο ΟΟΣΑ (21) (22) (23). Με βάση τα συνολικά διαθέσιμα δεδομένα, η μέθοδος δοκιμών είναι εφαρμοστέα σε ευρύ φάσμα χημικών κατηγοριών και φυσικών καταστάσεων, περιλαμβανομένων υγρών, ημιστερεών, στερεών και κηρών. Τα υγρά μπορεί να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε συγκεκριμένη κατηγορία υπό δοκιμή χημικών ουσιών, τα εν λόγω μοντέλα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών. Επιπλέον, η παρούσα μέθοδος δοκιμών θεωρείται ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μείγματα κατ' επέκταση της εφαρμοσιμότητάς της σε ουσίες. Εντούτοις, λόγω του γεγονότος ότι τα μείγματα καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών και σύστασης, καθώς και του ότι οι πληροφορίες σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όταν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων [π.χ. βάσει στρατηγικής, όπως προτείνεται στο (26)], η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με μελέτες επικύρωσης (8)(9)(10). Παρότι η τεχνολογία RhE μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

9. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με το άλας φορμαζάνης MTT και υπό δοκιμή χημικές ουσίες ικανές να ανάγουν άμεσα τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT (σε άλας φορμαζάνης MTT) μπορεί να παρεμποδίζουν τις μετρήσεις βιωσιμότητας των ιστών, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις. Το είδος των προσαρμοσμένων μαρτύρων που μπορεί να απαιτούνται ποικίλλει ανάλογα με το είδος της παρεμποδιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της χρησιμοποιούμενης διαδικασίας μέτρησης του άλατος φορμαζάνης MTT (βλ. παραγράφους 25-31).

10. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον ερεθισμό του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών B.46 αφορά ειδικά τον ερεθισμό του δέρματος *in vitro* και βασίζεται στο ίδιο σύστημα δοκιμών RhE, αν και χρησιμοποιεί άλλο πρωτόκολλο (5). Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (6). Η εν λόγω προσέγγιση ΙΑΤΑ περιλαμβάνει την εκτέλεση δοκιμών *in vitro* για διάβρωση του δέρματος (όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο) και ερεθισμό του δέρματος, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών σε ζωντανά ζώα. Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο RhE, το οποίο αποτελείται από μη μεταοχηματισμένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που έχουν καλλιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν πολυστρωματικό μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με υψηλή διαφοροποίηση. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια στρώματα λιπιδίων που αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων, ανάλογα με εκείνα που συναντώνται *in vivo*.

12. Η μέθοδος δοκιμών RhE βασίζεται στην παραδοχή ότι οι διαβρωτικές χημικές ουσίες είναι ικανές να διεισδύουν στην κεράτινη στιβάδα μέσω διάχυσης ή διάβρωσης, και είναι κυτταροτοξικές για τα κύτταρα των υποκείμενων στιβάδων. Η κυτταρική βιωσιμότητα μετράται με βάση την ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο–κυανό του θειαζολυλίου, αριθ. CAS 298-93-1] σε κυανό άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (27). Οι διαβρωτικές χημικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένα κατώφλια (βλ. παραγράφους 35 και 36). Η μέθοδος δοκιμών διάβρωσης του δέρματος βάσει RhE έχει αποδειχθεί ότι παρέχει δυνατότητα πρόβλεψης των διαβρωτικών επιδράσεων που παρατηρούνται στο δέρμα *in vivo* με αξιολόγηση σε κουνέλια, σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών B.4 (2).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

13. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική οποιοδήποτε από τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών RhE που συμμορφώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις δώδεκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 1. Σε περίπτωση χρήσης μιας μεθόδου για ταξινόμηση σε υποκατηγορίες, θα πρέπει επίσης να αποδεικνύεται η ικανότητα ορθής ταξινόμησης σε υποκατηγορίες. Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον αυτό δικαιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (24)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας ([1])

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία ([2])	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ/CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* ([3])	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro* ([4])	Αναγωγικό της MTT ([5])	Φυσική κατάσταση
Διαβρωτικά υποκατηγορίας 1A *in vivo*						
Βρωμοοξικό οξύ	79-08-3	Οργανικό οξύ	1A	(3) 1A	—	Σ
Τριφθοριούχο βόριο διένυδρο	13319-75-0	Ανόργανο οξύ	1A	(3) 1A	—	Υ
Φαινόλη	108-95-2	Φαινόλη	1A	(3) 1A	—	Σ
Χλωριούχο διχλωροακετύλιο	79-36-7	Ηλεκτρονιόφιλο	1A	(3) 1A	—	Υ
Συνδυασμός διαβρωτικών υποκατηγοριών 1B+1C *in vivo*						
Γλυοξυλικό οξύ μονοένυδρο	563-96-2	Οργανικό οξύ	1B+1C	(3) 1B+1C	—	Σ

Ουσία	Αριθμός CAS	Χημική κατηγορία ([2])	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ/CLP βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vivo* ([3])	Κατηγορία VRM βασιζόμενη σε αποτελέσματα *in vitro* ([4])	Αναγωγικό της MTT ([5])	Φυσική κατάσταση
Διαβρωτικά υποκατηγορίας 1A *in vivo*						
Γαλακτικό οξύ	598-82-3	Οργανικό οξύ	1B+1C	(3) 1B+1C	—	Υ
Αιθανολαμίνη	141-43-5	Οργανική βάση	1B	(3) 1B+1C	Ναι	Παχύρρευστο
Υδροχλωρικό οξύ (14,4 %)	7647-01-0	Ανόργανο οξύ	1B+1C	(3) 1B+1C	—	Υ
Μη διαβρωτικά *in vivo*						
Φαιναιθυλοβρωμίδιο	103-63-9	Ηλεκτρονιόφιλο	NC	(3) NC	Ναι	Υ
4-Αμινο-1,2,4-τριαζόλιο	584-13-4	Οργανική βάση	NC	(3) NC	—	Σ
4-(Μεθυλοθειο)-βενζαλδεΰδη	3446-89-7	Ηλεκτρονιόφιλο	NC	(3) NC	Ναι	Υ
Λαυρικό οξύ	143-07-7	Οργανικό οξύ	NC	(3) NC	—	Σ

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, VRM = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, NC = μη διαβρωτικό, S = στερεό, L = υγρό

([1]) Οι ουσίες ελέγχου ικανότητας, ταξινομημένες πρώτα βάσει της διάκρισης διαβρωτικών έναντι μη διαβρωτικών, κατόπιν βάσει υποκατηγορίας διαβρωτικών και, στη συνέχεια, βάσει χημικής κατηγορίας, επιλέχθηκαν μεταξύ των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες επικύρωσης ECVAM EpiSkin™ και EpiDerm™ (8) (9) (10) καθώς και από τις μετεπικυρωτικές μελέτες με βάση δεδομένα που παρείχαν οι φορείς ανάπτυξης των EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ και epiCS® (23). Εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά, οι ουσίες υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο επίπεδο καθαρότητας που είχαν κατά την αγορά τους από εμπορική πηγή (8) (10). Η επιλογή περιλαμβάνει, στο μέτρο του δυνατού, ουσίες οι οποίες: i) είναι αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων διαβρωτικότητας (π.χ. μη διαβρωτικές, ήπια έως ισχυρά διαβρωτικές) το οποίο οι επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς είναι ικανές να μετρούν ή να προβλέπουν, ii) είναι αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιούνται στις μελέτες επικύρωσης, iv) έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές, iv) επάγουν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στην επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, v) επάγουν οριστικά αποτελέσματα στη μέθοδο δοκιμών *in vivo* αναφοράς, vi) διατίθενται στο εμπόριο, και vii) δεν έχουν απαγορευτικό κόστος απόρριψης.

([2]) Η χημική κατηγορία αποδίδεται κατά Barratt *et al.* (8).

([3]) Οι αντίστοιχες ομάδες συσκευασίας του ΟΗΕ είναι I, II και III αντίστοιχα για τις κατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP.

([4]) Οι προβλέψεις των *in vitro* επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς που περιλαμβάνονται στον παρόντα πίνακα ελήφθησαν με τα μοντέλα δοκιμών EpiSkin™ και EpiDerm™ (VRM) με μετεπικυρωτικές δοκιμές που εκτέλεσαν οι φορείς ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών.

([5]) Οι τιμές βιωσιμότητας που ελήφθησαν με τις μελέτες επικύρωσης της διάβρωσης του δέρματος ECVAM δεν διορθώθηκαν ως προς την άμεση αναγωγή της MTT (στις μελέτες επικύρωσης δεν χρησιμοποιήθηκαν αδρανοποιημένοι μάρτυρες). Ωστόσο, τα μετεπικυρωτικά δεδομένα που παρείχαν οι φορείς ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών και τα οποία παρουσιάζονται στον παρόντα πίνακα ελήφθησαν με προσαρμοσμένους μάρτυρες (23).

14. Στο πλαίσιο της διαδικασίας απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών, κατά τις προδιαγραφές του παρασκευαστή του μοντέλου RhE, μετά την παραλαβή τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση της μεθόδου δοκιμών και αφού αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρόλα αυτά, όταν η μέθοδος δοκιμών εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

15. Στη συνέχεια παρατίθεται γενική περιγραφή των στοιχείων και των διαδικασιών των μοντέλων δοκιμών RhE για την αξιολόγηση της διάβρωσης του δέρματος που καλύπτει η παρούσα μέθοδος δοκιμών. Τα μοντέλα RhE που έχουν αναγνωριστεί ως επιστημονικώς έγκυρα για χρήση με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, δηλ. τα μοντέλα EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE και epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), μπορούν να ληφθούν από εμπορικές πηγές. Για τα εν λόγω τέσσερα μοντέλα RhE υπάρχουν διαθέσιμες τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) (34)(35)(36)(37), και τα κύρια στοιχεία των μεθόδων δοκιμών παρουσιάζονται συνοπτικά στο προσάρτημα 2. Κατά την εφαρμογή και τη χρήση ενός εξ αυτών των μοντέλων στο εργαστήριο, συνιστάται να λαμβάνονται υπόψη οι σχετικές τυποποιημένες διαδικασίες. Η διεξαγωγή δοκιμών με τα τέσσερα μοντέλα δοκιμών RhE που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών θα πρέπει να εκπληρώνει τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHE

Γενικοί όροι

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μη μετασχηματισμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την ανασύσταση του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά ώστε να δημιουργεί ισχυρό λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού πρέπει να καταδεικνύεται και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}), μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET_{50}) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης (βλ. παράγραφο 18). Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου RhE πρέπει να αποτρέπουν τη διέλευση του υλικού γύρω από την κεράτινη στιβάδα μέχρι τον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο RhE πρέπει να μην έχει μολυνθεί από βακτήρια, ιούς, μυκοπλάσματα ή μύκητες.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

17. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (27). Τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhE ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT, το οποίο εκχυλίζεται στη συνέχεια από τον ιστό με χρήση ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη). Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλ. μικρότερη από 0,1. Το εκχυλιζόμενο άλας φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά είτε με χρήση τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (38). Οι χρήστες του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να προσδιορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα. Τα πεδία τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα για τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών RhE που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 2. Ένας χρήστης HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θα πρέπει να χρησιμοποιεί τα πεδία τιμών OD αρνητικού μάρτυρα που φαίνονται στον πίνακα 2 ως κριτήριο αποδοχής για τον αρνητικό μάρτυρα. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (οι μετρήσεις OD παρέχουν παραπλήσιες τιμές) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης.

Πίνακας 2

Πεδία τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μαρτύρα για τον έλεγχο της ποιότητας της παρτίδας

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
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

Λειτουργία φραγμού

18. Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης (π.χ. SDS ή Triton X-100), όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC_{50} ή ET_{50} (πίνακας 3). Η φραγματική λειτουργία κάθε παρτίδας του μοντέλου RhE θα πρέπει να καταδεικνύεται από τον φορέα ανάπτυξης/πωλητή του μοντέλου RhE κατά την προμήθεια των ιστών στον τελικό χρήστη (βλ. παράγραφο 21).

Μορφολογία

19. Το μοντέλο RhE πρέπει να υποβάλλεται σε ιστολογική εξέταση από την οποία να προκύπτει πολυστρωματική δομή όμοια με αυτή της ανθρώπινης επιδερμίδας, που να περιλαμβάνει βασική, ακανθώδη, κοκκώδη και κεράτινη στιβάδα, και από την οποία να προκύπτουν λιπιδικά χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα της ανθρώπινης επιδερμίδας. Κατά την προμήθεια των ιστών στον τελικό χρήστη, ο φορέας ανάπτυξης/πωλητής του μοντέλου RhE θα πρέπει να παρέχει ιστολογική εξέταση κάθε χρησιμοποιούμενης παρτίδας του εν λόγω μοντέλου από την οποία να προκύπτει κατάλληλη μορφολογία των ιστών (βλ. παράγραφο 21).

Αναπαραγωγιμότητα

20. Οι χρήστες της μεθόδου δοκιμών πρέπει να καταδεικνύουν τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων δοκιμών με τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες. Επιπλέον, η μέθοδος δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εάν ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE παρέχει στοιχεία βάσει των οποίων προκύπτει η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα με διαβρωτικές και μη διαβρωτικές χημικές ουσίες που προέρχονται π.χ. από τον κατάλογο ουσιών ελέγχου ικανότητας (πίνακας 1). Σε περίπτωση χρήσης μεθόδου δοκιμών για ταξινόμηση σε υποκατηγορίες, θα πρέπει επίσης να αποδεικνύεται η αναπαραγωγιμότητα όσον αφορά την ικανότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες.

Έλεγχος ποιότητας

21. Το μοντέλο RhE θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη *βιωσιμότητα* (παράγραφος 17), τη *λειτουργία φραγμού* (παράγραφος 18) και τη *μορφολογία* (παράγραφος 19). Τα στοιχεία αυτά γνωστοποιούνται στους χρήστες της μεθόδου δοκιμών ώστε αυτοί να μπορούν να τα συμπεριλάβουν στην έκθεση δοκιμής. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόβλεψη της ταξινόμησης ως προς τη διάβρωση μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με παρτίδες ιστών οι οποίες πληρούν τα κριτήρια ελέγχου ποιότητας. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να προσδιορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τα IC50 ή ET50. Τα πεδία τιμών αποδοχής για τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Κριτήρια ελέγχου ποιότητας για την αποδέσμευση παρτίδων

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM) (αγωγή διάρκειας 18 ωρών με SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 ώρες	ET50 = 8,7 ώρες
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 ώρες	ET50 = 10,0 ώρες
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 ώρες	ET50 = 7,0 ώρες

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών-μαρτύρων

22. Για κάθε χρόνο έκθεσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα ιστών για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τους μάρτυρες. Προκειμένου τόσο για υγρές όσο και για στερεές χημικές ουσίες, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια της επιδερμίδας και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες δόσεις, δηλ. πρέπει να χρησιμοποιούνταιτουλάχιστον

70 μl/cm^2 ή 30 mg/cm^2. Ανάλογα με τα μοντέλα, στην περίπτωση των στερεών χημικών ουσιών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να βελτιώνεται η επαφή της με την υπό δοκιμή χημική ουσία (34)(35)(36)(37). Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Η μέθοδος εφαρμογής θα πρέπει να είναι η κατάλληλη για την υπό δοκιμή χημική ουσία [βλ. π.χ. παραπομπές (34-37)]. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να εκπλένεται επιμελώς από την επιδερμίδα με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με το ποιο από τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών RhE χρησιμοποιείται, ανά υπό δοκιμή χημική ουσία χρησιμοποιούνται δύο ή τρεις περίοδοι έκθεσης (για τα τέσσερα έγκυρα μοντέλα RhE: 3 λεπτά και 1 ώρα· για το EpiSkin™, πρόσθετος χρόνος έκθεσης 4 ωρών). Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο δοκιμών RhE και την περίοδο έκθεσης της αξιολόγησης, η θερμοκρασία επώασης κατά την έκθεση μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ της θερμοκρασίας δωματίου και των 37 °C.

23. Σε κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (PC) για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (με τους αρνητικούς μάρτυρες), η λειτουργία φραγμού και η προκύπτουσα ευαισθησία (με τον PC) των ιστών περιλαμβάνονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών αποδοχής. Οι προτεινόμενες ως θετικοί μάρτυρες χημικές ουσίες είναι το άνυδρο οξικό οξύ και το διάλυμα KOH 8N, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο RhE. Επισημαίνεται ότι το KOH 8N είναι άμεσο αναγωγικό της MTT για το οποίο ενδέχεται να απαιτούνται προσαρμοσμένοι μάρτυρες, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 25 και 26. Ως αρνητικοί μάρτυρες προτείνονται το διάλυμα NaCl 0,9 % κ.ό. ή το νερό.

Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

24. Η δοκιμασία MTT αποτελεί ποσοτική μέθοδο η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών (27). Το δείγμα ιστού φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (0,3 ή 1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τρίωρο. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο κυανό ίζημα φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και η συγκέντρωση της φορμαζάνης μετράται με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ± 30 nm, ή μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. παραγράφους 30 και 31) (38).

25. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία MTT επειδή ανάγουν άμεσα την MTT σε κυανή φορμαζάνη MTT και/ή επειδή δρουν παρεμποδιστικά ως έγχρωμες ουσίες, σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία απορροφά το φως, εκ φύσεως ή λόγω της αγωγής, στο ίδιο φάσμα με τη φορμαζάνη (570 ± 30 nm, κυρίως κυανές και ιώδεις χημικές ουσίες). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση τυχόν παρεμπόδισης από τέτοιες ουσίες, όπως ο μάρτυρας μη ειδικής αναγωγής MTT (NSMTT) και ο μάρτυρας μη ειδικού χρώματος (NSC) (βλ. παραγράφους 26 έως 30). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν μια συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία δεν απομακρύνεται ολοκληρωτικά από τον ιστό μέσω έκπλυσης ή όταν διαπερνά την επιδερμίδα και, ως εκ τούτου, εξακολουθεί να είναι παρούσα στους ιστούς κατά την εκτέλεση της δοκιμής βιωσιμότητας MTT. Ο τρόπος διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των μοντέλων δοκιμών (34)(35)(36)(37).

26. Για τον προσδιορισμό των άμεσων αναγωγικών της MTT, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προστίθεται σε πρόσφατο μέσο MTT (34) (35) (36) (37). Εάν το μείγμα MTT που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι ανάγει άμεσα την MTT και, επομένως, θα πρέπει να διενεργείται περαιτέρω λειτουργικός έλεγχος στη μη βιώσιμη επιδερμίδα, ανεξάρτητα από τη χρήση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) ή της διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας. Σε αυτόν τον πρόσθετο λειτουργικό έλεγχο χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένοι ιστοί με υπολειμματική μόνο μεταβολική δραστηριότητα, οι οποίοι, ωστόσο, απορροφούν την υπό δοκιμή χημική ουσία σε ποσότητα παρόμοια με τους βιώσιμους ιστούς. Κάθε αναγωγική της MTT χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο αδρανοποιημένα πανομοιότυπα δείγματα ιστού ανά περίοδο έκθεσης, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής διάβρωσης του δέρματος. Στη συνέχεια, εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στο αναγωγικό της MTT, μείον την εκατοστιαία μη ειδική αναγωγή της MTT που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στο ίδιο αναγωγικό της MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που ελέγχθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSMTT).

27. Για τον προσδιορισμό της πιθανής παρεμπόδισης από έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χρωματίζονται όταν έρχονται σε επαφή με νερό ή ισοπροπανόλη και τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανάγκη χρήσης πρόσθετων μαρτύρων, θα πρέπει να εκτελείται φασματική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό (περιβάλλον κατά την έκθεση) και/ή σε ισοπροπανόλη (διάλυμα εκχύλισης). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία στο νερό και/ή σε ισοπροπανόλη απορροφά το φως σε φάσμα μηκών κύματος 570 ± 30 nm, πρέπει ναχρησιμοποιούνται

πρόσθετοι μάρτυρες χρωστικής, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, οπότε και δεν χρειάζονται τέτοιοι μάρτυρες (βλ. παραγράφους 30 και 31). Κατά την πραγματοποίηση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), κάθε έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία με παρεμποδιστική δράση εφαρμόζεται τουλάχιστον σε δύο πανομοιότυπα δείγματα βιώσιμου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής διάβρωσης του δέρματος αλλά επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος ΜΤΤ κατά το στάδιο της επώασης της ΜΤΤ προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρες μη ειδικού χρώματος (NSC_{living}). Ο έλεγχος μάρτυρα NSC_{living} πρέπει να διενεργείται ταυτόχρονα ανά περίοδο έκθεσης και ανά έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία (σε κάθε σειρά δοκιμών) λόγω της εγγενούς βιολογικής μεταβλητότητας των ζωντανών ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με το διάλυμα ΜΤΤ μείον την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς ΜΤΤ ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{living}$).

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαπιστώνεται ότι προκαλούν άμεση αναγωγή της ΜΤΤ (βλ. παράγραφο 26) και παρεμπόδιση λόγω χρώματος (βλ. παράγραφο 27) θα απαιτηθεί επίσης ένα τρίτο σύνολο μαρτύρων, πέραν των μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} που περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, κατά την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD). Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις σκουρόχρωμων υπό δοκιμή χημικών ουσιών που παρεμποδίζουν τη δοκιμασία ΜΤΤ (π.χ. κυανές, ιώδεις, μαύρες), διότι το εγγενές χρώμα τους παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να ανάγουν απευθείας την ΜΤΤ όπως περιγράφεται στην παράγραφο 26. Οι ουσίες αυτές μπορεί να δεσμεύονται τόσο σε ζωντανούς όσο και σε αδρανοποιημένους ιστούς και, συνεπώς, ο μάρτυρας NSMTT μπορεί να διορθώσει τη δοκιμή όχι μόνο ως προς την πιθανή άμεση αναγωγή της ΜΤΤ αλλά και ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους αδρανοποιημένους ιστούς. Κατ' αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να προκύψει διπλή διόρθωση ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, δεδομένου ότι ο μάρτυρας NSC_{living} διορθώνει ήδη τη δοκιμή ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους ζωντανούς ιστούς. Για την αποφυγή πιθανής διπλής διόρθωσης ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, πρέπει να χρησιμοποιείται τρίτος μάρτυρας μη ειδικής εμφάνισης χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς (NSC_{killed}). Σε αυτόν τον πρόσθετο μάρτυρα, η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα αδρανοποιημένου ιστού ανά περίοδο έκθεσης, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος ΜΤΤ κατά το στάδιο της επώασης ΜΤΤ. Ένας μοναδικός μάρτυρας NSC_{killed} ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών δοκιμών/σειρών δοκιμών που εκτελούνται, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα NSMTT και, ει δυνατόν, με την ίδια παρτίδα ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία μείον τον %NSMTT μείον τον $\%NSC_{living}$ συν την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς ΜΤΤ, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{killed}$).

29. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι παρεμποδίσεις λόγω μη ειδικής αναγωγής της ΜΤΤ και λόγω μη ειδικού χρώματος ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα να αυξηθούν οι μετρήσεις από το εκχύλισμα ιστού πάνω από την περιοχή τιμών γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου. Με βάση τα παραπάνω, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τη γραμμική περιοχή τιμών του φασματοφωτόμετρού του με φορμαζάνη ΜΤΤ (CAS # 57360-69-7) από εμπορική πηγή, προτού ξεκινήσει τις δοκιμές χημικών ουσιών για κανονιστικούς σκοπούς. Ειδικότερα, η τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) με χρήση φασματοφωτόμετρου είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση άμεσων αναγωγικών της ΜΤΤ και υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν παρεμπόδιση λόγω χρώματος όταν οι τιμές OD των εκχυλισμάτων ιστών που λαμβάνονται με την υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς διόρθωση ως προς την άμεση αναγωγή της ΜΤΤ και/ή την παρεμπόδιση λόγω χρώματος εμπίπτουν στην περιοχή γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου ή όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει ήδη χαρακτηριστεί διαβρωτική βάσει της μη διορθωμένης εκατοστιαίας βιωσιμότητας (βλ. παραγράφους 35 και 36). Εντούτοις, τα αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες από τις οποίες προκύπτουν %NSMTT και/ή $\%NSC_{living} > 50\ \%$ του αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφυλακτικότητα.

30. Όσον αφορά έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι συμβατές με την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) λόγω υπερβολικά έντονης παρεμπόδισης με τη δοκιμασία ΜΤΤ, μπορεί να χρησιμοποιείται η εναλλακτική διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης ΜΤΤ (βλ. παράγραφο 31) (37). Το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας επιτρέπει τον διαχωρισμό της φορμαζάνης ΜΤΤ από την υπό δοκιμή χημική ουσία πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της (38). Για αυτόν τον λόγο, δεν χρειάζονται ποτέ μάρτυρες NSC_{living} ή NSC_{killed} όταν χρησιμοποιείται HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία, ανεξάρτητα από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εντούτοις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μάρτυρες NSMTT εάν υπάρχει υπόνοια ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ανάγει άμεσα την ΜΤΤ ή έχει χρώμα που παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητας άμεσης αναγωγής της ΜΤΤ (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 26). Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρησητης

φορμαζάνης ΜΤΤ, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης ΜΤΤ που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης ΜΤΤ που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι ικανές να ανάγουν άμεσα την ΜΤΤ, η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, μείον το %NSMTT. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι άμεσοι αναγωγείς της ΜΤΤ, οι οποίοι μπορεί επίσης να έχουν παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος και οι οποίοι κατακρατούνται στους ιστούς μετά την αγωγή και ανάγουν την ΜΤΤ σε τέτοιο βαθμό ώστε να δίνουν OD (με τυπική μέτρηση OD) ή εμβαδά κορυφών (με χρήση UPLC/HPLC-φασματοφωτομετρίας) των υπό δοκιμή εκχυλισμάτων ιστών που είναι εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν, αν και δεν αναμένεται να εμφανίζονται παρά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις.

31. Η HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με όλα τα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (έγχρωμων, μη έγχρωμων, αναγωγικών της ΜΤΤ και μη αναγωγικών της ΜΤΤ) για τη μέτρηση της φορμαζάνης της ΜΤΤ (38). Λόγω της ποικιλίας των συστημάτων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, πριν από τη χρήση ενός τέτοιου συστήματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης ΜΤΤ από εκχυλίσματα ιστών θα πρέπει να καταδεικνύεται η καταλληλότητά του για τον συγκεκριμένο σκοπό διά της εκπλήρωσης των κριτηρίων αποδοχής για σειρά τυποποιημένων παραμέτρων συμμόρφωσης που βασίζονται στις παραμέτρους που περιγράφονται στην καθοδήγηση της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για τον κλάδο σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (38)(39). Οι εν λόγω κύριες παράμετροι και τα κριτήρια αποδοχής τους παρατίθενται στο προσάρτημα 4. Εφόσον εκπληρούνται τα κριτήρια αποδοχής που καθορίζονται στο προσάρτημα 4, το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θεωρείται κατάλληλο και έτοιμο για μέτρηση της φορμαζάνης ΜΤΤ υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Κριτήρια αποδοχής

32. Για κάθε μέθοδο δοκιμών που περιλαμβάνει χρήση έγκυρων μοντέλων RhE, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να εμφανίζουν OD που αντικατοπτρίζει την ποιότητα των ιστών, όπως περιγράφεται στον πίνακα 2, και δεν θα πρέπει να βρίσκονται κάτω από τα ιστορικά καθορισμένα όρια. Οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλαδή άνυδρο οξικό οξύ ή διάλυμα KOH 8N, θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν την ικανότητα των ιστών να αποκρίνονται σε διαβρωτική χημική ουσία υπό τις συνθήκες του μοντέλου δοκιμών (βλ. προσάρτημα 2). Η διαφορά μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού της υπό δοκιμής χημικής ουσίας και/ή των χημικών ουσιών μαρτύρων θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός των αποδεκτών ορίων βάσει των απαιτήσεων κάθε έγκυρου μοντέλου RhE (βλ. προσάρτημα 2) (π.χ. η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %). Σε περίπτωση που είτε ο αρνητικός είτε ο θετικός μάρτυρας που περιλαμβάνονται σε μια σειρά δοκιμών είναι εκτός των αποδεκτών πεδίων τιμών, η σειρά θεωρείται ότι δεν πληροί τα κριτήρια και θα πρέπει να διεξάγεται εκ νέου. Σε περίπτωση που η διαφορά μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών είναι εκτός του καθορισμένου πεδίου τιμών, οι σχετικές δοκιμές θα πρέπει να επαναλαμβάνονται.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

33. Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό ενός εκατοστιαίου ποσοστού βιωσιμότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης ΜΤΤ που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης ΜΤΤ που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Οι εκατοστιαίες τιμές αποκοπής για την κυτταρική βιωσιμότητα, που διακρίνουν τις διαβρωτικές από τις μη διαβρωτικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (ή τις διάφορες υποκατηγορίες διαβρωτικών), καθορίζονται κατωτέρω στις παραγράφους 35 και 36 για καθένα από τα μοντέλα δοκιμών που καλύπτει η παρούσα μέθοδος δοκιμών και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

34. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων, αποτελούμενη από δύο τουλάχιστον πανομοιότυπα δείγματα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων των πανομοιότυπων δειγμάτων, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς μετρήσεων, ακόμη και τρίτης σειράς σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών.

35. Το μοντέλο πρόβλεψης για το μοντέλο δοκιμών διάβρωσης του δέρματος EpiSkin™ (9)(34)(22), που σχετίζεται το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, φαίνεται στον πίνακα 4:

Πίνακας 4

Μοντέλο πρόβλεψης EpiSkin™

Βιωσιμότητα μετρούμενη βάσει χρονικών σημείων έκθεσης (t=3, 60 και 240 λεπτά)	Πρόβλεψη προς εξέταση
< 35 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	**Διαβρωτικό:** •Προαιρετική υποκατηγορία 1A (*)
≥ 35 % μετά από έκθεση 3 λεπτών **ΚΑΙ** < 35 % μετά από έκθεση 60 λεπτών **Η** ≥ 35 % μετά από έκθεση 60 λεπτών **ΚΑΙ** < 35 % μετά από έκθεση 240 λεπτών	**Διαβρωτικό:** •Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B+1C
≥ 35 % μετά από έκθεση 240 λεπτών	**Μη διαβρωτικό**

(*) Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν για την αξιολόγηση της χρησιμότητας των μοντέλων δοκιμών RhE με σκοπό την υποστήριξη της ταξινόμησης σε υποκατηγορίες, καταδείχθηκε ότι περίπου 22 % των αποτελεσμάτων της υποκατηγορίας 1A του μοντέλων δοκιμών EpiSkin™ μπορεί, στην πραγματικότητα, να αποτελούν ουσίες/μείγματα της υποκατηγορίας 1B ή της υποκατηγορίας 1C (δηλ. υπερταξινομήσεις) (βλ. προσάρτημα 3).

36. Τα μοντέλα πρόβλεψης για τα μοντέλα δοκιμών διάβρωσης του δέρματος EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36), και epiCS® (16)(23)(37), που σχετίζονται με το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, φαίνονται στον πίνακα 5:

Πίνακας 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS®

Βιωσιμότητα μετρούμενη βάσει χρονικών σημείων έκθεσης (t=3 και 60 λεπτά)	Πρόβλεψη προς εξέταση
ΣΤΑΔΙΟ 1 για τα EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS®	
< 50 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	**Διαβρωτικό**
≥ 50 % μετά από έκθεση 3 λεπτών **ΚΑΙ** < 15 % μετά από έκθεση 60 λεπτών	**Διαβρωτικό**
≥ 50 % μετά από έκθεση 3 λεπτών **ΚΑΙ** ≥ 15 % μετά από έκθεση 60 λεπτών	**Μη διαβρωτικό**
ΣΤΑΔΙΟ 2 για το EpiDerm™ SCT - για ουσίες/μείγματα που έχουν χαρακτηριστεί διαβρωτικά στο στάδιο 1	
< 25 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Προαιρετική υποκατηγορία 1A*

Βιωσιμότητα μετρούμενη βάσει χρονικών σημείων έκθεσης (t=3 και 60 λεπτά)	Πρόβλεψη προς εξέταση
ΣΤΑΔΙΟ 1 για τα EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE και epiCS®	
≥ 25 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B και 1C
ΣΤΑΔΙΟ 2 για το SkinEthic™ RHE - για ουσίες/μείγματα που έχουν χαρακτηριστεί διαβρωτικά στο στάδιο 1	
< 18 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Προαιρετική υποκατηγορία 1A*
≥ 18 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B και 1C
ΣΤΑΔΙΟ 2 για το epiCS® - για ουσίες/μείγματα που έχουν χαρακτηριστεί διαβρωτικά στο στάδιο 1	
< 15 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Προαιρετική υποκατηγορία 1A*
≥ 15 % μετά από έκθεση 3 λεπτών	Συνδυασμός προαιρετικών υποκατηγοριών 1B και 1C

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ **Δεδομένα**

37. Για κάθε δοκιμή πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους πανομοιότυπο δείγμα ιστού (π.χ. τιμές OD και υπολογισθείσα εκατοστιαία κυτταρική βιωσιμότητα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρονται για κάθε δοκιμή οι μέσες τιμές και τα πεδία τιμών για τη βιωσιμότητα και τους συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με τα άμεσα αναγωγικά MTT ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Έκθεση δοκιμής

38. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και τυχόν πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Μοντέλο RhE και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν και αιτιολόγησή τους (κατά περίπτωση)

Συνθήκες δοκιμής:

— μοντέλο XRhE που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένου του αριθμού παρτίδας),

— στοιχεία βαθμονόμησης για τη συσκευή μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο), μήκος κύματος και ζώνη διάβασης (κατά περίπτωση) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT, και περιοχή τιμών γραμμικότητας της συσκευής μέτρησης,

— περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT,

— περιγραφή των στοιχείων που αποδεικνύουν ότι το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας πληροί τα κριτήρια καταλληλότητας, κατά περίπτωση,

— πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο RhE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) βιωσιμότητα,

  ii) λειτουργία φραγμού,

  iii) μορφολογία,

  iv) αναπαραγωγιμότητα και προβλεπτική ικανότητα,

  v) ποιοτικούς ελέγχους του μοντέλου,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, και ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες ώστε να τεκμηριώνεται η αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου,

— κατάδειξη της τεχνικής ικανότητας διεξαγωγής της μεθόδου δοκιμών προτού χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική, μέσω ελέγχου των ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Διαδικασία δοκιμής:

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης που χρησιμοποιήθηκαν μετά την περίοδο έκθεσης),

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των μαρτύρων,

— διάρκεια περιόδου/-ων έκθεσης και θερμοκρασία/-ες έκθεσης,

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή έγχρωμες,

— αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ανά υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας και NSMTT, NSC_{living} και NSC_{killed}, κατά περίπτωση), βάσει περιόδου έκθεσης,

— περιγραφή των κριτηρίων απόφασης/μοντέλου πρόβλεψης που εφαρμόστηκαν με βάση το χρησιμοποιηθέν μοντέλο RhE,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμών (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης).

Κριτήρια της σειράς δοκιμών και της δοκιμής:

— μέσες τιμές και πεδία τιμών αποδοχής του θετικού και αρνητικού μάρτυρα βάσει ιστορικών δεδομένων,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Αποτελέσματα:

— δεδομένα σε μορφή πίνακα για τις επιμέρους υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες, για κάθε περίοδο έκθεσης, κάθε σειρά δοκιμών και κάθε μέτρηση πανομοιότυπου δείγματος, περιλαμβανομένης της OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, της εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, των διαφορών μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων, των SD και/ή των συντελεστών μεταβλητότητας, κατά περίπτωση,

— κατά περίπτωση, αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν για τα άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της OD ή του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT, του %NSMTT, του $\%NSC_{living}$, του $\%NSC_{killed}$, των διαφορών μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού, των SD και/ή των συντελεστών μεταβλητότητας (κατά περίπτωση), και της τελικής ορθής εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών,

— αποτελέσματα που προέκυψαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες και τους μάρτυρες σε σχέση με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής για τη σειρά δοκιμών και τη δοκιμή,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and >Geneva. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(3) Κεφάλαιο B.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*.

(4) Κεφάλαιο B.65 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης *in vitro*.

(5) Κεφάλαιο B.46 του παρόντος παραρτήματος: Δερματικός ερεθισμός *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6*. *ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol. in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. Στο: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) 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. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (25).

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, κυανό του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με τη μετρούμενη παράμετρο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή τη ζωτικότητα των κυττάρων.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (25).

ET_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης, βλ. επίσης IC_{50}.

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals – Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment/Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση.

IC_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}) μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλ. επίσης ET_{50}.

Πλεονάζουσα δόση: ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιδερμικής επιφάνειας.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες οι οποίες δεν αντιδρούν μέσα σε αυτό.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο–κυανό του θειαζολυλίου.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση > 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NC: μη διαβρωτικό.

Μάρτυρας NSC_{killed}: μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς.

Μάρτυρας NSC_{living}: μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζωντανούς ιστούς.

NSMTT: μη ειδική αναγωγή της MTT.

OD: (Optical Density) οπτική πυκνότητα.

PC: (Positive Control) θετικός μάρτυρας, πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και iii) τα ανάλογα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (25).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της μεθόδου δοκιμών με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η μέθοδος δοκιμών μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (25).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (25).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με αρνητικό μάρτυρα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (25).

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (25).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UPLC: υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Προσάρτημα 2

Κυρια ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHE ΠΟΥ ΕΠΙΚΥΡΩΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΕΣ ΔΙΑΒΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Επιφάνεια μοντέλου	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού	Τουλάχιστον 2 ανά χρόνο έκθεσης	Τουλάχιστον 2-3 ανά χρόνο έκθεσης	Τουλάχιστον 2 ανά χρόνο έκθεσης	Τουλάχιστον 2 ανά χρόνο έκθεσης
Δόσεις αγωγής και εφαρμογή	Υγρά και παχύρρευστα: 50 μl ± 3 μl (131,6 μl/cm^2) Στερεά: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 μl ± 5 μl διαλύματος NaCl (9 g/l) Κηρώδη/κολλώδη: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) με πλέγμα από νάιλον	Υγρά: 50 μl (79,4 μl/cm^2) με ή χωρίς πλέγμα από νάιλον *Συμβατότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με πλέγμα από νάιλον πριν από την έναρξη της δοκιμής* Ημιστερεά: 50 μl (79,4 μl/cm^2) Στερεά: 25 μl H_2O (ή περισσότερο, εφόσον απαιτείται) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Κηροί: επίπεδο δισκοειδές τεμάχιο διαμέτρου περίπου 8 mm που τοποθετείται πάνω στον ιστό και διαβρέχεται με 15 μl H_2O.	Υγρά και παχύρρευστα: 40 μl ± 3μl (80 μl/cm^2) με χρήση πλέγματος από νάιλον *Συμβατότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με πλέγμα από νάιλον πριν από την έναρξη της δοκιμής* Στερεά: 20 μl ± 2μl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Κηρώδη/κολλώδη: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) με χρήση πλέγματος από νάιλον	Υγρά: 50 μl (83,3 μl/cm^2) με χρήση πλέγματος από νάιλον *Συμβατότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με πλέγμα από νάιλον πριν από την έναρξη της δοκιμής* Ημιστερεά: 50 μl (83,3 μl/cm^2) Στερεά: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 μl H_2O (ή περισσότερο, εφόσον απαιτείται) Κηρώδη: επίπεδο δισκοειδές τεμάχιο διαμέτρου περίπου 8 mm που τοποθετείται πάνω στον ιστό και διαβρέχεται με 15 μl H_2O.

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Προέλεγχος για άμεση αναγωγή της MTT	50 μl (υγρό) ή 20 mg (στερεό) + 2 ml MTT διάλυμα 0,3 mg/ml επί 180 ± 5 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι σε νερό προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 1 ml MTT διάλυμα 1 mg/ml επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες	40 μl (υγρό) ή 20 mg (στερεό) + 1 ml MTT διάλυμα 1 mg/ml επί 180 ± 15 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 1 ml MTT διάλυμα 1 mg/ml επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες
50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 300 μl H_2O επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	Προέλεγχος για παρεμπόδιση λόγω χρώματος	10 μl (υγρό) ή 10 mg (στερεό) + 90 μl H_2O αναμεμειγμένα επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου → εάν το διάλυμα χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 μl (υγρό) ή 25 mg (στερεό) + 300 μl H_2O επί 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → εάν το διάλυμα χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	40 μl (υγρό) ή 20 mg (στερεό) + 300 μl H_2O αναμεμειγμένα επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου → εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία χρωματιστεί, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες
Έκθεση χρόνος και θερμοκρασία	3 λεπτά, 60 λεπτά (± 5 λεπτά) και 240 λεπτά (± 10 λεπτά) Σε εξαεριζόμενο θάλαμο Θερμοκρασία δωματίου (RT, 18-28°C)	3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και 60 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Έκπλυση	25 ml 1x PBS (2 ml/έκπλυση)	20 φορές με σταθερή, ήπια ροή 1x PBS	20 φορές με σταθερή, ήπια ροή 1x PBS	20 φορές με σταθερή, ήπια ροή 1x PBS

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Αρνητικός μάρτυρας	διάλυμα 50 μl NaCl (9 g/l) Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	50 μl H_2O Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	40 μl H_2O Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	50 μl H_2O Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης
Θετικός μάρτυρας	50 μl άνυδρο οξικό οξύ Υποβάλλεται σε δοκιμή μόνο επί 4 ώρες	8N KOH 50 μl Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης	8N KOH 40 μl Υποβάλλεται σε δοκιμή μόνο επί 1 ώρα	8N KOH 50 μl Υποβάλλεται σε δοκιμή με κάθε χρόνο έκθεσης
Διάλυμα MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml
Επώαση MTT χρόνος και θερμοκρασία	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 λεπτά στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
	Διαλύτης εκχύλισης	500 μl οξινισθείσας ισοπροπανόλης (0,04 N HCl σε ισοπροπανόλη) (απομονωμένος ιστός πλήρως εμβαπτισμένος)	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)	1,5 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)
	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)			
Χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης	Όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός	Όλη τη νύχτα χωρίς ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ή επί 120 λεπτά με ανακίνηση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου	Όλη τη νύχτα χωρίς ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ή επί 120 λεπτά με ανακίνηση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου	Όλη τη νύχτα χωρίς ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ή επί 120 λεπτά με ανακίνηση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου

Στοιχεία μοντέλου δοκιμών	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Μέτρηση OD	570 nm (545 - 595 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (ή 540 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (540 - 600 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	540 - 570 nm χωρίς φίλτρο αναφοράς
Ποιοτικός έλεγχος ιστού	αγωγή 18 ωρών με SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	αγωγή με 1 % Triton X-100 4,08 ώρες ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ώρες	αγωγή με 1 % Triton X-100 4,0 ώρες ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ώρες	αγωγή με 1 % Triton X-100 2,0 ώρες ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ώρες
Κριτήρια αποδοχής	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (NaCl) θα πρέπει να είναι ≥ 0,6 και ≤ 1,5 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 4 ώρες στον θετικό μάρτυρα (άνυδρο οξικό οξύ), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 20 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20-100 % και για OD ≥ 0,3, η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (H_2O) θα πρέπει να είναι ≥ 0,8 και ≤ 2,8 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 1 ώρα στον θετικό μάρτυρα (8N KOH), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 15 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20 - 100 %, ο συντελεστής μεταβλητότητας μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού θα πρέπει να είναι ≤ 30 %	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (H_2O) θα πρέπει να είναι ≥ 0,8 και ≤ 3,0 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 1 ώρα (και επί 4 ώρες, κατά περίπτωση) στον θετικό μάρτυρα (8N KOH), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 15 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20-100 %, και για OD ≥ 0,3, η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα (H_2O) θα πρέπει να είναι ≥ 0,8 και ≤ 2,8 για κάθε χρόνο έκθεσης 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 1 ώρα στον θετικό μάρτυρα (8N KOH), εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 20 % 3. Στο φάσμα τιμών βιωσιμότητας 20-100 %, και για OD ≥ 0,3, η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ των δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 %

Προσάρτημα 3

ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΣΕ ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ

Στον κατωτέρω πίνακα φαίνονται οι επιδόσεις των τεσσάρων μοντέλων δοκιμών, όπως υπολογίστηκαν με βάση ένα σύνολο 80 χημικών ουσιών που υποβλήθηκαν σε δοκιμή από τους φορείς ανάπτυξης των τεσσάρων δοκιμών. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν από τη γραμματεία του ΟΟΣΑ, και ελέγχθηκαν και εγκρίθηκαν κατόπιν συμφωνίας από υποομάδα εμπειρογνωμόνων (21) (23).

Τα μοντέλα δοκιμών EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ και epiCS® παρέχουν τη δυνατότητα ταξινόμησης σε υποκατηγορίες (δηλ. 1A έναντι 1B+1C έναντι NC)

Οι επιδόσεις, τα ποσοστά υπερταξινόμησης, τα ποσοστά υποταξινόμησης και η ορθότητα (προβλεπτική ικανότητα) των τεσσάρων μοντέλων δοκιμών βασίστηκαν σε ένα σύνολο 80 χημικών ουσιών, οι οποίες υποβλήθηκαν όλες σε δοκιμές στο πλαίσιο 2 ή 3 σειρών δοκιμών σε κάθε μοντέλο δοκιμών:

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΠΡΟΒΛΕΨΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

(n = 80 χημικές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμές στο πλαίσιο 2 ανεξάρτητων σειρών δοκιμών για το epiCS® ή 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για το EpiDerm™ SCT, το EpiSkin™ και το SkinEthic™ RHE, δηλ. αντίστοιχα 159 (*) ή 240 ταξινομήσεις)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Υπερταξινομήσεις:				
1B+1C που υπερταξινομήθηκαν ως 1A	21,50%	29,0%	31,2%	32,8%
NC που υπερταξινομήθηκαν ως 1B+1C	20,7%	23,4%	27,0%	28,4 %
NC που υπερταξινομήθηκαν ως 1A	0,00%	2,7%	0,0%	0,00%
υπερταξινομήθηκαν ως διαβρωτικά	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Συνολικό ποσοστό υπερταξινόμησης (όλες οι κατηγορίες)	**17,9%**	**23,3%**	**24,5%**	**25,8%**
Υποταξινομήσεις:				
1A που υποταξινομήθηκαν ως 1B+1C	16,7%	16,7%	16,7%	12,5%
1A που υποταξινομήθηκαν ως NC	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B+1C που υποταξινομήθηκαν ως NC	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Συνολικό ποσοστό υποταξινόμησης (όλες οι κατηγορίες)	**3,3%**	**2,5%**	**5,4%**	**4,4%**
Ορθές ταξινομήσεις:				
ορθή ταξινόμηση ως 1A	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
ορθή ταξινόμηση ως 1B+1C	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
ορθή ταξινόμηση ως NC	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Συνολική ορθότητα	**78,8%**	**74,2%**	**70%**	**69,8%**

NC: Μη διαβρωτικό

(*) μία χημική ουσία δοκιμάστηκε μία φορά με το epiCS® λόγω μη διαθεσιμότητας (23)

Προσάρτημα 4

Βασικές παράμετροι και κριτήρια αποδοχής της καταλληλότητας συστήματος HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για μέτρηση της φορμαζάνης MTT που εκχυλίζεται από ιστό RhE

Παράμετρος	Πρωτόκολλο από την καθοδήγηση της FDA (37)(38)	Κριτήρια αποδοχής
Επιλεκτικότητα	Ανάλυση ισοπροπανόλης, ζωντανού τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από ζωντανούς ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή), αδρανοποιημένου τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από αδρανοποιημένους ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$ [1]
Ακρίβεια	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου (φορμαζάνη MTT στα 1,6 μg/ml, 16 μg/ml και 160 μg/ml) σε ισοπροπανόλη (n=5)	CV ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Ορθότητα	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	%Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Φαινόμενο μήτρας	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=5)	85 % ≤ φαινόμενο μήτρας % ≤ 115 %
Μεταφορά υλικού	Ανάλυση ισοπροπανόλης μετά από πρότυπο ULOQ[2] [2]	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$
Αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας)	3 ανεξάρτητες καμπύλες βαθμονόμησης (με βάση 6 διαδοχικές αραιώσεις φορμαζάνης MTT 1:3 σε ισοπροπανόλη, ξεκινώντας από το ULOQ, δηλαδή 200 μg/ml), Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	Καμπύλες βαθμονόμησης: %Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου: %Dev ≤ 15 % και CV ≤ 15 %
Αναπαραγωγιμότητα (μεταξύ ημερών)	1η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 2η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 3η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3)	
Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από 24 ώρες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου	%Dev ≤ 15 %
Μακροπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE, εφόσον απαιτείται	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από αρκετές ημέρες φύλαξης σε καθορισμένη θερμοκρασία (π.χ. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %»

[1] LLOQ: Κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να καλύπτει βιωσιμότητα ιστού 1-2 %, δηλαδή 0,8 μg/ml.
[2] ULOQ: Ανώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερο από την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση φορμαζάνης MTT σε εκχυλίσματα ισοπροπανόλης από αρνητικούς μάρτυρες, δηλαδή 200 μg/ml.

7) Στο μέρος Β, το κεφάλαιο Β.46 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.46 **ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ *IN VITRO*: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 439 του ΟΟΣΑ (2015). Ο ερεθισμός του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας για διάστημα έως 4 ωρών [όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1])]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προβλέπει μια διαδικασία *in vitro* που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ερεθιστικών χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) της κατηγορίας 2 του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP (2). Σε περιοχές που δεν έχουν υιοθετήσει την προαιρετική κατηγορία 3 του GHS του ΟΗΕ (ήπια ερεθιστικά), η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μη ταξινομημένων χημικών ουσιών. Ως εκ τούτου, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο και το σύστημα ταξινόμησης που χρησιμοποιείται, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ερεθιστικότητας χημικών ουσιών για το δέρμα, είτε ως αυτοτελής δοκιμή υποκατάστασης για δοκιμές ερεθισμού του δέρματος *in vivo* είτε ως δοκιμή μερικής υποκατάστασης στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών (3).
2. Η αξιολόγηση του ερεθισμού του δέρματος αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζωων (μέθοδος δοκιμών Β.4, ισοδύναμη με την TG 404 του ΟΟΣΑ που εγκρίθηκε αρχικά το 1981 και αναθεωρήθηκε το 1992, το 2002 και το 2015) (4). Για τη διεξαγωγή δοκιμών διαβρωτικότητας, έχουν εγκριθεί τρεις επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* ως μέθοδος δοκιμών ΕΕ Β.40 (ισοδύναμη με την TG 430 του ΟΟΣΑ), ως μέθοδος δοκιμών Β.40α (ισοδύναμη με την TG 431 του ΟΟΣΑ) και ως μέθοδος δοκιμών Β.65 (ισοδύναμη με την TG 435 του ΟΟΣΑ) (5) (6) (7). Σε έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις στη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με i) τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος, και ii) μια προτεινόμενη προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (3).
3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «ερεθισμός του δέρματος». Βασίζεται στο σύστημα δοκιμών *in vitro* σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE), το οποίο μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Το σύστημα δοκιμών RhE χρησιμοποιεί μη μετασχηματισμένα κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης ως πηγή κυττάρων για την ανασύσταση ενός επιδερμικού μοντέλου αντιπροσωπευτικής ιστολογίας και κυτταρικής αρχιτεκτονικής. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων που διευκολύνουν την επικύρωση και την αξιολόγηση παρεμφερών και τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών RhE, σύμφωνα με τις αρχές του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 34 του ΟΟΣΑ (8) (9). Η αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών εγκρίθηκε αρχικά το 2010, επικαιροποιήθηκε το 2013 προκειμένου να συμπεριλάβει πρόσθετα μοντέλα RhE, και επικαιροποιήθηκε το 2015 προκειμένου να περιλαμβάνει αναφορά στο έγγραφο καθοδήγησης IATA και να εισαγάγει τη χρήση εναλλακτικής διαδικασίας για τη μέτρηση της βιωσιμότητας.
4. Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες προεπικύρωσης, βελτιστοποίησης και επικύρωσης για τέσσερα μοντέλα δοκιμών *in vitro* που διατίθενται στο εμπόριο (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) με βάση το σύστημα δοκιμών RhE (ευαισθησία 80 %, ειδικότητα 70 % και ορθότητα 75 %). Τα εν λόγω τέσσερα μοντέλα δοκιμών περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και απαριθμούνται στο προσάρτημα 2, στο οποίο παρέχονται επίσης πληροφορίες σχετικά με το είδος της μελέτης επικύρωσης που χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση των αντίστοιχων μεθόδων δοκιμών. Όπως αναφέρεται στο προσάρτημα 2, η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (VRM) έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου δοκιμών και των προτύπων επιδόσεων (8).
5. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων του ΟΟΣΑ θα διασφαλίζεται για μοντέλα δοκιμών που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων (8), μόνον εφόσον τα εν λόγω μοντέλα δοκιμών έχουν επανεξεταστεί και εγκριθεί από τον ΟΟΣΑ. Τα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και στην αντίστοιχη TG του ΟΟΣΑ μπορούν να χρησιμοποιηθούν αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών από μεθόδους δοκιμών *in vitro* για τον ερεθισμό του δέρματος, ενώ αξιοποιείται παράλληλα η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων.
6. Οι ορισμοί των όρων που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

7. Ένας περιορισμός της μεθόδου δοκιμών, όπως καταδείχθηκε από την πλήρη προοπτική μελέτη επικύρωσης για την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό των μεθόδων δοκιμών RhE (16), είναι ότι δεν επιτρέπει την κατάταξη των χημικών ουσιών στην προαιρετική κατηγορία 3 του GHS του ΟΗΕ (ήπια ερεθιστικά) (1). Συνεπώς, ο τρόπος χρήσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών θα καθοριστεί βάσει του κανονιστικού πλαισίου των χωρών μελών. Όσον αφορά την ΕΕ, η κατηγορία 3 δεν έχει περιληφθεί στον κανονισμό CLP. Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (3). Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους.

8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την παράμετρο της υγείας του ανθρώπου «ερεθισμός του δέρματος». Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τη διάβρωση του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών B.40α (ισοδύναμη με την TG 431 του ΟΟΣΑ) σχετικά με τη διάβρωση του δέρματος βασίζεται στο ίδιο σύστημα δοκιμών RhE, μέσω της χρήσης άλλου πρωτοκόλλου (6). Η παρούσα μέθοδος βασίζεται σε μοντέλα RhE όπου χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, τα οποία, συνεπώς, αποτελούν *in vitro* το στοχευόμενο όργανο του επιθυμητού είδους. Επιπλέον, καλύπτει το αρχικό στάδιο της αλληλουχίας διεργασιών / του μηχανισμού δράσης της φλεγμονής (βλάβη των κυττάρων και των ιστών που έχει ως αποτέλεσμα εντοπισμένο τραύμα) που επιτελείται κατά τον ερεθισμό *in vivo*. Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, η δε βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης καλύπτει συνολικά 58 χημικές ουσίες (16) (18) (23). Η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε στερεά, υγρά, ημιστερεά και κηρούς. Τα υγρά μπορούν να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με μελέτη επικύρωσης (29). Παρότι η τεχνολογία RhE μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

9. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Εντούτοις, λόγω του γεγονότος ότι τα μείγματα καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών και συστάσεων, καθώς και του ότι οι πληροφορίες σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όταν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων (π.χ. βάσει στρατηγικής όπως προτείνεται από τους Eskes *et al.*, 2012 (30)), η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη κατηγορία μειγμάτων. Παρόμοια μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται σε περίπτωση που διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένες χημικές κατηγορίες ή φυσικοχημικές ιδιότητες δεν μπορούν να εφαρμοστούν στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

10. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με το άλας φορμαζάνης MTT και υπό δοκιμή χημικές ουσίες ικανές να ανάγουν άμεσα τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT (σε άλας φορμαζάνης MTT) μπορεί να παρεμποδίζουν τις μετρήσεις κυτταρικής βιωσιμότητας, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις (βλ. παραγράφους 28-34).

11. Για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση είναι αναμφίβολη, αναμένεται να αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων με τριπλό δείγμα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως π.χ. σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων πανομοιότυπων δειγμάτων και/ή μια μέση τιμή βιωσιμότητας ίση με 50 ± 5 %, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς μετρήσεων, ακόμη και τρίτης σειράς, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο RhE, το οποίο αποτελείται από μη μεταμοσχηματισμένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που έχουν καλλιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν πολυστρωματικό μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με υψηλή διαφοροποίηση. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια στρώματα λιπιδίων που αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων, ανάλογα με εκείνα που συναντώνται *in vivo*.

13. Ο επαγόμενος από χημική ουσία ερεθισμός του δέρματος, ο οποίος εκδηλώνεται κυρίως με ερύθημα και οίδημα, είναι αποτέλεσμα μιας ακολουθίας συμβάντων που αρχίζει με διείσδυση της χημικής ουσίας διαμέσου της κεράτινης στιβάδας, σε βάθος όπου μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις υποκείμενες στιβάδες κερατινοκυττάρων και άλλων δερματικών κυττάρων. Τα κύτταρα που υφίστανται βλάβη ελευθερώνουν φλεγμονικούς μεσολαβητές ή επάγουν μια φλεγμονική αλληλουχία αντιδράσεων στο χόριο, ιδίως στα στρωματικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων. Το παρατηρούμενο ερύθημα και οίδημα οφείλεται ακριβώς στη διαστολή και την αυξημένη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (29). Επισημαίνεται ότι οι μέθοδοι δοκιμών που βασίζονται σε RhE, ελλείψει κάθε νεοαγγείωσης στο σύστημα δοκιμών *in vitro*, μετρούν τα εναρκτήρια συμβάντα της αλληλουχίας, π.χ. τη βλάβη στα κύτταρα/ιστούς (16) (17), με χρήση της κυτταρικής βιωσιμότητας ως ένδειξης.

14. Η κυτταρική βιωσιμότητα σε μοντέλα RhE μετράται με βάση την ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, κυανό του θειαζολυλίου, αριθ. CAS 298-93-1], σε κυανό άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (31). Οι ερεθιστικές χημικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένα κατώφλια (≤ 50 %, στην περίπτωση της κατηγορίας 2 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP). Ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο και την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που οδηγούν σε κυτταρική βιωσιμότητα υψηλότερη από τα επίπεδα κατωφλίου μπορούν να θεωρούνται μη ερεθιστικές (δηλ. τιμή > 50 % συνεπάγεται «Καμία κατηγορία»).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

15. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική οποιοδήποτε από τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα δοκιμών που συμμορφώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα 2), τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις δέκα ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμώνται στον πίνακα 1. Σε περιπτώσεις όπου, για παράδειγμα, μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (8)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1. Η χρήση εναλλακτικής ουσίας ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να αιτιολογείται.

16. Στο πλαίσιο της δοκιμής απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών, κατά τις προδιαγραφές του παραγωγού του μοντέλου RhE, μετά την παραλαβή τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση της μεθόδου δοκιμών και αφού επιτευχθεί και αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρόλα αυτά, όταν η μέθοδος δοκιμών εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

Πίνακας 1

Ουσίες ελέγχου ικανότητας [1]

Ουσία	Αριθ. CAS	Βαθμολογία σε δοκιμές *in vivo* [2]	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία GHS του ΟΗΕ
ΜΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ («Καμία κατηγορία» κατά GHS του ΟΗΕ)				
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	0	Στερεό	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	0,3	Υγρό	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	1	Στερεό	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	1,7	Υγρό	Καμία (*προαιρετική κατ. 3*) [3]
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	2	Υγρό	Καμία (*προαιρετική κατ. 3*) [3]
ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ (κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ)				
κυκλαμιναλδεΰδη	103-95-7	2,3	Υγρό	Κατ. 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	2,7	Υγρό	Κατ. 2
υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 5 %)	1310-58-3	3	Υγρό	Κατ. 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	3,3	Στερεό	Κατ. 2
επτανάλη	111-71-7	3,4	Υγρό	Κατ. 2

(1) Οι ουσίες ελέγχου ικανότητας αποτελούν υποσύνολο των ουσιών που χρησιμοποιούνται στη μελέτη επικύρωσης και η επιλογή τους βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια: i) οι χημικές ουσίες κυκλοφορούν στο εμπόριο· ii) αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό)· iii) έχουν σαφώς καθορισμένη χημική δομή· iv) είναι αντιπροσωπευτικές της χημικής λειτουργικότητας που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία επικύρωσης· v) παρείχαν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα *in vitro* σε πολλαπλές δοκιμές και πολλαπλά εργαστήρια· vi) συνδέονται με ορθή πρόβλεψη *in vitro*, και vii) δεν τους αποδίδονται άκρως τοξικά χαρακτηριστικά (π.χ. καρκινογόνες ή τοξικές για το αναπαραγωγικό σύστημα) και το κόστος απόρριψης δεν θεωρείται απαγορευτικό.

(2) Βαθμολογία *in vivo* σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών B.4 (4).

(3) Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) κατά GHS του ΟΗΕ (1) θεωρείται «Καμία κατηγορία».

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

17. Στη συνέχεια παρατίθεται περιγραφή των στοιχείων και των διαδικασιών μιας μεθόδου δοκιμών RhE για αξιολόγηση του ερεθισμού του δέρματος (βλ. επίσης προσάρτημα 3 για τις παραμέτρους που σχετίζονται με το κάθε μοντέλο). Υπάρχουν διαθέσιμες τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) για τα τέσσερα μοντέλα που συμμορφώνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών (32) (33) (34) (35).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHE

Γενικοί όροι

18. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μη μετασχηματισμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την ανασύσταση του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά ώστε να δημιουργεί ισχυρό λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού πρέπει να καταδεικνύεται και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}), μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET_{50}) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου RhE πρέπει να αποτρέπουν τη διέλευση του υλικού γύρω από την κεράτινη στιβάδα μέχρι τον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο RhE πρέπει να μην έχει μολυνθεί από βακτήρια, ιούς, μυκοπλάσματα ή μύκητες.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

19. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (31). Τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhE μπορούν να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT, το οποίο εκχυλίζεται στη συνέχεια από τον ιστό με χρήση ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη). Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλ. μικρότερη από 0,1. Το εκχυλιζόμενο άλας φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά είτε με χρήση τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (36). Οι χρήστες του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να προσδιορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα (στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών ερεθισμού του δέρματος). Τα πεδία τιμών αποδοχής για τα τέσσερα επικυρωμένα μοντέλα RhE που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 2. Ένας χρήστης HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θα πρέπει να χρησιμοποιεί τα πεδία τιμών OD αρνητικού μάρτυρα που φαίνονται στον πίνακα 2 ως κριτήριο αποδοχής για τον αρνητικό μάρτυρα. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (δίνουν παραπλήσιες τιμές στις μετρήσεις βιωσιμότητας) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης της δοκιμής.

Πίνακας 2

Πεδία τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα των μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Λειτουργία φραγμού

20. Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης (π.χ. SDS ή Triton X-100), όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC_{50} ή ET_{50} (πίνακας 3).

Μορφολογία

21. Το μοντέλο RhE πρέπει να υποβάλλεται σε ιστολογική εξέταση, από την οποία να προκύπτει δομή όμοια με εκείνη της ανθρώπινης επιδερμίδας (συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης πολυστρωματικής κεράτινης στιβάδας).

Αναπαραγωγιμότητα

22. Τα αποτελέσματα για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες της μεθόδου δοκιμών πρέπει να καταδεικνύουν διαχρονική αναπαραγωγιμότητα.

Ποιοτικός έλεγχος

23. Το μοντέλο RhE θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του μοντέλου RhE ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη *βιωσιμότητα* (παράγραφος 19), τη *λειτουργία φραγμού* (παράγραφος 20) και τη *μορφολογία* (παράγραφος 21). Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να γνωστοποιούνται στους χρήστες της μεθόδου δοκιμών ώστε αυτοί να μπορούν να τα συμπεριλάβουν στην έκθεση δοκιμής. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του μοντέλου RhE θα πρέπει να εφαρμόζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τα IC_{50} ή ET_{50}. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόβλεψη της ταξινόμησης ως προς τον ερεθισμό μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με ιστούς οι οποίοι πληρούν τα κριτήρια. Τα πεδία τιμών αποδοχής για τα τέσσερα μοντέλα δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Κριτήρια ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων των μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM) (αγωγή 18 ωρών με SDS) (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 ώρες	ET_{50} = 8,7 ώρες
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ώρες	ET_{50} = 10,0 ώρες
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (αγωγή 18 ωρών με SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών-μαρτύρων

24. Σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πανομοιότυπα δείγματα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τους μάρτυρες. Προκειμένου τόσο για υγρές όσο και για στερεές χημικές ουσίες, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια της επιδερμίδας και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες δόσεις, δηλαδή ποσότητα από 26 έως 83 $\mu l/cm^2$ ή mg/cm^2 (βλ. προσάρτημα 3) Στην περίπτωση των στερεών χημικών ουσιών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να βελτιώνεται η επαφή της με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ως βοήθημα επίστρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέγμα από νάιλον (βλ. προσάρτημα 3). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να εκπλένεται επιμελώς από την επιφάνεια της επιδερμίδας με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα μοντέλα δοκιμών RhE, η περίοδος έκθεσης κυμαίνεται από 15 έως 60 λεπτά και η θερμοκρασία επώασης από 20 έως 37 °C. Αυτές οι περίοδοι και θερμοκρασίες έκθεσης βελτιστοποιούνται για καθεμία από τις μεθόδους δοκιμών RhE και αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά εγγενή χαρακτηριστικά των μοντέλων δοκιμών (π.χ. λειτουργία φραγμού) (βλ. προσάρτημα 3).

25. Σε κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλος αρνητικός (NC) και θετικός μάρτυρας (PC) για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (με τον NC), η λειτουργία φραγμού και η προκύπτουσα ιστική ευαισθησία (με τον PC) των ιστών περιλαμβάνονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών αποδοχής. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι υδατικό διάλυμα SDS 5 %. Οι συνιστώμενες ως αρνητικοί μάρτυρες ουσίες είναι είτε το νερό είτε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

26. Σύμφωνα με τη διαδικασία δοκιμής, είναι απολύτως απαραίτητο η μέτρηση της βιωσιμότητας να πραγματοποιείται όχι αμέσως μετά την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά αφού προηγηθεί επώαση του εκπλυθέντος ιστού σε πρόσφατο θρεπτικό υλικό για αρκούντως μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή. Το χρονικό αυτό διάστημα επιτρέπει τόσο την αποκατάσταση από ασθενείς κυτταροτοξικές επιδράσεις όσο και την εκδήλωση σαφών κυτταροτοξικών επιδράσεων. Το στάδιο βελτιστοποίησης των δύο από τα μοντέλα δοκιμών που βασίζονται σε RhE και στα οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών κατέδειξε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης μετά την αγωγή είναι 42 ώρες (11) (12) (13) (14) (15).
27. Η δοκιμασία MTT αποτελεί τυποποιημένη ποσοτική μέθοδο η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Είναι συμβατή με τη χρήση σε τρισδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Το δείγμα ιστού φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (π.χ. 0,3 έως 1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τρίωρο. Τα βιώσιμα κύτταρα μετατρέπουν την MTT σε κυανή φορμαζάνη. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο κυανό προϊόν φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και η συγκέντρωση της φορμαζάνης μετράται με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ± 30 nm, ή μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. παράγραφο 34) (36).
28. Οι οπτικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή η χημική της δράση επί της MTT (π.χ. οι χημικές ουσίες μπορεί να παρεμποδίσουν ή να αναστρέψουν τον σχηματισμό του χρώματος, ή και να τον προκαλέσουν) ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας. Αυτό ενδέχεται να συμβεί όταν μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία δεν απομακρυνθεί τελείως από τον ιστό με την έκπλυση ή διαπεράσει την επιδερμίδα. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δρα απευθείας επί της MTT (π.χ. αναγωγικό της MTT), είναι εκ φύσεως έγχρωμη ή χρωματίζεται κατά την αγωγή του ιστού, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση της παρεμπόδισης της τεχνικής μετρήσεων της βιωσιμότητας από την υπό δοκιμή ουσία (βλ. παραγράφους 29 και 33). Ο τρόπος διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των τεσσάρων επικυρωμένων μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (32) (33) (34) (35).
29. Για τον προσδιορισμό των άμεσων αναγωγικών της MTT, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προστίθεται σε πρόσφατο διάλυμα MTT. Εάν το μείγμα MTT που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι ανάγει άμεσα την MTT και, επομένως, θα πρέπει να διενεργείται περαιτέρω λειτουργικός έλεγχος σε μη βιώσιμους ιστούς RhE, ανεξάρτητα από τη χρήση τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) ή διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας. Σε αυτόν τον πρόσθετο λειτουργικό έλεγχο χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένοι ιστοί με υπολειμματική μόνο μεταβολική δραστηριότητα, οι οποίοι, ωστόσο, απορροφούν την υπό δοκιμή χημική ουσία σε βαθμό παρόμοιο με τους βιώσιμους ιστούς. Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία που ανάγει την MTT εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο αδρανοποιημένα πανομοιότυπα δείγματα ιστού τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής προκειμένου να προκληθεί μη ειδική αναγωγή της MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Ένας μοναδικός μάρτυρας NSMTT ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών/σειρών δοκιμών που διεξάγονται. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στο αναγωγικό της MTT μείον την εκατοστιαία μη ειδική αναγωγή της MTT που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στο ίδιο αναγωγικό της MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που ελέγχθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSMTT).
30. Για τον προσδιορισμό της πιθανής παρεμπόδισης από έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χρωματίζονται όταν έρχονται σε επαφή με νερό ή ισοπροπανόλη και τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανάγκη χρήσης πρόσθετων μαρτύρων, θα πρέπει να εκτελείται φασματική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό (περιβάλλον κατά την έκθεση) και/ή σε ισοπροπανόλη (διάλυμα εκχύλισης). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία στο νερό και/ή σε ισοπροπανόλη απορροφά το φως σε φάσμα μηκών κύματος 570 ± 30 nm, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες χρωστικής, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, οπότε και δεν χρειάζονται τέτοιοι μάρτυρες (βλ. παραγράφους 33 και 34). Κατά την πραγματοποίηση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), κάθε έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία με παρεμποδιστική δράση εφαρμόζεται τουλάχιστον σε δύο πανομοιότυπα δείγματα βιώσιμου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής, αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης της MTT προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρας μη ειδικού χρώματος (NSC_{living}). Ο έλεγχος μάρτυρα NSC_{living} πρέπει να διενεργείται ταυτόχρονα με τον έλεγχο της έγχρωμης υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, σε περίπτωση πολλαπλών δοκιμών, πρέπει να διεξάγεται ανεξάρτητος έλεγχος NSC_{living} με κάθε εκτελούμενη δοκιμή (σε κάθε σειρά δοκιμών) λόγω της εγγενούς βιολογικής μεταβλητότητας των ζωντανών ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με το διάλυμα MTT, μείον την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{living}$).
31. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαπιστώνεται ότι προκαλούν άμεση αναγωγή της MTT (βλ. παράγραφο 29) και παρεμπόδιση λόγω χρώματος (βλ. παράγραφο 30) θα απαιτηθεί επίσης ένα τρίτο σύνολο μαρτύρων, πέραν των μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} που περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, κατά την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD). Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις σκουρόχρωμων υπό δοκιμή χημικών ουσιών που παρεμποδίζουν τη δοκιμασία MTT (π.χ. κυανές, ιώδεις, μαύρες), διότι το εγγενές χρώμα τους παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να ανάγουν απευθείας την MTT όπως περιγράφεται στην παράγραφο 29. Οι εν λόγω υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να δεσμεύονται από ζωντανούς και αδρανοποιημένους ιστούς και, συνεπώς, ο μάρτυρας NSMTT μπορεί να διορθώσει τη δοκιμή όχι μόνο ως προς την πιθανή άμεση αναγωγή της MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία αλλά και ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους αδρανοποιημένους ιστούς. Κατ' αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να προκύψει διπλή διόρθωση ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, δεδομένου ότι ο μάρτυρας NSC_{living} διορθώνει ήδη τη δοκιμή ως προς τηνπαρεμπόδιση

λόγω χρώματος που οφείλεται στη δέσμευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους ζωντανούς ιστούς. Για την αποφυγή πιθανής διπλής διόρθωσης ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, πρέπει να χρησιμοποιείται τρίτος μάρτυρας μη ειδικής εμφάνισης χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς (NSC_{killed}). Σε αυτόν τον πρόσθετο μάρτυρα, η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα αδρανοποιημένου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης MTT. Ένας μοναδικός μάρτυρας NSC_{killed} ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών δοκιμών/σειρών δοκιμών που εκτελούνται, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα NSMTT και, ει δυνατόν, με την ίδια παρτίδα ιστών. Στη συνέχεια εκτιμάται η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία μείον τον %NSMTT μείον τον $\%NSC_{living}$ συν την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{killed}$).

32. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι παρεμποδίσεις λόγω μη ειδικής αναγωγής της MTT και λόγω μη ειδικού χρώματος ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα να αυξηθούν οι μετρήσεις από το εκχύλισμα ιστού πάνω από την περιοχή τιμών γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου. Με βάση τα παραπάνω, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τη γραμμική περιοχή τιμών του φασματοφωτόμετρού του με φορμαζάνη MTT (CAS # 57360-69-7) από εμπορική πηγή, προτού ξεκινήσει τις δοκιμές χημικών ουσιών για κανονιστικούς σκοπούς. Η τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) με χρήση φασματοφωτόμετρου είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση άμεσων αναγωγικών της MTT και υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν παρεμπόδιση λόγω χρώματος, όταν οι OD των εκχυλισμάτων ιστών που λαμβάνονται με την υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς διόρθωση ως προς την άμεση αναγωγή της MTT και/ή την παρεμπόδιση λόγω χρώματος περιλαμβάνονται εντός της γραμμικής περιοχής τιμών του φασματοφωτόμετρου ή όταν η μη διορθωμένη εκατοστιαία βιωσιμότητα που μετράται με την υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ήδη ≤ 50 %. Εντούτοις, τα αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες με τις οποίες προκύπτει %NSMTT και/ή $\%NSC_{living}$ ≥ 50 % του αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφυλακτικότητα, διότι αυτή είναι η τιμή αποκοπής που χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ ταξινομημένων και μη ταξινομημένων χημικών ουσιών (βλ. παράγραφο 36).

33. Όσον αφορά έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι συμβατές με την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) λόγω υπερβολικά έντονης παρεμπόδισης με τη δοκιμασία MTT, μπορεί να χρησιμοποιείται η εναλλακτική διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (βλ. παράγραφο 34) (36). Το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας επιτρέπει τον διαχωρισμό της φορμαζάνης MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της (36). Για αυτόν τον λόγο, δεν χρειάζονται ποτέ μάρτυρες NSC_{living} ή NSC_{killed} όταν χρησιμοποιείται HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία, ανεξάρτητα από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Θα πρέπει ωστόσο να χρησιμοποιούνται μάρτυρες NSMTT εάν υπάρχει υπόνοια ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ανάγει άμεσα την MTT ή έχει χρώμα που παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητας άμεσης αναγωγής της MTT (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 29). Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι ικανές να ανάγουν άμεσα την MTT, η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, μείον το %NSMTT. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι άμεσοι αναγωγείς της MTT, οι οποίοι μπορεί επίσης να έχουν παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος και οι οποίοι κατακρατούνται στους ιστούς μετά την αγωγή και ανάγουν την MTT σε τέτοιο βαθμό ώστε να δίνουν OD (με τυπική μέτρηση OD) ή εμβαδά κορυφών (με χρήση UPLC/HPLC-φασματοφωτομετρίας) των υπό δοκιμή εκχυλισμάτων ιστών που είναι εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν, αν και δεν αναμένεται να εμφανίζονται παρά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις.

34. Η HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με όλα τα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (έγχρωμων, μη έγχρωμων, αναγωγικών της MTT και μη αναγωγικών της MTT) για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (36). Λόγω της ποικιλίας των συστημάτων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, πριν από τη χρήση ενός τέτοιου συστήματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT από εκχυλίσματα ιστών θα πρέπει να καταδεικνύεται η καταλληλότητά του για τον συγκεκριμένο σκοπό διά της εκπλήρωσης των κριτηρίων αποδοχής για σειρά τυποποιημένων παραμέτρων συμμόρφωσης που βασίζονται στις παραμέτρους που περιγράφονται στην καθοδήγηση της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για τον κλάδο σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (36)(37). Οι εν λόγω κύριες παράμετροι και τα κριτήρια αποδοχής τους παρατίθενται στο προσάρτημα 4. Εφόσον εκπληρούνται τα κριτήρια αποδοχής που καθορίζονται στο προσάρτημα 4, το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θεωρείται κατάλληλο και έτοιμο για μέτρηση της φορμαζάνης MTT υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Κριτήρια αποδοχής

35. Για κάθε μέθοδο δοκιμών στην οποία χρησιμοποιούνται έγκυρες παρτίδες μοντέλου RhE (βλ. παράγραφο 23), η OD των ιστών που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να αντιστοιχεί στην ποιότητα των ιστών στους οποίους εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια της αποστολής και παραλαβής και όλες οι διεργασίες του πρωτοκόλλου. Οι τιμές OD των μαρτύρων δεν πρέπει να είναι χαμηλότερες από τα ιστορικά καθορισμένα όρια. Παρομοίως, ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλ. υδατικό διάλυμα SDS 5 %, θα πρέπει να δείχνουν την ικανότητά τους να αποκρίνονται σε ερεθιστική χημική ουσία στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (βλ. προσάρτημα 3 και, για περισσότερες πληροφορίες, τις SOP των τεσσάρων μοντέλων δοκιμών που περιλαμβάνονται στην παρούσα TG (32) (33) (34) (35)). Οι σχετικές και κατάλληλες μετρήσεις της μεταβλητότητας μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών, δηλαδή οι τυπικές αποκλίσεις (SD), θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των ορίων αποδοχής που καθορίστηκαν για το χρησιμοποιούμενο μοντέλο δοκιμών (βλ. προσάρτημα 3).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

36. Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού βιωσιμότητας με κανονικοποίηση ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Η τιμή αποκοπής για την ποσοστιαία κυτταρική βιωσιμότητα, η οποία διακρίνει τις ερεθιστικές από τις μη ταξινομούμενες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, και οι στατιστικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τον προσδιορισμό των ερεθιστικών χημικών ουσιών, πρέπει να καθορίζονται επακριβώς, να τεκμηριώνονται και να είναι αποδεδειγμένα κατάλληλες (για πληροφορίες, βλ. SOP των μοντέλων δοκιμών). Οι τιμές αποκοπής για την πρόβλεψη του ερεθισμού είναι οι εξής:

— Η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι υπόκειται σε ταξινόμηση και επισήμανση σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (κατηγορία 2 ή κατηγορία 1) όταν η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση (≤) με 50 %. Δεδομένου ότι με τα μοντέλα δοκιμών RhE που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν είναι εφικτή η διάκριση μεταξύ των κατηγοριών 1 και 2 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP, για να προσδιοριστεί η τελική ταξινόμησή της χρειάζονται συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τη διάβρωση του δέρματος [βλ. επίσης το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την IATA (3)]. Σε περίπτωση που διαπιστωθεί ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι μη διαβρωτική (π.χ. με βάση τη μέθοδο δοκιμών TM.40, B.40α ή B.65) και ότι η βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση (≤) με 50 %, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ερεθιστική για το δέρμα σύμφωνα με την κατηγορία 2 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP.

— Ανάλογα με το ρυθμιστικό πλαίσιο των κρατών μελών, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να θεωρηθεί μη ερεθιστική για το δέρμα σύμφωνα με την κατάταξη «Καμία κατηγορία» του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP εάν η βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την αγωγή υπερβαίνει (>) το 50 %.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

37. Για κάθε μέτρηση, πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους πανομοιότυπο δείγμα ιστών (π.χ. τιμές OD και υπολογισθείσα εκατοστιαία κυτταρική βιωσιμότητα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, πρέπει να αναφέρονται, για κάθε μέτρηση, οι μέσες τιμές ± SD. Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με το αντιδραστήριο MTT και τις έγχρωμες ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

Έκθεση δοκιμής

38. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και τυχόν πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Μοντέλο RhE και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν (και αιτιολόγησή της επιλογής, κατά περίπτωση)

Συνθήκες δοκιμής:

— μοντέλο XRhE που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένου του αριθμού παρτίδας),

— στοιχεία βαθμονόμησης για τη συσκευή μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο), μήκος κύματος και ζώνη διάβασης (κατά περίπτωση) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT, και περιοχή τιμών γραμμικότητας της συσκευής μέτρησης, περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT,

— περιγραφή των στοιχείων που αποδεικνύουν ότι το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας πληροί τα κριτήρια καταλληλότητας, κατά περίπτωση, πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο RhE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Αυτά πρέπει να περιλαμβάνουν τουλάχιστον τα ακόλουθα:

i) βιωσιμότητα,

ii) λειτουργία φραγμού,

iii) μορφολογία,

iv) αναπαραγωγιμότητα και ικανότητα πρόβλεψης,

v) ποιοτικούς έλεγχους του μοντέλου,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, και ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες ώστε να τεκμηριώνεται η αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου,

— κατάδειξη της τεχνικής ικανότητας διεξαγωγής της μεθόδου δοκιμών προτού χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική μέσω ελέγχου των ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Διαδικασία δοκιμής:

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης που χρησιμοποιήθηκαν μετά την περίοδο έκθεσης), χρησιμοποιηθείσα δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των μαρτύρων,

— διάρκεια και θερμοκρασία περιόδου έκθεσης και επώασης μετά την έκθεση,

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT ή /και έγχρωμες, κατά περίπτωση,

— αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ανά υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας και NSMTT, NSC_{living} και NSC_{killed}, κατά περίπτωση),

— περιγραφή των κριτηρίων απόφασης/μοντέλου πρόβλεψης που εφαρμόστηκαν με βάση το χρησιμοποιηθέν μοντέλο RhE,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμών (περιλαμβανομένων των διαδικασιών έκπλυσης).

Κριτήρια της σειράς δοκιμών και της αποδοχής δοκιμής:

— μέσες τιμές και πεδία τιμών αποδοχής του θετικού και αρνητικού μάρτυρα βάσει ιστορικών δεδομένων, αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Αποτελέσματα:

— δεδομένα σε μορφή πίνακα για την επιμέρους υπό δοκιμή χημική ουσία για κάθε σειρά δοκιμών και κάθε μέτρηση πανομοιότυπου δείγματος, περιλαμβανομένης της OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, της εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών και των SD,

— κατά περίπτωση, αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν για τα άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της τιμής OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, του %NSMTT, του $\%NSC_{living}$, του $\%NSC_{killed}$, των SD και της τελικής ορθής εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών,

— αποτελέσματα που προέκυψαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες και τους μάρτυρες σε σχέση με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής για τη σειρά δοκιμών και τη δοκιμή,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(5) Κεφάλαιο B.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER).

(6) Κεφάλαιο B.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: Μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE)

(7) Κεφάλαιο B.65 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης *in vitro*.

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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. *ΣΗΜΕΙΩΣΗ Αυτά είναι τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των δύο μεθόδων δοκιμών. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλέον, καθώς υπάρχει διαθέσιμη επικαιροποιημένη έκδοση (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al*. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *ΣΗΜΕΙΩΣΗ Αυτή είναι η ισχύουσα έκδοση των προτύπων επιδόσεων ECVAM, η οποία επικαιροποιήθηκε το 2009 ενόψει της εφαρμογής του GHS του ΟΗΕ. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλέον, διότι υπάρχει πλέον διαθέσιμη επικαιροποιημένη έκδοση (8) η οποία σχετίζεται με την παρούσα TG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) ΕC (2001). Οδηγία 2001/59/ΕΚ της Επιτροπής, της 6ης Αυγούστου 2001, σχετικά με την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για εικοστή όγδοη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης L225, 1-333.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, κυανό του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με τη μετρούμενη παράμετρο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή την ζωτικότητα των ζωντανών κυττάρων

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μοντέλων δοκιμών με τα οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (9).

ET_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης, βλ. επίσης IC_{50}.

GHS (Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την ταξινόμηση και επισήμανση των χημικών προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση).

IC_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}) μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλ. επίσης ET_{50}.

Πλεονάζουσα δόση: ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιδερμικής επιφάνειας.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NSC_{killed}: (Non-Specific Colour in killed tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς.

NSC_{living}: (Non-Specific Colour in living tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζωντανούς ιστούς.

NSMTT: (Non-Specific MTT reduction) μη ειδική αναγωγή της MTT.

Πρότυπα επιδόσεων (Performance standards, PS): πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και (iii) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (9).

PC: (Positive Control) θετικός μάρτυρας, πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με χημική ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (9).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (9).

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική και αποδεκτή για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιπτώσεις δοκιμής και υπό δοκιμή χημικές ουσίες (9).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με αρνητικό μάρτυρα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

In vivo *ερεθισμός του δέρματος*: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά την εφαρμογή υπό δοκιμή ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Ο ερεθισμός του δέρματος είναι τοπικά εμφανιζόμενη αντίδραση του επηρεαζόμενου δερματικού ιστού και παρουσιάζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη διέγερση (38). Οφείλεται σε τοπική φλεγμονώδη αντίδραση του εγγενούς (μη ειδικού) ανοσοποιητικού συστήματος του δερματικού ιστού. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι πρόκειται για αναστρέψιμη διαδικασία που περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τα περισσότερα κλινικά συμπτώματα του ερεθισμού (ερύθημα, οίδημα, κνησμό και πόνο) που συνδέονται με φλεγμονή.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

UPLC: υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Προσάρτημα 2

ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ

Αρ.	Ονομασία μοντέλου δοκιμών	Είδος μελέτης επικύρωσης	Παραπομπές
1	EpiSkin™	Πλήρης προοπτική μελέτη επικύρωσης (2003-2007). Τα στοιχεία του εν λόγω μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των βασικών στοιχείων της μεθόδου δοκιμών των αρχικών και των επικαιροποιημένων προτύπων επιδόσεων ECVAM PS (39) (40) (21) (*). Επιπλέον, τα δεδομένα της μεθόδου που σχετίζονται με τη διάκριση μεταξύ ταξινομούμενων και μη ταξινομούμενων ουσιών αποτέλεσαν κατά κύριο λόγο τη βάση για τον προσδιορισμό της ειδικότητας και της ευαισθησίας των αρχικών προτύπων επιδόσεων (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*αρχικό*): Αρχικά, το μοντέλο δοκιμών υποβλήθηκε σε πλήρη προοπτική επικύρωση μαζί με το υπ' αριθ. 1 από το 2003-2007. Τα στοιχεία του εν λόγω μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των βασικών στοιχείων των μεθόδων δοκιμών των αρχικών και των επικαιροποιημένων προτύπων επιδόσεων ECVAM PS (39) (40) (21) (*).	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)
		EpiDerm™ SIT (EPI-200): Μια τροποποίηση του αρχικού EpiDerm™ επικυρώθηκε με χρήση των αρχικών προτύπων επιδόσεων ECVAM (21) το 2008 (*)	(2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Μελέτη επικύρωσης με βάση τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων ECVAM (21) του 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Μελέτη επικύρωσης (2011-2012) με βάση τα πρότυπα επιδόσεων της TG 439 του ΟΟΣΑ (8) που βασίζονται στα επικαιροποιημένα πρότυπα επιδόσεων ECVAM PS (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) και πρότυπα επιδόσεων της εν λόγω TG (8) (*)

(*) Τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων ECVAM (21) αναπτύχθηκαν το 2007 με την ολοκλήρωση της προοπτικής μελέτης επικύρωσης (16) στο πλαίσιο της οποίας αξιολογήθηκαν οι επιδόσεις των μοντέλων δοκιμών αρ. 1 και 2 με βάση το σύστημα ταξινόμησης που περιγράφεται στην 28η τροποποίηση της οδηγίας της ΕΕ για τις επικίνδυνες ουσίες (41). Το 2008 θεσπίστηκαν το GHS του ΟΗΕ (1) και ο κανονισμός CLP της ΕΕ, βάσει των οποίων η τιμή αποκοπής για τη διάκριση των μη ταξινομούμενων από τις ταξινομούμενες ουσίες μετατοπίστηκε ουσιαστικά από βαθμολογία *in vivo* 2,0 σε 2,3. Για λόγους προσαρμογής στην εν λόγω κανονιστική απαίτηση, το 2009 επικαιροποιήθηκαν οι τιμές ορθότητας και ο κατάλογος χημικών ουσιών αναφοράς των προτύπων επιδόσεων ECVAM (2) (39) (40). Όπως τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων, έτσι και τα επικαιροποιημένα πρότυπα επιδόσεων βασίστηκαν εν πολλοίς σε δεδομένα από τα μοντέλα αρ. 1 και 2 (16), αλλά και σε πρόσθετα δεδομένα σχετικά με χημικές ουσίες αναφοράς από το μοντέλο αρ. 3. Το 2010, τα επικαιροποιημένα πρότυπα επιδόσεων ECVAM χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των προτύπων επιδόσεων που σχετίζονται με την εν λόγω TG (8). Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμής, ως επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (VRM) θεωρείται το EpiSkin™, λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη όλων των κριτηρίων των προτύπων επιδόσεων. Αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τις μελέτες επικύρωσης, μια συλλογή των δεδομένων που παρήχθησαν καθώς και το ιστορικό των απαιτούμενων προσαρμογών των προτύπων επιδόσεων λόγω της εφαρμογής του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP διατίθενται στο επεξηγηματικό γενικό έγγραφο ECVAM/BfR της αντίστοιχης TG 439 του ΟΟΣΑ (23).

SIT: (Skin Irritation Test) δοκιμή ερεθισμού του δέρματος.

RHE: (Reconstructed Human Epidermis) ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα.

Προσάρτημα 3

Παραμετροι Πρωτοκολλου για Καθενα απο τα Μοντελα Δοκιμων που Περιλαμβανονται Στην Παρουσα Μεθοδο Δοκιμων

Τα μοντέλα RhE ακολουθούν πολύ όμοια πρωτόκολλα, αξίζει δε να σημειωθεί ότι χρησιμοποιούν όλα περίοδο 42 ωρών μετά την επώαση (32) (33) (34) (35). Οι αποκλίσεις αφορούν κυρίως τις εξής τρεις παραμέτρους που σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες φραγμού των μοντέλων δοκιμών: α) χρόνος και όγκος πριν την επώαση, β) εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και γ) όγκος μετά την επώαση.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
Α) Πριν την επώαση				
Χρόνος επώασης	18- 24 ώρες	18-24 ώρες	< 2 ώρες	15-30 ώρες
Όγκος θρεπτικού μέσου	2 ml	0,9 ml	0,3 ή 1 ml	0,5 ml
Β) Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας				
Για υγρά	10 μl (26 μl/cm^2)	30 μl (47 μl/cm^2)	16 μl (32 μl/cm^2)	25 μl (83 μl/cm^2)
Για στερεά	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)
Χρήση πλέγματος από νάιλον	Δεν χρησιμοποιείται	Εφόσον απαιτείται	Εφαρμόζεται	Δεν χρησιμοποιείται
Συνολικός χρόνος εφαρμογής	15 λεπτά	60 λεπτά	42 λεπτά	15 λεπτά
Θερμοκρασία εφαρμογής	RT	α) σε RT για 25 λεπτά β) στους 37°C για 35 λεπτά	RT	RT
Γ) 'Ογκος μετά την επώαση				
Όγκος θρεπτικού μέσου	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
Δ) Μέγιστη αποδεκτή απόκλιση				
Τυπική απόκλιση μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: θερμοκρασία δωματίου
DW: απεσταγμένο νερό
DPBS: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Dulbecco

Προσάρτημα 4

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC/UPLC-ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗΣ MTT ΠΟΥ ΕΚΧΥΛΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ RHE

Παράμετρος	Πρωτόκολλο από την καθοδήγηση της FDA (36) (37)	Κριτήρια αποδοχής
Επιλεκτικότητα	Ανάλυση ισοπροπανόλης, ζωντανού τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από ζωντανούς ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή), αδρανοποιημένου τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από αδρανοποιημένους ιστούς RhE χωρίς καμία αγωγή)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$ (1)
Ακρίβεια	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου (φορμαζάνη MTT στα 1,6 μg/ml, 16 μg/ml και 160 μg/ml) σε ισοπροπανόλη (n=5)	CV ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Ορθότητα	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	%Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Φαινόμενο μήτρας	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=5)	85 % ≤ φαινόμενο μήτρας % ≤ 115 %
Μεταφορά υλικού	Ανάλυση ισοπροπανόλης μετά από πρότυπο ULOQ (2)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$
Αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας)	3 ανεξάρτητες καμπύλες βαθμονόμησης (με βάση 6 διαδοχικές αραιώσεις φορμαζάνης MTT 1:3 σε ισοπροπανόλη, ξεκινώντας από το ULOQ, δηλαδή 200 μg/ml), μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	Καμπύλες βαθμονόμησης: %Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου: %Dev ≤ 15 % και CV ≤ 15 %
Αναπαραγωγιμότητα (μεταξύ ημερών)	1η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 2η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) 3η ημέρα: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3)	
Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από 24 ώρες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου	%Dev ≤ 15 %
Μακροπρόθεσμη σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhE, εφόσον απαιτείται	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από αρκετές ημέρες φύλαξης σε καθορισμένη θερμοκρασία (π.χ. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %»

(1) LLOQ: Κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να καλύπτει βιωσιμότητα ιστού 1-2 %, δηλαδή 0,8 μg/ml.
(2) ULOQ: Ανώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερο από την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση φορμαζάνης MTT σε εκχυλίσματα ισοπροπανόλης από αρνητικούς μάρτυρες, δηλαδή 200 μg/ml.

8) Στο μέρος Β προστίθενται τα ακόλουθα κεφάλαια:

«Β.63 **ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 421 του ΟΟΣΑ (2016). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο χημικών ουσιών αναθεωρούνται ανά διαστήματα ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι εξελίξεις στον επιστημονικό τομέα. Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών διαλογής 421 εγκρίθηκε το 1995, βάσει ενός πρωτοκόλλου για την προκαταρκτική δοκιμή διαλογής τοξικότητας στην αναπαραγωγή που συζητήθηκε σε δύο συναντήσεις εμπειρογνωμόνων, στο Λονδίνο το 1990 (1) και στο Τόκυο το 1992 (2).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει επικαιροποιηθεί με παραμέτρους που αφορούν τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, στο πλαίσιο της δράσης πρώτης προτεραιότητας που ξεκίνησε ο ΟΟΣΑ το 1998 με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών και την ανάπτυξη νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τη διεξαγωγή δοκιμών σε δυνητικούς ενδοκρινικούς διαταράκτες (3). Για παράδειγμα, η TG 407 (μελέτη τοξικότητας από το στόμα, 28 ημερών, με επαναλαμβανόμενη δόση σε τρωκτικά, κεφάλαιο Β.7 του παρόντος παραρτήματος) του ΟΟΣΑ, ενισχύθηκε το 2008 με παραμέτρους κατάλληλες για την ανίχνευση ενδοκρινικής δραστηριότητας υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Ο στόχος της επικαιροποίησης της TG 421 ήταν η συμπερίληψη ορισμένων παραμέτρων σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες σε TG διαλογής στις οποίες οι περίοδοι έκθεσης καλύπτουν ορισμένες από τις ευαίσθητες περιόδους κατά την ανάπτυξη (προγεννητική ή πρώτη μεταγεννητική περίοδος).

3. Οι επιλεχθείσες πρόσθετες παράμετροι σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, που αποτελούν επίσης μέρος της TG 443 (εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς, κεφάλαιο Β.56 του παρόντος παραρτήματος), περιλήφθηκαν στην TG 421 βάσει μελέτης σκοπιμότητας στην οποία θίγονται επιστημονικά και τεχνικά θέματα που σχετίζονται με τη συμπερίληψή τους, καθώς και πιθανές προσαρμογές του σχεδιασμού δοκιμής που χρειάζονται για τη συμπερίληψή τους (4).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στις αναπαραγωγικές επιδόσεις αρσενικών και θηλυκών ατόμων, όπως η λειτουργία των γονάδων, η συμπεριφορά ζευγαρώματος, η σύλληψη, η ανάπτυξη του κυήματος και ο τοκετός. Δεν αποτελεί εναλλακτική μέθοδο ούτε αντικαθιστά τις υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών Β.31, Β.34, Β.35 ή Β.56.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών διαλογής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παροχή αρχικών πληροφοριών σχετικά με τις πιθανές επιδράσεις στην αναπαραγωγή και/ή την ανάπτυξη, είτε σε πρώιμο στάδιο της αξιολόγησης των τοξικολογικών ιδιοτήτων χημικών ουσιών είτε σχετικά με χημικές ουσίες που προκαλούν ανησυχία. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μέρος ενός συνόλου αρχικών δοκιμών διαλογής για υπάρχουσες χημικές ουσίες για τις οποίες οι διαθέσιμες τοξικολογικές πληροφορίες είναι ελάχιστες ή ανύπαρκτες, ως μελέτη προσδιορισμού εύρους δόσεων με σκοπό τη διεξαγωγή πιο εκτεταμένων μελετών της αναπαραγωγής/ανάπτυξης, ή όταν θεωρηθεί για άλλους λόγους κατάλληλη. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σχετικά με την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών σημείων ως ανώδυνων παραμέτρων για τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε αξιολογήσεις ασφάλειας (5).

6. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για όλες τις πτυχές της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει περιορισμένα μόνο μέσα ανίχνευσης των μεταγεννητικών εκδηλώσεων της προγεννητικής έκθεσης, ή των επαγόμενων κατά τη μεταγεννητική έκθεση πιθανών επιδράσεων. Λόγω (μεταξύ άλλων) των σχετικά μικρών αριθμών ζώων που περιλαμβάνονται στις ομάδες δόσεων, της επιλεκτικότητας των παραμέτρων και της μικρής διάρκειας της μελέτης, η παρούσα μέθοδος δεν θα παρέχει αποδεικτικά στοιχεία που να στηρίζουν οριστικούς ισχυρισμούς περί ανυπαρξίας επιδράσεων. Επιπλέον, σε περίπτωση απουσίας δεδομένων από άλλες δοκιμές τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, τα θετικά αποτελέσματα είναι χρήσιμα για την αρχική αξιολόγηση της επικινδυνότητας και συμβάλλουν στη διαδικασία λήψης αποφάσεων όσον αφορά την αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής πρόσθετων δοκιμών.

7. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σχετικές με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρους θα πρέπει να μελετώνται στο πλαίσιο του εννοιολογικού πλαισίου για τον έλεγχο και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) του ΟΟΣΑ (6). Σε αυτό το εννοιολογικό πλαίσιο, η ενισχυμένη TG 421 του ΟΟΣΑ περιλαμβάνεται στο επίπεδο 4 ως *in vivo* δοκιμασία που παρέχει δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις των παραμέτρων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα. Εντούτοις, ένα ενδοκρινικό σήμα μπορεί να μη θεωρηθεί επαρκώς ισχυρό στοιχείο ώστε μια χημική ουσία να χαρακτηριστεί ενδοκρινικός διαταράκτης.

8. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών θεωρείται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται από το στόμα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλες οδοί έκθεσης, ενδέχεται να χρειαστούν τροποποιήσεις.

9. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

10. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται σε διαβαθμισμένες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Η χορήγηση των δόσεων στα αρσενικά θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες και να φθάνει μέχρι και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση (σε αυτό το χρονοδιάγραμμα περιλαμβάνονται τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν το ζευγάρωμα, η περίοδος του ζευγαρώματος και περίπου δύο εβδομάδες μετά το ζευγάρωμα). Δεδομένης της περιορισμένης περιόδου χορήγησης των δόσεων στα αρσενικά πριν από το ζευγάρωμα, η γονιμότητα ενδέχεται να μην αποτελεί ιδιαίτερα ευαίσθητο δείκτη της τοξικότητας στους όρχεις. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διεξαγωγή αναλυτικής ιστολογικής εξέτασης. Ο συνδυασμός περιόδου χορήγησης πριν από το ζευγάρωμα διάρκειας δύο εβδομάδων και επακόλουθων παρατηρήσεων όσον αφορά το ζευγάρωμα/γονιμότητα με συνολική περίοδο χορήγησης τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων, ακολουθούμενων από αναλυτική ιστοπαθολογική εξέταση των γονάδων των αρσενικών, θεωρείται επαρκής για την ανίχνευση της πλειονότητας των επιδράσεων στη γονιμότητα των αρσενικών και τη σπερματογένεση.

12. Η χορήγηση δόσεων στα θηλυκά θα πρέπει να διαρκεί καθ' όλο το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης. Η εν λόγω χορήγηση περιλαμβάνει δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα (με στόχο να καλυφθούν τουλάχιστον δύο πλήρεις κύκλοι οίστρου), το μεταβλητό χρονικό διάστημα μέχρι τη σύλληψη, τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τουλάχιστον δεκατρείς ημέρες μετά τη γέννηση, έως και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση.

13. Η διάρκεια της μελέτης, μετά τον εγκλιματισμό και την αξιολόγηση του κύκλου οίστρου πριν από τη χορήγηση των δόσεων, εξαρτάται από τις επιδόσεις των θηλυκών και είναι κατά προσέγγιση 63 ημέρες [τουλάχιστον 14 ημέρες πριν από το ζευγάρωμα, (έως) 14 ημέρες ζευγαρώματος, 22 ημέρες κύησης, 13 ημέρες γαλουχίας].

14. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τυχόν συμπτώματα τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής νεκροτομούνται και, στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή ζωικού είδους

15. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για χρήση με επίμυ. Η διερεύνηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών σε άλλα είδη τρωκτικών πρέπει να αιτιολογείται αναλυτικά. Στο διεθνές πρόγραμμα επικύρωσης για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών της TG 407 του ΟΟΣΑ (που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος), ο επίμυς ήταν το μόνο είδος που χρησιμοποιήθηκε. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται φυλές με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών ελαττωμάτων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή παρθένα ζώα, που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειράματα. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, το φύλο, το βάρος και την ηλικία. Στην αρχή της μελέτης, η διακύμανση των βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το 20 % της μέσης τιμής για κάθε φύλο. Σε περίπτωση που η μελέτη διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροχρόνιας μελέτης ή μελέτης πλήρους γενεάς, συνιστάται να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης.

Στέγαση και διατροφή

16. Σε όλες οι διαδικασίες πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος 12ωρη. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω της παρούσας μεθόδου, η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης ανάμειξης της ουσίας.

17. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Επιτρέπεται η ατομική στέγαση, εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, κάθε κλωβός δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από πέντε ζώα. Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κλωβούς κατάλληλους για τον σκοπό αυτό. Τα έγκυα θηλυκά θα πρέπει να στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς και θα πρέπει να τους παρέχονται υλικά φωλιάσματος. Τα θηλυκά κατά τη γαλουχία τοποθετούνται σε ατομικούς κλωβούς μαζί με τα νεογνά τους.

18. Η τροφή πρέπει να υποβάλλεται τακτικά σε ανάλυση ώστε να εντοπίζονται τυχόν ξένες προσμείξεις. Ένα δείγμα του σιτηρεσίου θα πρέπει να διατηρείται έως την οριστικοποίηση της έκθεσης.

Προετοιμασία των ζώων

19. Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Τα ζώα ταυτοποιούνται με αποκλειστικό αναγνωριστικό και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

Παρασκευή των δόσεων

20. Συνιστάται η χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το στόμα, εκτός εάν θεωρούνται καταλληλότερες άλλες οδοί χορήγησης. Όταν επιλέγεται η οδός από το στόμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται συνήθως με στομαχικό καθετήρα· εντούτοις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν εναλλακτικά να χορηγούνται μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού.

21. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται, οσάκις είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, κατόπιν το ενδεχόμενο διαλύματος/γαλακτώματος σε λάδι (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, τέλος, η χρήση διαλύματος σε άλλους φορείς. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, θα πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα και η ομοιογένεια της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

22. Συνιστάται κάθε ομάδα να περιλαμβάνει αρχικά τουλάχιστον 10 αρσενικά και 12-13 θηλυκά. Πριν από την έκθεση, θα αξιολογείται η κυκλικότητα του οίστρου των θηλυκών και τα ζώα που δεν παρουσιάζουν τυπικούς κύκλους 4-5 ημερών δεν θα περιλαμβάνονται στη μελέτη· ως εκ τούτου, συνιστάται η προσθήκη επιπλέον θηλυκών στις ομάδες ώστε αυτές να αποτελούνται από 10 θηλυκά έκαστη. Εκτός της περίπτωσης έντονων τοξικών επιδράσεων, αναμένεται ότι κατ' αυτόν τον τρόπο θα εξασφαλίζονται τουλάχιστον 8 έγκυα θηλυκά ανά ομάδα, που είναι συνήθως ο ελάχιστος αποδεκτός αριθμός έγκυων θηλυκών ανά ομάδα. Στόχος είναι να προκαλούνται επαρκείς κυοφορίες και απόγονοι για να εξασφαλίζεται η ουσιαστική αξιολόγηση της ικανότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην κύηση, στη μητρική συμπεριφορά και στη συμπεριφορά θηλασμού των ζώων, καθώς και στην αύξηση και την ανάπτυξη των απογόνων της F_1 από τη σύλληψη ως τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό.

Δοσολογία

23. Κατά κανόνα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες δοκιμής και μία ομάδα μαρτύρων. Τα επίπεδα των δόσεων μπορούν να καθορίζονται βάσει πληροφοριών από δοκιμές οξείας τοξικότητας ή αποτελέσματα από μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης. Εκτός από τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η ομάδα μαρτύρων πρέπει να λαμβάνει τον φορέα στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

24. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη τυχόν υφιστάμενων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο-)κινητική. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ενδέχεται να υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ έγκυων και μη έγκυων ζώων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να προκαλέσει τοξικές εκδηλώσεις, όχι όμως τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Στη συνέχεια επιλέγεται φθίνουσα σειρά δοσολογικών επιπέδων με σκοπό τον εντοπισμό απόκρισης συνδεόμενης με τη δόση και του χαμηλότερου επιπέδου δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL). Για τον καθορισμό της φθίνουσας σειράς δοσολογικών επιπέδων η βέλτιστη επιλογή είναι συνήθως ο υποδιπλασιασμός ή υποτετραπλασιασμός, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων συντελεστών (π.χ. άνω του 10) μεταξύ των δόσεων.

25. Όταν παρατηρείται γενική τοξικότητα (π.χ. μειωμένο βάρος σώματος, επιδράσεις στο ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες, τους νεφρούς κ.λπ.) ή άλλη αλλαγή που μπορεί να μην είναι τοξική αντίδραση (π.χ. μειωμένη πρόσληψη τροφής, διόγκωση του ήπατος), οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις παραμέτρους που συνδέονται με ευαισθησία του ενδοκρινικού συστήματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Οριακή δοκιμή

26. Εάν μια δοκιμή από το στόμα σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφόσον πρόκειται για χορήγηση μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού, με αντίστοιχη εκατοστιαία αναλογία στο σιτηρέσιο ή στο πόσιμο νερό, δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει των διαθέσιμων δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται τοξικότητα, η πλήρης μελέτη με αρκετά επίπεδα δόσης μπορεί να μην είναι απαραίτητη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οριακή δοκιμή, εκτός εάν, με βάση την έκθεση του ανθρώπου, διαφαίνεται η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης από το στόμα. Σε περίπτωση χορήγησης από άλλη οδό, όπως εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα, η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση μπορεί να εξαρτάται συχνά από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των υπό δοκιμή ουσιών.

Χορήγηση των δόσεων

27. Η δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα ζώα χορηγείται καθημερινά επί 7 ημέρες την εβδομάδα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός της περίπτωσης υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συνήθως προκαλούν εντονότερες επιδράσεις, η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω του σιτηρεσίου, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης, εκφρασμένο επί του βάρους σώματος του ζώου. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα, η δόση θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε μέρα και να ρυθμίζεται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος.

Χρονοδιάγραμμα πειράματος

29. Η χορήγηση δόσεων και στα δύο φύλα θα πρέπει να ξεκινά τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα, αφού έχουν εγκλιματιστεί για τουλάχιστον πέντε ημέρες και τα θηλυκά έχουν υποβληθεί σε διαδικασία διαλογής ως προς την κανονικότητα των κύκλων οίστρου (στη διάρκεια περιόδου δύο εβδομάδων πριν από την αγωγή). Η μελέτη θα πρέπει να προγραμματίζεται κατά τρόπον ώστε η αξιολόγηση των κύκλων οίστρου να ξεκινά σε σύντομο χρονικό διάστημα αφότου τα ζώα έχουν φθάσει σε πλήρη σεξουαλική ωρίμανση. Το εν λόγω διάστημα μπορεί να διαφέρει ελαφρώς για διαφορετικές φυλές επιμύων σε διαφορετικά εργαστήρια, π.χ. επίμυες Sprague Dawley ηλικίας 10 εβδομάδων, επίμυες Wistar ηλικίας περίπου 12 εβδομάδων. Οι μητέρες με απογόνους πρέπει να θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σύντομα μετά από αυτό. Η ημέρα γέννησης (όταν έχει ολοκληρωθεί ο τοκετός) ορίζεται ως η ημέρα 0 μετά τον τοκετό. Τα θηλυκά που δεν εμφανίζουν ενδείξεις συνουσίας θανατώνονται 24-26 ημέρες μετά την τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος. Η χορήγηση συνεχίζεται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος. Στα αρσενικά η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται και μετά την περίοδο ζευγαρώματος, τουλάχιστον έως ότου ολοκληρωθεί η ελάχιστη συνολική περίοδος χορήγησης των 28 ημερών. Στη συνέχεια θανατώνονται ή, εναλλακτικά, διατηρούνται και συνεχίζουν να λαμβάνουν δόσεις με σκοπό την πιθανή πραγματοποίηση δεύτερου ζευγαρώματος, εάν χρειαστεί.

30. Η καθημερινή χορήγηση στα γονικά θηλυκά θα πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και τουλάχιστον μέχρι και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό ή την ημέρα πριν τη θανάτωση. Για μελέτες όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω εισπνοής ή διά του δέρματος, η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον μέχρι και τη 19η ημέρα της κύησης, και θα πρέπει να ξεκινά εκ νέου το συντομότερο δυνατό, το αργότερο μέχρι την 4η ημέρα μετά τη γέννηση.

31. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής των πειραμάτων.

Διαδικασία ζευγαρώματος

32. Κανονικά, στην παρούσα μελέτη θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζευγαρώματα 1:1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό). Μπορεί να υπάρξουν εξαιρέσεις, στην περίπτωση περιστασιακών θανάτων αρσενικών. Το θηλυκό θα πρέπει να τοποθετείται μαζί με το ίδιο αρσενικό μέχρις ότου παρατηρηθούν ενδείξεις συνουσίας ή μέχρι να παρέλθει διάστημα δύο εβδομάδων. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή κολπικού βύσματος. Ως ημέρα 0 της κύησης ορίζεται η ημέρα κατά την οποία επιβεβαιώνονται οι ενδείξεις ζευγαρώματος (ανιχνεύεται κολπικό βύσμα ή σπέρμα). Σε περίπτωση που το ζευγάρωμα αποδειχθεί ανεπιτυχές, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο νέου ζευγαρώματος των θηλυκών με ελεγμένα αρσενικά της ίδιας ομάδας.

Μέγεθος γέννας

33. Την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, το μέγεθος κάθε γέννας μπορεί να ρυθμίζεται διά της απομάκρυνσης των πλεοναζόντων νεογνών με τυχαία επιλογή, ούτως ώστε να παραμένουν, όπου είναι εφικτό, τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, ανάλογα με το σύνηθες μέγεθος γέννας στη φυλή των επιμύων που χρησιμοποιείται. Από δυο από τα πλεονάζοντα νεογνά θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα αίματος, τα οποία θα συγκεντρώνονται και θα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων T4 στον ορό. Δεν ενδείκνυται η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους ή της πρωκτογεννητικής απόστασης (AGD). Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν φθάνει τα τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, είναι αποδεκτή η μερική ρύθμιση (π.χ. έξι αρσενικά και τέσσερα θηλυκά). Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό όταν το μέγεθος της γέννας είναι χαμηλότερο του στόχου (8 ή 10 νεογνά/γέννα). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από τον στόχο απομάκρυνσης, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της T4.

34. Εάν δεν ρυθμιστεί το μέγεθος της γέννας, την 4η ημέρα μετά τη γέννηση θανατώνονται δύο νεογνά ανά γέννα και λαμβάνονται δείγματα αίματος για μέτρηση των συγκεντρώσεων θυρεοειδικών ορμονών στον ορό. Ει δυνατόν, τα δύο νεογνά ανά γέννα θα πρέπει να είναι θηλυκά προκειμένου να διατηρηθούν τα αρσενικά νεογνά για αξιολογήσεις διατηρούμενων θηλών, εκτός εάν η απομάκρυνση των δύο νεογνών θα είχε ως αποτέλεσμα να μην υπάρχουν άλλα θηλυκά προς αξιολόγηση κατά τη λήξη της μελέτης. Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό εάν έτσι το μέγεθος της γέννας θα μειωνόταν κάτω από τα 8 έως 10 νεογνά/γέννα (ανάλογα με το κανονικό μέγεθος γέννας στη χρησιμοποιούμενη φυλή επιμύων). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από το κανονικό μέγεθος γέννας, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της T4.

Παρατηρήσεις εν ζωή

Κλινικές παρατηρήσεις

35. Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μία φορά τη μέρα, και συχνότερα σε περίπτωση που παρατηρηθούν τοξικά συμπτώματα. Αυτές οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση τις ίδιες ώρες κάθε ημέρα, λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και όλα τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Οι εν λόγω καταγραφές θα πρέπει να περιλαμβάνουν τη χρονική στιγμή εμφάνισης, τη σοβαρότητα και τη διάρκεια των τοξικών συμπτωμάτων.

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής/νερού

36. Τα αρσενικά και τα θηλυκά θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, καθώς και κατά τη λήξη της μελέτης. Στη διάρκεια της κύησης, τα θηλυκά πρέπει να ζυγίζονται τις ημέρες 0, 7, 14 και 20, και εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1η ημέρα μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να αναφέρονται ξεχωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

37. Στη διάρκεια της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα, της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Η μέτρηση της κατανάλωσης τροφής κατά το ζευγάρωμα είναι προαιρετική. Η κατανάλωση νερού στη διάρκεια των εν λόγω περιόδων θα πρέπει επίσης να μετράται, όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω πόσιμου νερού.

Οιστρικοί κύκλοι

38. Οι οιστρικοί κύκλοι θα πρέπει να παρακολουθούνται πριν από την έναρξη της αγωγής προκειμένου να επιλέγονται για τη δοκιμή θηλυκά με κανονική κυκλικότητα (βλ. παράγραφο 22). Επίσης, θα πρέπει να παρακολουθούνται καθημερινά κολπικά επιχρίσματα, από την έναρξη της περιόδου αγωγής μέχρις ότου διαπιστωθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Εάν υπάρχει ανησυχία για οξείες αγχογόνες επιδράσεις που μπορεί να μεταβάλλουν τους οιστρικούς κύκλους με την έναρξη της χορήγησης, τα εργαστήρια μπορούν να υποβάλλουν τα ζώα σε έκθεση 2 εβδομάδων και, στη συνέχεια, να συλλέγουν καθημερινά κολπικά επιχρίσματα προκειμένου να παρακολουθούν τον οιστρικό κύκλο για τουλάχιστον δύο εβδομάδες κατά την περίοδο πριν από το ζευγάρωμα, και να συνεχίζουν την παρακολούθηση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος μέχρι να ανιχνευθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Κατά τη λήψη κολπικών/τραχηλικών κυττάρων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διαταραχή των βλεννογόνων που μπορεί να επαγάγει ψευδοκύηση (7) (8).

Παράμετροι σχετικές με τους απογόνους

39. Η διάρκεια της κύησης πρέπει να καταγράφεται και υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε γέννα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό για να προσδιορίζεται ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, τα θνησιγενή νεογνά, τα ζώντα νεογνά, τα καχεκτικά νεογνά (νεογνά μεγέθους αρκετά μικρότερου από τα αντίστοιχα νεογνά μάρτυρες) και η παρουσία μακροσκοπικώς ορατών ανωμαλιών.

40. Τα ζώντα νεογνά πρέπει να καταμετρώνται και να προσδιορίζεται το φύλο τους, ενώ οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να ζυγίζονται εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1 μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Πέραν των παρατηρήσεων που περιγράφονται στην παράγραφο 35, θα πρέπει να καταγράφεται τυχόν μη φυσιολογική συμπεριφορά των απογόνων.

41. Η πρωκτογεννητική απόσταση κάθε νεογνού θα πρέπει να μετράται την ίδια ημέρα μεταγεννητικά, μεταξύ της μεταγεννητικής ημέρας (ΜΓΗ) 0 και 4. Θα πρέπει να προσδιορίζεται το σωματικό βάρος του νεογνού την ημέρα μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης, η οποία θα πρέπει να κανονικοποιείται σε ένα μέτρο του μεγέθους του νεογνού, κατά προτίμηση στην κυβική ρίζα του σωματικού βάρους (9). Θα πρέπει να καταμετράται ο αριθμός των θηλών/άλων στα αρσενικά νεογνά τη 12η ή 13η ΜΓΗ, όπως συνιστάται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (10).

Εξετάσεις κλινικής βιοχημείας

42. Λαμβάνονται δείγματα αίματος από καθορισμένο σημείο με βάση το ακόλουθο χρονοδιάγραμμα:

— από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, εάν το επιτρέπει ο αριθμός των νεογνών (βλ. παραγράφους 33-34)

— από όλες τις μητέρες και από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα κατά τη λήξη της μελέτης τη 13η ημέρα, και

— από όλα τα ενήλικα αρσενικά κατά τη λήξη της μελέτης.

Όλα τα δείγματα αίματος αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες. Δείγματα αίματος νεογνών 13ης ΜΓΗ και των ενήλικων αρσενικών αξιολογούνται ως προς τα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών (Τ4). Ανάλογα με την περίπτωση, διενεργείται περαιτέρω αξιολόγηση της Τ4 σε δείγματα αίματος από τις μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ. Ανάλογα με την περίπτωση, μπορούν να μετρηθούν προαιρετικά και άλλες ορμόνες. Το αίμα νεογνών μπορεί να συγκεντρώνεται ανά γέννα για τη διενέργεια αναλύσεων θυρεοειδικών ορμονών. Οι θυρεοειδικές ορμόνες (Τ4 και TSH) θα πρέπει, κατά προτίμηση να μετρώνται ως «σύνολο».

43. Οι ακόλουθοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα και τις απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ορμονών:

— ο χρόνος θανάτωσης, λόγω της ημερήσιας διακύμανσης των συγκεντρώσεων ορμονών,

— η μέθοδος θανάτωσης, και ως εκ τούτου πρέπει να αποφεύγεται η περιττή καταπόνηση των ζώων, που μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις των ορμονών,

— οι σειρές αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού που ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τις πρότυπες καμπύλες τους.

44. Τα δείγματα πλάσματος που προορίζονται ειδικά για ορμονικό προσδιορισμό θα πρέπει να λαμβάνονται σε παραπλήσια ώρα της ημέρας. Οι αριθμητικές τιμές που προκύπτουν από ανάλυση των συγκεντρώσεων ορμονών διαφέρουν ανάλογα με τα διάφορα κιτ δοκιμασιών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

Παθολογοανατομία

Νεκροψία-νεκροτομή

45. Σε περίπτωση θανάτωσης ή θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ενήλικα αρσενικά θα πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για τυχόν ανωμαλίες ή παθολογικές αλλοιώσεις. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Ο αριθμός των σημείων εμφύτευσης θα πρέπει να καταγράφεται. Θα πρέπει να εξετάζονται κολπικά επιχρίσματα το πρωί της ημέρας της νεκροψίας για να προσδιοριστεί το στάδιο του οιστρικού κύκλου και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με την ιστοπαθολογία των ωοθηκών.

46. Οι όρχεις και επιδιδυμίδες, ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες στο σύνολό τους, όλων των αρσενικών ενήλικων ζώων θα πρέπει να απαλλάσσονται από τυχόν προσφυόμενους ιστούς, ανάλογα με την περίπτωση, και να ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Επιπλέον, μπορούν να μετρώνται προαιρετικά τα βάρη οργάνων όπως το σύμπλεγμα ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών, οι βολβοουρηθραίοι αδένες (αδένες του Cowper) και η βάλανος του πέους στα αρσενικά και ωοθήκες σε ζεύγη (βάρος σε νωπή κατάσταση) και η μήτρα (περιλαμβανομένου του τραχήλου) στα θηλυκά· σε περίπτωση που περιλαμβάνονται, τα εν λόγω βάρη θα πρέπει να μετρώνται το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή.

47. Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από αυτήν, θα πρέπει, τουλάχιστον, να εξετάζονται προσεκτικά εξωτερικά για μακροσκοπικές ανωμαλίες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στα εξωτερικά όργανα του γεννητικού συστήματος, τα οποία θα πρέπει να εξετάζονται για τυχόν ύπαρξη σημείων ανώμαλης ανάπτυξης. Τη 13η ΜΓΗ θα πρέπει να λαμβάνεται και να φυλάσσεται ο θυρεοειδής από 1 αρσενικό και 1 θηλυκό νεογνό ανά γέννα.

48. Οι ωοθήκες, οι όρχεις, άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος, επιδιδυμίδες, προστάτης, σπερματοδόχοι κύστεις και πηκτοειδείς αδένες), ο θυρεοειδής και όλα τα όργανα που παρουσιάζουν μακροσκοπικές βλάβες, από όλα τα ενήλικα ζώα, πρέπει να διατηρούνται. Η μονιμοποίηση σε φορμόλη δεν συνιστάται για τη συνήθη εξέταση των όρχεων και των επιδιδυμίδων. Μια αποδεκτή μέθοδος είναι η χρήση μονιμοποιητικού Bouin ή τροποποιημένου μονιμοποιητικού Davidson (11). Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) μπορεί να διατρυπάται με βελόνα, με ήπιες κινήσεις, σε μικρό βάθος και στα δύο άκρα ώστε να διευκολύνεται η διείσδυση του μονιμοποιητικού υλικού.

Ιστοπαθολογία

49. Θα πρέπει να διενεργούνται αναλυτικές ιστολογικές εξετάσεις των ωοθηκών, των όρχεων και των επιδιδυμίδων (με ιδιαίτερη έμφαση στα στάδια της σπερματογένεσης και την ιστοπαθολογία της δομής των διάμεσων κυττάρων των όρχεων) των ζώων της ομάδας στην οποία χορηγείται η υψηλότερη δόση και της ομάδας μαρτύρων. Εφόσον απαιτείται, μπορεί να εξετάζονται και τα άλλα διατηρούμενα όργανα, περιλαμβανομένου του θυρεοειδούς νεογνών και ενήλικων ζώων. Μετά τη μονιμοποίηση μπορεί να προσδιορίζεται το βάρος του θυρεοειδούς. Ο καθαρισμός θα πρέπει και στην περίπτωση αυτή να πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή και μόνο μετά τη μονιμοποίηση, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στους ιστούς. Οι βλάβες των ιστών μπορούν να βλάψουν την εγκυρότητα της ιστοπαθολογικής ανάλυσης. Οι εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα της υψηλότερης δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλοιώσεις. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (11) παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τομή και την ιστολογική ανάλυση των ενδοκρινικών ιστών.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

50. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο ξεχωριστά. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, όπου θα δίνεται για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμής, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν με ευθανασία, η χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός των γόνιμων ζώων, ο αριθμός των έγκυων θηλυκών, ο αριθμός των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικής δράσης, οι τύποι των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες. Στο προσάρτημα 3 παρέχεται ένας μορφότυπος συνοπτικής αναφοράς σε μορφή πίνακα που έχει αποδεχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος για την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

51. Λόγω του περιορισμένου μεγέθους της μελέτης, οι στατιστικές αναλύσεις υπό μορφή ελέγχων σημαντικότητας είναι περιορισμένης αξίας για πολλές παραμέτρους, ιδίως τις παραμέτρους σχετικά με την αναπαραγωγή. Σε περίπτωση χρήσης στατιστικών αναλύσεων, η επιλεγόμενη μέθοδος θα πρέπει να είναι κατάλληλη για την κατανομή της υπό εξέταση μεταβλητής, και να επιλέγεται πριν από την έναρξη της μελέτης. Η στατιστική ανάλυση πρωκτογεννητικής απόστασης και διατηρούμενων θηλών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις στη γέννα. Όπου αρμόζει, μονάδα της ανάλυσης θα πρέπει να είναι η γέννα από την ίδια μητέρα. Η στατιστική ανάλυση σωματικού βάρους των νεογνών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πλήθος νεογνών της γέννας. Λόγω του μικρού μεγέθους της ομάδας, μπορεί να είναι χρήσιμη η χρήση ιστορικών δεδομένων μαρτύρων (π.χ. σχετικά με το μέγεθος της γέννας), εάν υπάρχουν, ως βοήθημα στην ερμηνεία της μελέτης.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

52. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης τοξικότητας θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς τις παρατηρούμενες επιδράσεις, τα ευρήματα της νεκροψίας και τα μικροσκοπικά ευρήματα. Στην αξιολόγηση περιλαμβάνεται η σχέση μεταξύ της δόσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων, των ταυτοποιημένων οργάνων στόχων, της στειρότητας, των κλινικών ανωμαλιών, των επιδράσεων στις επιδόσεις στην αναπαραγωγή και στις γέννες, των μεταβολών στα σωματικά βάρη, των επιδράσεων στη θνησιμότητα και κάθε άλλου τοξικού φαινομένου.

53. Λόγω της σύντομης περιόδου αγωγής των αρσενικών, κατά την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή των αρσενικών, μαζί με τα δεδομένα για τη γονιμότητα θα πρέπει να εξετάζεται και η ιστοπαθολογία των όρχεων και των επιδιδυμίδων. Επικουρικά, χρήσιμη στην ερμηνεία της μελέτης μπορεί να είναι και η χρήση ιστορικών δεδομένων μαρτύρων (π.χ. σχετικά με το μέγεθος της γέννας, την πρωκτογεννητική απόσταση, τις διατηρούμενες θηλές, τα επίπεδα T4 στον ορό), εάν υπάρχουν.

54. Για τον ποιοτικό έλεγχο προτείνεται η συλλογή ιστορικών δεδομένων μαρτύρων και ο υπολογισμός συντελεστών μεταβλητότητας για τα αριθμητικά δεδομένα, ιδίως όσον αφορά τις παραμέτρους που συνδέονται με την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για συγκρίσεις κατά την αξιολόγηση πραγματικών μελετών.

Έκθεση δοκιμής

55. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, αν υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν είναι το νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου είδους εκτός από τον επίμυ.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/τροφής και τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας τυχαιοποίησης για την επιλογή των νεογνών προς απομάκρυνση, εφόσον απαιτείται.

Αποτελέσματα:

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής και νερού, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, περιλαμβανομένης της γονιμότητας, της κύησης, καθώς και όποιων άλλων σημείων τοξικότητας,

— διάρκεια κύησης,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στα νεογνά, στη μεταγεννητική ανάπτυξη κ.λπ.,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων και μη),

— αριθμός ενήλικων θηλυκών με κανονικό ή μη κανονικό οιστρικό κύκλο και διάρκεια του κύκλου,

— αριθμός ζώντων νεογνών και απώλειες μετά την εμφύτευση,

— δεδομένα για το βάρος του σώματος των νεογνών,

— πρωκτογεννητική απόσταση για όλα τα νεογνά (και βάρος σώματος την ημέρα της μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης)

— διατηρούμενες θηλές σε αρσενικά νεογνά,

— επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών, σε νεογνά 13ης ΜΓΗ και σε ενήλικα αρσενικά (και σε μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ, εφόσον μετρώνται)

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικά ορατές ανωμαλίες, μακροσκοπική αξιολόγηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, αριθμός καχεκτικών νεογνών,

— χρόνος θανάτου των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης ή επιβίωση έως το τέλος,

— αριθμός εμφυτευμένων νεογνών, μέγεθος γέννας και βάρη νεογνών γέννας κατά τη χρονική στιγμή της καταγραφής,

— βάρος σώματος κατά τη θανάτωση και δεδομένα βάρους οργάνων για τα γονικά ζώα,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση (εάν υπάρχουν διαθέσιμα),

— στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

56. Η μελέτη θα παράσχει αξιολογήσεις της τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη που συνδέεται με τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων (βλ. παραγράφους 5 και 6). Μπορεί να περιλαμβάνει υπόδειξη της ανάγκης διενέργειας περαιτέρω ερευνών και παρέχει καθοδήγηση όσον αφορά τον σχεδιασμό επακόλουθων μελετών. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (12). Στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 106 του ΟΟΣΑ για την ιστολογική αξιολόγηση των ενδοκρινικών και αναπαραγωγικών δοκιμών σε τρωκτικά (11) παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία και την αξιολόγηση των (ενδοκρινικών) οργάνων και των κολπικών επιχρισμάτων που μπορεί να είναι χρήσιμα για την παρούσα TG.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development,.Paris.

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ [ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΤΟ ΕΓΓΡΑΦΟ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗΣ ΑΡΙΘ. 150 ΤΟΥ ΟΟΣΑ (6)]

Ανδρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική ανδρογόνος ορμόνη (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιανδρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής ανδρογόνου ορμόνης (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιοιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής οιστρογόνου ορμόνης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιθυρεοειδική δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. $T_{3)}$ στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Τοξικότητα στην ανάπτυξη: η εκδήλωση τοξικότητας στην αναπαραγωγή, η οποία περιλαμβάνει προγεννητικές, περιγεννητικές και μεταγεννητικές δομικές ή λειτουργικές διαταραχές των απογόνων.

Δοσολογία: γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου ανά ημέρα (π.χ. mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) ή σε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή.

Έκδηλη τοξικότητα: γενικός όρος που δηλώνει σαφή σημεία τοξικότητας μετά από χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Αυτά πρέπει να επαρκούν για την εκτίμηση της επικινδυνότητας και να είναι τέτοια ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

Εξασθένιση της γονιμότητας: αντιπροσωπεύει διαταραχές των αναπαραγωγικών λειτουργιών ή της ικανότητας αρσενικών ή θηλυκών.

Τοξικότητα στη μητέρα: δυσμενείς επιδράσεις σε κυοφορούντα θηλυκά, είτε ειδικής εκδήλωσης (άμεση επίδραση) είτε μη ειδικής εκδήλωσης (έμμεση επίδραση).

NOAEL (no-observed-adverse effect level): πρόκειται για το υψηλότερο επίπεδο δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις λόγω της αγωγής.

Οιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Τοξικότητα στην αναπαραγωγή: αντιπροσωπεύει τις επιβλαβείς επιδράσεις στους απογόνους και/ή την εξασθένιση των αναπαραγωγικών λειτουργιών ή ικανότητας αρσενικών και θηλυκών.

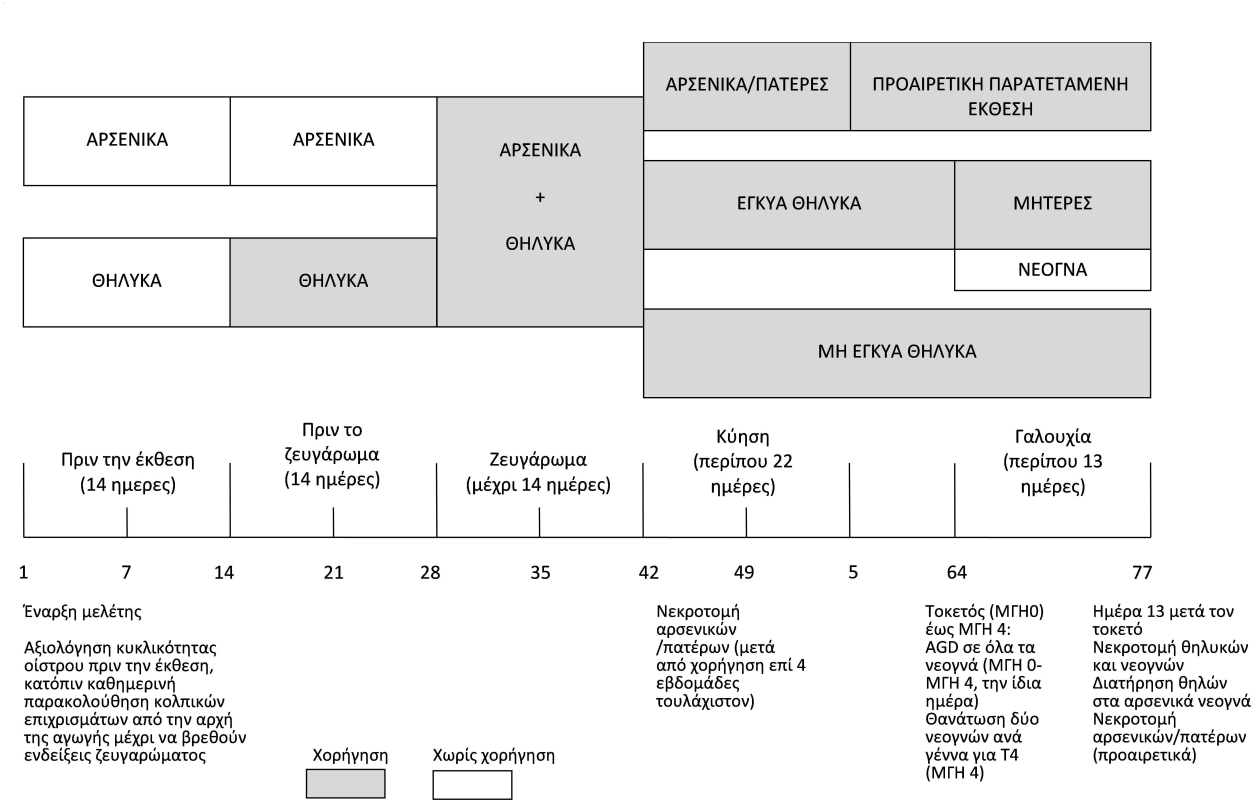
Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Θυρεοειδική δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. $T_{3)}$ στον οργανισμό θηλαστικού.

Επικύρωση: επιστημονική διαδικασία που αποσκοπεί στον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και στην απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

Προσάρτημα 2

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ, ΒΑΣΕΙ ΠΛΗΡΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ ΖΕΥΓΑΡΩΜΑΤΟΣ 14 ΗΜΕΡΩΝ



Προσάρτημα 3

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Δοσολογία (μονάδες)	0 (μάρτυρας)	…	…	…	…
Ζεύγη κατά την έναρξη (Ν)					
Οιστρικός κύκλος (τουλάχιστον μέση διάρκεια και συχνότητα μη κανονικών κύκλων)					
Θηλυκά που παρουσιάζουν ενδείξεις συνουσίας (Ν)					
Θηλυκά που καθίστανται έγκυα (Ν)					
Ημέρες σύλληψης 1 - 5 (Ν)					
Ημέρες σύλληψης 6 -… ([1]) (Ν)					
Εγκυμοσύνη ≤ 21 ημέρες (Ν)					
Εγκυμοσύνη = 22 ημέρες (Ν)					
Εγκυμοσύνη ≥ 23 ημέρες (Ν)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά (Ν)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά την 4η ημέρα (Ν)					
Εμφυτευμένα έμβρυα/μητέρα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη μέτρηση της πρωκτογεννητικής απόστασης (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών)					

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Δοσολογία (μονάδες)	0 (μάρτυρας)	…	…	…	…
Πρωκτογεννητική απόσταση νεογνών κατά την ίδια μεταγεννητική ημέρα, τη γέννηση – την 4η ημέρα (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών, καταγραφή της ΜΓΗ)					
Βάρος νεογνών κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Διατηρούμενες θηλές αρσενικών νεογνών τη 13η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη 13η ημέρα (μέσος όρος)					
ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΝΕΟΓΝΑ					
Μητέρες με 0					
Μητέρες με 1					
Μητέρες με ≥ 2					
ΑΠΩΛΕΙΑ ΑΠΟΓΟΝΩΝ					
Προγεννητική/μετά την εμφύτευση (εμφυτευμένα έμβρυα μείον ζώντα νεογνά)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					
Μεταγεννητική (ζώντα κατά τη γέννα μείον ζώντα κατά τη 13η ΜΓΗ)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					

([1]) τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος

Β.64 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 422 του ΟΟΣΑ (2016). Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο χημικών ουσιών αναθεωρούνται ανά διαστήματα ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι επιστημονικές εξελίξεις. Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών διαλογής 422 εγκρίθηκε το 1996, βάσει ενός πρωτοκόλλου για συνδυασμένη δοκιμή επαναλαμβανόμενης δόσης και διαλογής αναπαραγωγής/ανάπτυξης που συζητήθηκε σε δύο συναντήσεις εμπειρογνωμόνων, στο Λονδίνο το 1990 (1) και στο Τόκυο το 1992 (2).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών συνδυάζει ένα μέρος που συνίσταται στη διαλογή ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, το οποίο βασίζεται στην εμπειρία που απέκτησαν τα κράτη μέλη από τη χρήση της αρχικής μεθόδου σε υφιστάμενες χημικές ουσίες υψηλού όγκου παραγωγής και σε διερευνητικές μελέτες με ουσίες που χρησιμεύουν ως θετικοί μάρτυρες (3) (4), και ένα άλλο μέρος σχετικό με την τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή 407 του ΟΟΣΑ (μελέτη τοξικότητας από το στόμα, 28 ημερών, με επαναλαμβανόμενη δόση σε τρωκτικά, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο Β.7 του παρόντος παραρτήματος).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει επικαιροποιηθεί με παραμέτρους που αφορούν τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, στο πλαίσιο της δράσης πρώτης προτεραιότητας που ξεκίνησε ο ΟΟΣΑ το 1998 με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών και την ανάπτυξη νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τη διεξαγωγή δοκιμών σε δυνητικούς ενδοκρινικούς διαταράκτες (5). Σε αυτό το πλαίσιο, η TG 407 (που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο Β.7 του παρόντος παραρτήματος) ενισχύθηκε το 2008 με παραμέτρους κατάλληλες για την ανίχνευση ενδοκρινικής δραστηριότητας υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Ο στόχος της επικαιροποίησης της TG 422 ήταν η συμπερίληψη ορισμένων παραμέτρων σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες σε TG διαλογής στις οποίες οι περίοδοι έκθεσης καλύπτουν ορισμένες από τις ευαίσθητες περιόδους κατά την ανάπτυξη (προγεννητική ή πρώτη μεταγεννητική περίοδος).

4. Οι επιλεχθείσες πρόσθετες παράμετροι σχετικά με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, που αποτελούν επίσης μέρος της TG 443 (εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο Β.56 του παρόντος παραρτήματος), περιλήφθηκαν στην TG 422 βάσει μελέτης σκοπιμότητας στην οποία θίγονται επιστημονικά και τεχνικά θέματα που σχετίζονται με τη συμπερίληψή τους, καθώς και πιθανές προσαρμογές του σχεδιασμού δοκιμής που χρειάζονται για τη συμπερίληψή τους (6).

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγική συμπεριφορά αρσενικών και θηλυκών ατόμων, όπως η λειτουργία των γονάδων, η συμπεριφορά ζευγαρώματος, η σύλληψη, η ανάπτυξη του κυήματος και ο τοκετός. Δεν αποτελεί εναλλακτική μέθοδο ούτε αντικαθιστά τις υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών Β.31, Β.34, Β.35 ή Β.56.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

6. Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μπορεί να προσδιοριστεί η τοξικότητά της από το στόμα με τη χρήση επαναλαμβανόμενης δόσης μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών οξείας τοξικότητας. Η παρούσα μελέτη παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους κινδύνους για την υγεία που είναι πιθανό να προκύψουν από την επαναλαμβανόμενη έκθεση για σχετικά περιορισμένη χρονική περίοδο. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη βασική μελέτη τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, που μπορεί να χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες για τις οποίες δεν δικαιολογείται η διεξαγωγή μελέτης 90 ημερών (π.χ. όταν ο όγκος παραγωγής δεν υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια) ή ως προκαταρκτικό στάδιο μιας μακροχρόνιας μελέτης. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σχετικά με την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών σημείων ως ανώδυνων παραμέτρων για τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε αξιολογήσεις ασφάλειας (7).

7. Επίσης, περιλαμβάνει δοκιμή διαλογής ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη και, ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παροχή αρχικών πληροφοριών σχετικά με τις δυνητικές επιδράσεις στις αναπαραγωγικές επιδόσεις αρσενικών και θηλυκών όπως η λειτουργία των γονάδων, η συμπεριφορά ζευγαρώματος, η σύλληψη, η ανάπτυξη του κυήματος και ο τοκετός, είτε σε πρώιμο στάδιο της αξιολόγησης των τοξικολογικών ιδιοτήτων υπό δοκιμή χημικών ουσιών είτε για χημικές ουσίες που προκαλούν ανησυχία. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για όλες τις πτυχές της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει περιορισμένα μόνο μέσα ανίχνευσης των μεταγεννητικών εκδηλώσεων της προγεννητικής έκθεσης, ή των επαγόμενων κατά τη μεταγεννητική έκθεση πιθανών επιδράσεων. Λόγω (μεταξύ άλλων) της επιλεκτικότητας των παραμέτρων και της μικρής διάρκειας της μελέτης, η παρούσα μέθοδος δεν θα παρέχει αποδεικτικά στοιχεία που να στηρίζουν οριστικούς ισχυρισμούς περί ανυπαρξίας επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη. Επιπλέον, σε περίπτωση απουσίας δεδομένων από άλλες δοκιμές τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, τα θετικά αποτελέσματα είναι χρήσιμα για την αρχική αξιολόγηση της επικινδυνότητας και συμβάλλουν στη διαδικασία λήψης αποφάσεων όσον αφορά την αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής πρόσθετων δοκιμών.

8. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σχετικές με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρους θα πρέπει να μελετώνται στο πλαίσιο του εννοιολογικού πλαισίου για τον έλεγχο και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) του ΟΟΣΑ (8). Σε αυτό το εννοιολογικό πλαίσιο, η ενισχυμένη TG 422 του ΟΟΣΑ περιλαμβάνεται στο επίπεδο 4 ως *in vivo* δοκιμασία που παρέχει δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις των παραμέτρων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα. Εντούτοις, ένα ενδοκρινικό σήμα μπορεί να μη θεωρηθεί επαρκώς ισχυρό στοιχείο ώστε μια χημική ουσία να χαρακτηριστεί ενδοκρινικός διαταράκτης.

9. Η μέθοδος δοκιμών δίδει μεγαλύτερη έμφαση στις νευρολογικές επιδράσεις ως ειδική παράμετρο καθώς και στην ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των ζώων με σκοπό τη συγκέντρωση όσο το δυνατόν περισσοτέρων πληροφοριών. Επιδιώκεται η αναγνώριση χημικών ουσιών με νευροτοξικό δυναμικό, για τις οποίες ενδέχεται να χρειάζεται περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση. Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί επίσης να παράσχει βασικές ενδείξεις επιδράσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα.

10. Σε περίπτωση απουσίας δεδομένων από άλλες μελέτες συστηματικής τοξικότητας, τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, νευροτοξικότητας και/ή ανοσοτοξικότητας, τα θετικά αποτελέσματα είναι χρήσιμα για την αρχική αξιολόγηση της επικινδυνότητας και συμβάλλουν στη διαδικασία λήψης αποφάσεων όσον αφορά την αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα διεξαγωγής πρόσθετων δοκιμών. Η δοκιμή μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη ως μέρος του συνόλου εξέτασης δεδομένων πληροφοριών (SIDS) του ΟΟΣΑ για την αξιολόγηση υφιστάμενων χημικών ουσιών για τις οποίες οι διαθέσιμες τοξικολογικές πληροφορίες είναι περιορισμένες ή ανύπαρκτες, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση αντί της διεξαγωγής δύο χωριστών δοκιμών για την τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης (TG 407 του ΟΟΣΑ, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος) και την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη (TG 421 του ΟΟΣΑ, που αντιστοιχεί στο κεφάλαιο B.63 του παρόντος παραρτήματος) αντίστοιχα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μελέτη προσδιορισμού εύρους δόσεων για πιο εκτεταμένες μελέτες της αναπαραγωγής/ανάπτυξης, ή όταν θεωρηθεί για άλλους λόγους κατάλληλη.

11. Γενικά, σε ό,τι αφορά την ευαισθησία, θεωρείται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των έγκυων και των μη έγκυων ζώων. Κατά συνέπεια, ο προσδιορισμός των επιπέδων δόσεων που είναι επαρκή για την αξιολόγηση της γενικής συστηματικής τοξικότητας και της ειδικής τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη με την παρούσα συνδυαστική δοκιμή μπορεί να είναι πιο περίπλοκος απ' ό,τι όταν οι μεμονωμένες δοκιμές διεξάγονται χωριστά. Επιπλέον, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής όσον αφορά τη γενική συστηματική τοξικότητα μπορεί να είναι πιο δύσκολη απ' ό,τι όταν διεξάγεται χωριστή μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης, ιδίως όταν οι ορολογικές και οι ιστοπαθολογικές παράμετροι δεν αξιολογούνται κατά την ίδια χρονική στιγμή στη μελέτη. Εξαιτίας αυτών των πολύπλοκων τεχνικών πτυχών, για τη διεξαγωγή της παρούσας συνδυαστικής δοκιμής διαλογής απαιτείται σημαντική εμπειρία στη διεξαγωγή δοκιμών τοξικότητας. Από την άλλη πλευρά, πέραν του μικρότερου πλήθους χρησιμοποιούμενων ζώων, η συνδυαστική μελέτη μπορεί να προσφέρει έναν καλύτερο τρόπο διάκρισης των άμεσων επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη από τις επιδράσεις που θεωρούνται δευτερογενείς προς άλλες (συστηματικές) επιδράσεις.

12. Στην παρούσα δοκιμή, η διάρκεια της περιόδου χορήγησης είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι στην κλασική μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών. Ωστόσο, στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται μικρότερο πλήθος ζώων από κάθε φύλο ανά ομάδα σε σύγκριση με τη διεξαγωγή κλασικής μελέτης επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών συν μια δοκιμή διαλογής ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

13. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών θεωρείται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται από το στόμα. Εάν χρησιμοποιηθούν άλλες οδοί έκθεσης, ενδέχεται να χρειαστούν τροποποιήσεις.

14. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

15. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

16. Η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται σε διαβαθμισμένες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Η χορήγηση των δόσεων στα αρσενικά θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες και να φθάνει μέχρι και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση (σε αυτό το χρονοδιάγραμμα περιλαμβάνονται τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν το ζευγάρωμα, η περίοδος του ζευγαρώματος και περίπου δύο εβδομάδες μετά το ζευγάρωμα). Λόγω της περιορισμένης περιόδου χορήγησης των δόσεων στα αρσενικά πριν από το ζευγάρωμα, η γονιμότητα ενδέχεται να μην αποτελεί ιδιαίτερα ευαίσθητο δείκτη της τοξικότητας στους όρχεις. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διεξαγωγή

αναλυτικής ιστολογικής εξέτασης. Ο συνδυασμός μιας περιόδου χορήγησης διάρκειας δύο εβδομάδων πριν από το ζευγάρωμα και επακόλουθων παρατηρήσεων όσον αφορά το ζευγάρωμα/γονιμότητα με συνολική περίοδο χορήγησης τουλάχιστον τεσσάρων εβδομάδων, ακολουθούμενων από αναλυτική ιστοπαθολογική εξέταση των γονάδων των αρσενικών, θεωρείται επαρκής για την ανίχνευση της πλειονότητας των επιδράσεων στη γονιμότητα των αρσενικών και τη σπερματογένεση.

17. Η χορήγηση δόσεων στα θηλυκά θα πρέπει να διαρκεί καθ' όλο το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης. Η εν λόγω χορήγηση περιλαμβάνει δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα (με στόχο να καλυφθούν τουλάχιστον δύο πλήρεις κύκλοι οίστρου), το μεταβλητό χρονικό διάστημα μέχρι τη σύλληψη, τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τουλάχιστον δεκατρείς ημέρες μετά τη γέννηση, έως και την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση.

18. Η διάρκεια της μελέτης, μετά τον εγκλιματισμό και την αξιολόγηση του κύκλου οίστρου πριν από τη χορήγηση των δόσεων, εξαρτάται από τις επιδόσεις των θηλυκών και είναι κατά προσέγγιση 63 ημέρες [τουλάχιστον 14 ημέρες πριν από το ζευγάρωμα, (έως) 14 ημέρες ζευγαρώματος, 22 ημέρες κύησης, 13 ημέρες γαλουχίας].

19. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τυχόν συμπτώματα τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται και, στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή ζωικού είδους

20. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για χρήση με επίμυ. Η διερεύνηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στην παρούσα TG 422 σε άλλα είδη τρωκτικών πρέπει να αιτιολογείται αναλυτικά. Στο διεθνές πρόγραμμα επικύρωσης για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών της TG 407, ο επίμυς ήταν το μόνο είδος που χρησιμοποιήθηκε. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται φυλές με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών ελαττωμάτων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή παρθένα ζώα, που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειράματα. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, το φύλο, το βάρος και την ηλικία. Στην αρχή της μελέτης, η διακύμανση των βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % της μέσης τιμής για κάθε φύλο. Σε περίπτωση που η μελέτη διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροχρόνιας μελέτης ή μελέτης πλήρους γενεάς, συνιστάται να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης.

Στέγαση και διατροφή

21. Σε όλες οι διαδικασίες πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος 12ωρη. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω της παρούσας μεθόδου, η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης ανάμειξης της ουσίας.

22. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Επιτρέπεται η ατομική στέγαση, εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, κάθε κλωβός δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από πέντε ζώα. Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κλωβούς κατάλληλους για τον σκοπό αυτό. Τα έγκυα θηλυκά θα πρέπει να στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς και θα πρέπει να τους παρέχονται υλικά φωλιάσματος. Τα θηλυκά κατά τη γαλουχία τοποθετούνται σε ατομικούς κλωβούς μαζί με τα νεογνά τους.

23. Η τροφή πρέπει να υποβάλλεται τακτικά σε ανάλυση ώστε να εντοπίζονται τυχόν ξένες προσμείξεις. Ένα δείγμα του σιτηρεσίου θα πρέπει να διατηρείται έως την οριστικοποίηση της έκθεσης.

Προετοιμασία των ζώων

24. Λαμβάνονται τυχαία υγιή, νεαρά, ενήλικα ζώα και κατανέμονται στις ομάδες και τους κλωβούς του πειράματος. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις της θέσης τους. Τα ζώα ταυτοποιούνται με αποκλειστικό αναγνωριστικό και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης προκειμένου να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

Παρασκευή των δόσεων

25. Συνιστάται η χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το στόμα, εκτός εάν θεωρούνται καταλληλότερες άλλες οδοί χορήγησης. Όταν επιλέγεται η οδός από το στόμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται συνήθως με στομαχικό καθετήρα· εντούτοις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν εναλλακτικά να χορηγούνται μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού.

26. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να εξετάζεται ως πρώτη επιλογή, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, έπειτα η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, θα πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα και η ομοιογένεια της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

27. Συνιστάται κάθε ομάδα να περιλαμβάνει αρχικά τουλάχιστον 10 αρσενικά και 12-13 θηλυκά. Πριν από την έκθεση, θα αξιολογείται η κυκλικότητα του οίστρου των θηλυκών και τα ζώα που δεν παρουσιάζουν τυπικούς κύκλους 4-5 ημερών δεν θα περιλαμβάνονται στη μελέτη· ως εκ τούτου, συνιστάται η προσθήκη επιπλέον θηλυκών στις ομάδες ώστε αυτές να αποτελούνται από 10 θηλυκά έκαστη. Εκτός της περίπτωσης έντονων τοξικών επιδράσεων, αναμένεται ότι κατ' αυτόν τον τρόπο θα εξασφαλίζονται τουλάχιστον 8 έγκυα θηλυκά ανά ομάδα, που είναι συνήθως ο ελάχιστος αποδεκτός αριθμός έγκυων θηλυκών ανά ομάδα. Στόχος είναι να προκαλούνται επαρκείς κυοφορίες και απόγονοι για να εξασφαλίζεται η ουσιαστική αξιολόγηση της ικανότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην κύηση, στη μητρική συμπεριφορά και στη συμπεριφορά θηλασμού των ζώων, καθώς και στην αύξηση και την ανάπτυξη των απογόνων της F_1 από τη σύλληψη ως τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Εάν προβλέπονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης επιπρόσθετης δορυφορικής ομάδας πέντε ζώων ανά φύλο στην ομάδα μαρτύρων και στην ομάδα μέγιστης δόσης, με σκοπό την παρατήρηση της αναστρεψιμότητας, της εμμονής ή της καθυστερημένης εμφάνισης συστηματικών τοξικών επιδράσεων επί 14 ημέρες τουλάχιστον μετά την αγωγή. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας δεν θα ζευγαρώνουν και, κατά συνέπεια, δεν χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

Δοσολογία

28. Κατά κανόνα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες δοκιμής και μία ομάδα μαρτύρων. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα γενικής τοξικότητας, είναι δυνατόν να εκπονηθεί μελέτη προσδιορισμού του εύρους (ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης) για να διευκολύνει τον καθορισμό των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν. Εκτός από τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η ομάδα μαρτύρων πρέπει να λαμβάνει τον φορέα στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

29. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη τυχόν υφιστάμενων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο-)κινητική. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ενδέχεται να υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ έγκυων και μη έγκυων ζώων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να προκαλέσει τοξικές εκδηλώσεις, όχι όμως τον θάνατο ούτε έντονη οδύνη. Στη συνέχεια επιλέγεται φθίνουσα σειρά δοσολογικών επιπέδων με σκοπό τον εντοπισμό απόκρισης συνδεόμενης με τη δόση και του χαμηλότερου επιπέδου δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις. Η βέλτιστη επιλογή είναι συνήθως ο υποδιπλασιασμός ή υποτετραπλασιασμός, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων συντελεστών (π.χ. άνω του 10) μεταξύ των δόσεων.

30. Όταν παρατηρείται γενική τοξικότητα (π.χ. μειωμένο βάρος σώματος, επιδράσεις στο ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες, τους νεφρούς κ.λπ.) ή άλλη αλλαγή που μπορεί να μην είναι τοξική αντίδραση (π.χ. μειωμένη πρόσληψη τροφής, διόγκωση του ήπατος), οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις παραμέτρους που συνδέονται με ευαισθησία του ενδοκρινικού συστήματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Οριακή δοκιμή

31. Εάν μια δοκιμή από το στόμα σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφόσον πρόκειται για χορήγηση μέσω του σιτηρεσίου, με αντίστοιχη εκατοστιαία αναλογία στο σιτηρέσιο ή στο πόσιμο νερό (βάσει μετρήσεων του βάρους σώματος), δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει των διαθέσιμων δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται τοξικότητα, είναι δυνατόν να μην απαιτείται διεξαγωγή πλήρους μελέτης με πολλά επίπεδα δόσεων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οριακή δοκιμή, εκτός εάν, με βάση την έκθεση του ανθρώπου, διαφαίνεται η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης. Σε περίπτωση χορήγησης από άλλη οδό, όπως εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα, η μέγιστη εφικτή έκθεση μπορεί να εξαρτάται συχνά από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των υπό δοκιμή ουσιών.

Χορήγηση των δόσεων

32. Η δόση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χορηγείται στα ζώα καθημερινά επί 7 ημέρες την εβδομάδα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός της περίπτωσης υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών/

διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συνήθως προκαλούν εντονότερες επιδράσεις, η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

33. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω του σιτηρεσίου, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης, εκφρασμένο επί του βάρους σώματος του ζώου. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα, η δόση θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε μέρα και να ρυθμίζεται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος. Όταν η συνδυαστική μελέτη χρησιμοποιείται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροχρόνιας μελέτης ή πλήρους μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή, θα πρέπει να χρησιμοποιείται παρόμοιο σιτηρέσιο και στις δύο μελέτες.

Χρονοδιάγραμμα πειράματος

34. Η χορήγηση δόσεων και στα δύο φύλα θα πρέπει να ξεκινά δύο εβδομάδες πριν από το ζευγάρωμα, αφού έχουν εγκλιματιστεί για τουλάχιστον πέντε ημέρες και τα θηλυκά έχουν υποβληθεί σε διαδικασία διαλογής ως προς την κανονικότητα των κύκλων οίστρου (στη διάρκεια περιόδου δύο εβδομάδων πριν από την αγωγή). Η μελέτη θα πρέπει να προγραμματίζεται κατά τρόπον ώστε η αξιολόγηση των κύκλων οίστρου να ξεκινά σε σύντομο χρονικό διάστημα αφότου τα ζώα έχουν φθάσει σε πλήρη σεξουαλική ωρίμανση. Το εν λόγω διάστημα μπορεί να διαφέρει ελαφρώς για διαφορετικές φυλές επιμύων σε διαφορετικά εργαστήρια, π.χ. επίμυες Sprague Dawley ηλικίας 10 εβδομάδων, επίμυες Wistar ηλικίας περίπου 12 εβδομάδων. Οι μητέρες με απογόνους πρέπει να θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σύντομα μετά από αυτό. Για να αφεθούν οι μητέρες σε ολονύκτια νηστεία πριν από την αιμοληψία (εφόσον προτιμηθεί αυτή η επιλογή), δεν χρειάζεται να θανατωθούν οι μητέρες και τα νεογνά την ίδια ημέρα. Η ημέρα γέννησης (όταν έχει ολοκληρωθεί ο τοκετός) ορίζεται ως η ημέρα 0 μετά τον τοκετό. Τα θηλυκά που δεν εμφανίζουν ενδείξεις συνουσίας θανατώνονται 24-26 ημέρες μετά την τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος. Η χορήγηση συνεχίζεται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος. Στα αρσενικά η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται και μετά την περίοδο ζευγαρώματος, τουλάχιστον έως ότου ολοκληρωθεί η ελάχιστη συνολική περίοδος χορήγησης των 28 ημερών. Στη συνέχεια θανατώνονται ή, εναλλακτικά, διατηρούνται και συνεχίζουν να λαμβάνουν δόσεις με σκοπό την πιθανή πραγματοποίηση δεύτερου ζευγαρώματος, εάν χρειαστεί.

35. Η καθημερινή χορήγηση στα γονικά θηλυκά θα πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και τουλάχιστον μέχρι και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό ή την ημέρα πριν τη θανάτωση. Για μελέτες όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω εισπνοής ή διά του δέρματος, η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον μέχρι και τη 19η ημέρα της κύησης, και θα πρέπει να ξεκινά εκ νέου το συντομότερο δυνατό, το αργότερο μέχρι την 4η ημέρα μετά τη γέννηση (ΜΓΗ).

36. Τα ζώα που ανήκουν σε δορυφορική ομάδα για την οποία έχουν προγραμματιστεί επακόλουθες παρατηρήσεις, εφόσον προβλέπονται, δεν ζευγαρώνονται. Θα πρέπει να διατηρούνται για τουλάχιστον 14 ακόμη ημέρες μετά την πρώτη προγραμματισμένη θανάτωση των μητέρων, χωρίς αγωγή, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν καθυστερημένη εκδήλωση, ή εμμονή, ή ανάρρωση από τοξικές επιδράσεις.

37. Στο παράρτημα 2 παρατίθεται διάγραμμα του χρονοδιαγράμματος διεξαγωγής των πειραμάτων.

Οιστρικοί κύκλοι

38. Οι οιστρικοί κύκλοι θα πρέπει να παρακολουθούνται πριν από την έναρξη της αγωγής προκειμένου να επιλέγονται για τη δοκιμή θηλυκά με κανονική κυκλικότητα (βλ. παράγραφο 27). Επίσης, θα πρέπει να παρακολουθούνται καθημερινά κολπικά επιχρίσματα, από την έναρξη της περιόδου αγωγής μέχρις ότου διαπιστωθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Εάν υπάρχει ανησυχία για οξείες αγχογόνες επιδράσεις που μπορεί να μεταβάλλουν τους οιστρικούς κύκλους με την έναρξη της χορήγησης, τα εργαστήρια μπορούν να υποβάλλουν τα ζώα σε έκθεση 2 εβδομάδων και, στη συνέχεια, να συλλέγουν καθημερινά κολπικά επιχρίσματα προκειμένου να παρακολουθούν τον οιστρικό κύκλο για τουλάχιστον δύο εβδομάδες κατά την περίοδο πριν από το ζευγάρωμα, και να συνεχίζουν την παρακολούθηση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος μέχρι να ανιχνευθούν ενδείξεις ζευγαρώματος. Κατά τη λήψη κολπικών/τραχηλικών κυττάρων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διαταραχή των βλεννογόνων που μπορεί να επαγάγει ψευδοκύηση (8) (9).

Διαδικασία ζευγαρώματος

39. Κανονικά, στην παρούσα μελέτη θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζευγαρώματα 1:1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό). Μπορεί να υπάρξουν εξαιρέσεις, στην περίπτωση περιστασιακών θανάτων αρσενικών. Το θηλυκό θα πρέπει να τοποθετείται μαζί με το ίδιο αρσενικό μέχρις ότου παρατηρηθούν ενδείξεις συνουσίας ή μέχρι να παρέλθει διάστημα δύο εβδομάδων. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή κολπικού βύσματος. Ως ημέρα 0 της κύησης ορίζεται η ημέρα κατά την οποία επιβεβαιώνονται οι ενδείξεις ζευγαρώματος (ανιχνεύεται κολπικό βύσμα ή σπέρμα). Σε περίπτωση που το ζευγάρωμα αποδειχθεί ανεπιτυχές, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο νέου ζευγαρώματος των θηλυκών με ελεγμένα αρσενικά της ίδιας ομάδας.

Μέγεθος γέννας

40. Την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, το μέγεθος κάθε γέννας μπορεί να ρυθμίζεται διά της απομάκρυνσης των πλεοναζόντων νεογνών με τυχαία επιλογή, ούτως ώστε να παραμένουν, όπου είναι εφικτό, τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, ανάλογα με το σύνηθες μέγεθος γέννας στη φυλή των επιμύων που χρησιμοποιείται. Από δύο από τα πλεονάζοντα νεογνά θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα αίματος, να συγκεντρώνονται και να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων της T4 στον ορό. Δεν ενδείκνυται η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους ή της πρωκτογεννητικής απόστασης (AGD). Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν φθάνει τα τέσσερα ή πέντε νεογνά ανά φύλο ανά γέννα, είναι αποδεκτή η μερική ρύθμιση (π.χ. έξι αρσενικά και τέσσερα θηλυκά). Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό όταν το μέγεθος της γέννας είναι χαμηλότερο του στόχου (8 ή 10 νεογνά/γέννα). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από τον στόχο απομάκρυνσης, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της T4.

41. Εάν δεν ρυθμιστεί το μέγεθος της γέννας, την 4η ημέρα μετά τη γέννηση θανατώνονται δύο νεογνά ανά γέννα και λαμβάνονται δείγματα αίματος για μέτρηση των συγκεντρώσεων θυρεοειδικών ορμονών στον ορό. Ει δυνατόν, τα δύο νεογνά ανά γέννα θα πρέπει να είναι θηλυκά προκειμένου να διατηρηθούν τα αρσενικά νεογνά για αξιολογήσεις διατηρούμενων θηλών, εκτός εάν η απομάκρυνση των δύο νεογνών θα είχε ως αποτέλεσμα να μην υπάρχουν άλλα θηλυκά προς αξιολόγηση κατά τη λήξη της μελέτης. Δεν απομακρύνεται κανένα νεογνό εάν έτσι το μέγεθος της γέννας θα μειωνόταν κάτω από τα 8 έως 10 νεογνά/γέννα (ανάλογα με το κανονικό μέγεθος γέννας στη χρησιμοποιούμενη φυλή επιμύων). Εάν υπάρχει ένα μόνο νεογνό πάνω από το κανονικό μέγεθος γέννας, θα απομακρύνεται μόνο ένα νεογνό, το οποίο θα χρησιμοποιείται για συλλογή αίματος με σκοπό την πιθανή διενέργεια αξιολογήσεων της T4.

Παρατηρήσεις

42. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μια φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε ημέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων θα πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας.

43. Όλα τα γονικά ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις της κατάστασης κάθε ζώου) και στη συνέχεια τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε ημέρα, έξω από τους κλωβούς σε έναν τυποποιημένο χώρο. Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται επιμελώς, κατά προτίμηση με χρήση συστημάτων βαθμολόγησης, τα οποία προσδιορίζονται διεξοδικά από το εργαστήριο που διεξάγει τις δοκιμές. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε οι συνθήκες της δοκιμής να παρουσιάζουν τις ελάχιστες δυνατές διακυμάνσεις και οι παρατηρήσεις να διεξάγονται κατά προτίμηση από άτομα που δεν γνωρίζουν την αγωγή. Σημεία που θα πρέπει να καταγράφονται είναι, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του τριχώματος, συνεχές κυκλικό βάδισμα), δυσχερούς ή παρατεταμένου τοκετού ή περίεργης συμπεριφοράς (όπως αυτοτραυματισμός, βάδισμα προς τα πίσω) (10).

44. Μία φορά στη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να αξιολογείται η αισθητηριακή ανταπόκριση σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (8) (9) (11), η δύναμη λαβής (12) και η κινητικότητα (13) σε πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά που επιλέγονται τυχαία από κάθε ομάδα. Λεπτομερέστερη περιγραφή των διαδικασιών που μπορούν να ακολουθηθούν δίνονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Εναλλακτικές διαδικασίες, διαφορετικές από τις περιγραφόμενες στις βιβλιογραφικές παραπομπές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης. Στα αρσενικά, οι εν λόγω παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να γίνονται προς το τέλος της περιόδου χορήγησης των δόσεών τους, λίγο πριν την προγραμματισμένη θανάτωση αλλά πριν από τη δειγματοληψία αίματος για αιματολογικές εξετάσεις ή αναλύσεις κλινικής χημείας (βλ. παραγράφους 53-56, περιλαμβανομένης της υποσημείωσης 1). Στη διάρκεια αυτών των δοκιμών, τα θηλυκά θα πρέπει να βρίσκονται σε κατάσταση ανάλογη από άποψη φυσιολογίας και θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον εφάπαξ την τελευταία εβδομάδα της γαλουχίας (π.χ. LD 6-13), λίγο πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση. Στον βαθμό που είναι εφικτό, θα πρέπει να ελαχιστοποιείται το χρονικό διάστημα χωρισμού των νεογνών από τις μητέρες.

45. Οι παρατηρήσεις των λειτουργιών που γίνονται εφάπαξ προς το τέλος της μελέτης μπορούν να παραλειφθούν όταν η μελέτη διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο επακόλουθης υποχρόνιας (90 ημερών) ή μακροχρόνιας μελέτης. Στην περίπτωση αυτή, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην επακόλουθη αυτή μελέτη. Από την άλλη πλευρά όμως, η ύπαρξη δεδομένων για τις λειτουργίες από την παρούσα μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης είναι δυνατόν να διευκολύνει την επιλογή επίπεδων δόσεων για μια επακόλουθη υποχρόνια ή μακροχρόνια μελέτη.

46. Κατ' εξαίρεση, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών μπορούν επίσης να παραλείπονται όταν οι ομάδες εμφανίζουν εκδηλώσεις τοξικότητας σε βαθμό που παρεμποδίζει σημαντικά την εκτέλεση της δοκιμής λειτουργιών.

47. Η διάρκεια της κύησης πρέπει να καταγράφεται και υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε γέννα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό για να προσδιορίζεται ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, τα θνησιγενή νεογνά, τα ζώντα νεογνά, τα καχεκτικά νεογνά (νεογνά αρκετά μικρότερου μεγέθους από τα αντίστοιχα νεογνά μάρτυρες) και η παρουσία μακροσκοπικώς ορατών ανωμαλιών.

48. Τα ζώντα νεογνά πρέπει να καταμετρώνται και να προσδιορίζεται το φύλο τους, ενώ οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να ζυγίζονται εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1 μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Πέραν των παρατηρήσεων επί των γονικών ζώων (βλ. παραγράφους 43 και 44), θα πρέπει να καταγράφεται τυχόν μη φυσιολογική συμπεριφορά των απογόνων.

49. Η πρωκτογεννητική απόσταση κάθε νεογνού θα πρέπει να μετράται την ίδια ημέρα μεταγεννητικά, μεταξύ της μεταγεννητικής ημέρας (ΜΓΗ) 0 και 4. Θα πρέπει να προσδιορίζεται το σωματικό βάρος του νεογνού την ημέρα μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης, η οποία θα πρέπει να κανονικοποιείται σε ένα μέτρο του μεγέθους του νεογνού, κατά προτίμηση στην κυβική ρίζα του σωματικού βάρους (14). Θα πρέπει να καταμετράται ο αριθμός των θηλών/άλων στα αρσενικά νεογνά τη 12η ή 13η ΜΓΗ, όπως συνιστάται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (15).

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής/νερού

50. Τα αρσενικά και τα θηλυκά θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, καθώς και κατά τη λήξη της μελέτης. Στη διάρκεια της κύησης, τα θηλυκά πρέπει να ζυγίζονται τις ημέρες 0, 7, 14 και 20, και εντός 24 ωρών από τον τοκετό (ημέρα 0 ή 1η ημέρα μετά τον τοκετό) και τουλάχιστον την 4η και 13η ημέρα μετά τον τοκετό. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να αναφέρονται ξεχωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

51. Στη διάρκεια της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα, της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Η μέτρηση της κατανάλωσης τροφής κατά το ζευγάρωμα είναι προαιρετική. Η κατανάλωση νερού στη διάρκεια των εν λόγω περιόδων θα πρέπει επίσης να μετράται, όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία χορηγείται μέσω του νερού.

Αιματολογικές εξετάσεις

52. Μια φορά στη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αιματολογικές εξετάσεις σε πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά που επιλέγονται τυχαία από κάθε ομάδα: προσδιορισμός αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, δικτυοερυθροκυττάρων, αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων, χρόνου πήξεως και πηκτικότητας του αίματος. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ή οι θεωρητικοί μεταβολίτες της έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, θα πρέπει να προσδιορίζονται επίσης, μεταξύ άλλων, η συγκέντρωση μεθαιμοσφαιρίνης και τα σωμάτια Heinz.

53. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο. Κατά τη δειγματοληψία, τα θηλυκά θα πρέπει να βρίσκονται σε ανάλογη από φυσιολογικής απόψεως κατάσταση. Για την αποφυγή των πρακτικών δυσκολιών που συνδέονται με τη μεταβλητότητα της χρονικής στιγμής έναρξης της κύησης, η αιμοληψία από τα θηλυκά μπορεί να πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα ως εναλλακτική λύση αντί της αιμοληψίας αμέσως πριν ή κατά την ευθανασία των ζώων. Τα δείγματα αίματος των αρσενικών θα πρέπει, κατά προτίμηση, να λαμβάνονται αμέσως πριν ή κατά την ευθανασία των ζώων. Εναλλακτικά, η αιμοληψία στα αρσενικά μπορεί να πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου πριν από το ζευγάρωμα, όταν έχει επιλεγεί το συγκεκριμένο χρονικό σημείο για τα θηλυκά.

54. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες.

Εξετάσεις κλινικής βιοχημείας

55. Θα πρέπει να διενεργούνται εξετάσεις κλινικής βιοχημείας για τη διερεύνηση σοβαρών τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, επιδράσεων στους νεφρούς και το ήπαρ, σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από τα επιλεγμένα πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά κάθε ομάδας. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας ([1]). Οι εξετάσεις στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν προσδιορισμό νατρίου, καλίου, γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης, δύο τουλάχιστον ενζύμων ενδεικτικών ηπατοκυτταρικής επίδρασης (όπως της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, της αμινοτρασφεράσης του ασπαρτικού και της αφυδρογονάσης της σορβιτόλης) και των χολικών οξέων. Η μέτρηση και άλλων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και της χολερυθρίνης είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε ορισμένες περιπτώσεις.

56. Λαμβάνονται δείγματα αίματος από καθορισμένο σημείο με βάση το ακόλουθο χρονοδιάγραμμα:

— από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα την 4η ημέρα μετά τη γέννηση, εάν το επιτρέπει ο αριθμός των νεογνών (βλ. παραγράφους 40-41)

— από όλες τις μητέρες και από τουλάχιστον δύο νεογνά ανά γέννα κατά τη λήξη της μελέτης τη 13η ημέρα, και

— από όλα τα ενήλικα αρσενικά κατά τη λήξη της μελέτης.

Όλα τα δείγματα αίματος αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες. Δείγματα αίματος νεογνών 13ης ΜΓΗ και των ενήλικων αρσενικών αξιολογούνται ως προς τα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών (Τ4). Ανάλογα με την περίπτωση, διενεργείται περαιτέρω αξιολόγηση της Τ4 σε δείγματα αίματος από τις μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ. Ανάλογα με την περίπτωση, μπορούν να μετρηθούν προαιρετικά και άλλες ορμόνες. Το αίμα νεογνών μπορεί να συγκεντρώνεται ανά γέννα για τη διενέργεια αναλύσεων θυρεοειδικών ορμονών. Οι θυρεοειδικές ορμόνες (Τ4 και TSH) θα πρέπει, κατά προτίμηση να μετρώνται ως «σύνολο».

([1]) Για πολλές μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα, ιδίως για τη γλυκόζη, προτιμάται η ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος γι' αυτό είναι ότι η αυξημένη μεταβλητότητα των τιμών, αναπόφευκτη αν τα ζώα δεν υποβληθούν σε νηστεία, θα τείνει να καλύψει λεπτότερες επιδράσεις και να δυσχεράνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Από την άλλη πλευρά, εντούτοις, η ολονύκτια νηστεία μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των (έγκυων) ζώων, να διαταράξει τη γαλουχία και τη συμπεριφορά κατά τη γαλουχία, και, ιδίως στο πλαίσιο μελετών διατροφής, μπορεί να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Σε περίπτωση που επιλέγεται η λύση της ολονύκτιας νηστείας, οι εξετάσεις κλινικής βιοχημείας θα πρέπει να διεξάγονται μετά τις παρατηρήσεις των λειτουργιών της 4ης εβδομάδας της μελέτης στα αρσενικά. Οι μητέρες θα πρέπει να διατηρούνται για μία ακόμη ημέρα μετά την απομάκρυνση των νεογνών, για παράδειγμα, τη 13η ΜΓΗ. Οι μητέρες θα πρέπει να υποβάλλονται σε ολονύκτια νηστεία από τη 13η-14η ημέρα της γαλουχίας και για τις εξετάσεις παραμέτρων κλινικής χημείας θα πρέπει να χρησιμοποιείται δείγμα αίματος από την ευθανασία.

57. Προαιρετικά, κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης μπορούν να διεξαχθούν οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε πέντε τυχαία επιλεγμένα αρσενικά κάθε ομάδας χρησιμοποιώντας ούρα συλλεχθέντα σε καθορισμένο χρόνο: προσδιορισμός όψης, όγκου, ωσμωτικότητας ή ειδικού βάρους, pH, πρωτεϊνών, γλυκόζης και αίματος/αιμοκυττάρων.

58. Επιπλέον, εξετάζεται κατά πόσο είναι σκόπιμο να μελετηθούν δείκτες του ορού για τυχόν γενικές ιστικές βλάβες. Άλλοι προσδιορισμοί που απαιτούνται όταν οι γνωστές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ενδέχεται ή αναμένεται να επηρεάσουν τα σχετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά αφορούν το ασβέστιο, τα φωσφορικά, τα τριγλυκερίδια και τη γλυκόζη μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες, τη μεθαιμοσφαιρίνη και τη χολινεστεράση. Τα εν λόγω χαρακτηριστικά πρέπει να προσδιορίζονται κατά περίπτωση.

59. Οι ακόλουθοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα και τις απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ορμονών:

— ο χρόνος θανάτωσης, λόγω της ημερήσιας διακύμανσης των συγκεντρώσεων ορμονών,

— η μέθοδος θανάτωσης, και ως εκ τούτου πρέπει να αποφεύγεται η περιττή καταπόνηση των ζώων, που μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις των ορμονών,

— οι σειρές αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού που ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τις πρότυπες καμπύλες τους.

60. Τα δείγματα πλάσματος που προορίζονται ειδικά για ορμονικό προσδιορισμό θα πρέπει να λαμβάνονται σε παραπλήσια ώρα της ημέρας. Οι αριθμητικές τιμές που προκύπτουν από ανάλυση των συγκεντρώσεων ορμονών διαφέρουν ανάλογα με τα διάφορα κιτ δοκιμασιών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

61. Εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς είναι ανεπαρκή, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο προσδιορισμού των μεταβλητών αιματολογίας και κλινικής βιοχημείας πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων ή, κατά προτίμηση, σε μια ομάδα ζώων που δεν περιλαμβάνεται στις πειραματικές ομάδες. Για τα θηλυκά, τα δεδομένα πρέπει να αφορούν γαλουχούντα ζώα.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία-νεκροτομή

62. Όλα τα ενήλικα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία-νεκροτομή η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Ο αριθμός των σημείων εμφύτευσης θα πρέπει να καταγράφεται. Θα πρέπει να εξετάζονται κολπικά επιχρίσματα την ημέρα της νεκροψίας για να προσδιοριστεί το στάδιο του οιστρικού κύκλου και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με την ιστοπαθολογία των αναπαραγωγικών οργάνων των θηλυκών.

63. Οι όρχεις και επιδιδυμίδες, ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες στο σύνολό τους, όλων των αρσενικών ενήλικων ζώων θα πρέπει να απαλλάσσονται από τυχόν προσφυόμενους ιστούς, ανάλογα με την περίπτωση, και να ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Επιπλέον, μπορούν να μετρώνται προαιρετικά τα βάρη οργάνων όπως το σύμπλεγμα ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών, οι βολβοουρηθραίοι αδένες (αδένες του Cowper) και η βάλανος του πέους στα αρσενικά και ωοθήκες σε ζεύγη (βάρος σε νωπή κατάσταση) και η μήτρα (περιλαμβανομένου του τραχήλου) στα θηλυκά· σε περίπτωση που περιλαμβάνονται, τα εν λόγω βάρη θα πρέπει να μετρώνται το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή. Οι ωοθήκες, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, άλλα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος, και όλα τα όργανα που εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις, από όλα τα ενήλικα ζώα, θα πρέπει να διατηρούνται.

64. Οι θυρεοειδείς αδένες από όλα τα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά και από ένα αρσενικό και θηλυκό νεογνό 13ης ΜΓΗ από κάθε γέννα θα πρέπει να διατηρούνται σε μέσο μονιμοποίησης κατάλληλο για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως να υποβληθούν στο μέλλον. Μετά τη μονιμοποίηση μπορεί να προσδιορίζεται το βάρος του θυρεοειδούς. Ο καθαρισμός θα πρέπει και στην περίπτωση αυτή να πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή και μόνο μετά τη μονιμοποίηση, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στους ιστούς. Οι βλάβες των ιστών μπορούν να βλάψουν την εγκυρότητα της ιστοπαθολογικής ανάλυσης. Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο ακριβώς πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκειά της και να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες (βλ. παράγραφο 56).

65. Επιπλέον, για τουλάχιστον πέντε ενήλικα αρσενικά και θηλυκά, τυχαία επιλεγμένα από κάθε ομάδα (εκτός όσων είναι ετοιμοθάνατα και/ή θανατώνονται με ευθανασία πριν από τη λήξη της μελέτης), το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, ο θύμος αδένας, ο σπλήνας, ο εγκέφαλος και η καρδιά θα πρέπει να απαλλάσσονται από τυχόν προσφυόμενους ιστούς, ανάλογα με την περίπτωση, και να ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την ανατομή ώστε να αποφευχθεί η ξήρανσή τους. Οι ακόλουθοι ιστοί θα πρέπει να διατηρούνται σε μονιμοποιητικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο προβλέπεται να υποβληθούν: κάθε ιστός που εμφανίζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις, εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές του κυρίου τμήματος, της παρεγκεφαλίδας και της γέφυρας), νωτιαίος μυελός, οφθαλμοί, στόμαχος, λεπτό και παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων παϋέριων πλακών), ήπαρ, νεφροί,επινεφρίδια,

σπλήνας, καρδιά, θύμος αδένας, τραχεία και πνεύμονες (διατηρημένοι με εμφύσηση μονιμοποιητικού υλικού, ακολουθούμενη από εμβάπτιση), γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, προστάτης και σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες), κολπική κοιλότητα, ουροδόχος κύστη, λεμφαδένες [πέραν του εγγύτερου παροχετεύοντα αδένα, θα πρέπει να λαμβάνεται και άλλος ένας λεμφαδένας ανάλογα με την πείρα του εργαστηρίου (16)], περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση από θέση πολύ κοντά στον μυ, σκελετικός μυς και οστό με μυελό των οστών (τομή ή, εναλλακτικά, πρόσφατο παρασκεύασμα αναρροφηθέντος μυελού). Συνιστάται να μονιμοποιούνται οι όρχεις με εμβάπτιση σε μονιμοποιητικό υλικό Bouin ή τροποποιημένο μονιμοποιητικό υλικό Davidson (16) (17) (18)· για τους συγκεκριμένους ιστούς δεν συνιστάται μονιμοποίηση σε φορμόλη. Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) μπορεί να διατρυπάται με βελόνα, με ήπιες κινήσεις, σε μικρό βάθος και στα δύο άκρα ώστε να διευκολύνεται η διείσδυση του μονιμοποιητικού υλικού. Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται.

66. Από τους ακόλουθους ιστούς είναι δυνατόν να ληφθούν πολύτιμες ενδείξεις για ενδοκρινικές επιδράσεις: γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες, ραχιαιοπλάγιος και κοιλιακός λοβός προστάτη), κολπική κοιλότητα, υπόφυση, αρσενικός μαστικός αδένας και επινεφρίδιος αδένας. Δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς οι μεταβολές στους αρσενικούς μαστικούς αδένες, αλλά η παράμετρος αυτή ενδέχεται να είναι πολύ ευαίσθητη σε ουσίες με οιστρογόνο δράση. Η παρατήρηση οργάνων/ιστών που δεν απαριθμούνται στην παράγραφο 65 είναι προαιρετική.

67. Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώνονται τη 13η ημέρα μετά τον τοκετό, ή σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από αυτήν, θα πρέπει, τουλάχιστον, να εξετάζονται προσεκτικά εξωτερικά για μακροσκοπικές ανωμαλίες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στα εξωτερικά όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος, τα οποία θα πρέπει να εξετάζονται για τυχόν ύπαρξη σημείων ανώμαλης ανάπτυξης.

Ιστοπαθολογία

68. Θα πρέπει να διεξάγονται πλήρεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις στα διατηρημένα όργανα και ιστούς των επιλεγμένων ζώων στις ομάδες μαρτύρων και υψηλής δόσης (με ιδιαίτερη έμφαση στα στάδια της σπερματογένεσης στους γεννητικούς αδένες των αρσενικών και στην ιστοπαθολογία της δομής των διάμεσων κυττάρων των όρχεων). Εφόσον απαιτείται, μπορεί να εξετάζεται και ο θυρεοειδής αδένας νεογνών και των υπόλοιπων ενήλικων ζώων. Οι εξετάσεις θα πρέπει να γίνονται και στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης παρατηρηθούν μεταβολές σχετιζόμενες με την αγωγή. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (10) παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τομή και την ιστολογική ανάλυση των ενδοκρινικών ιστών.

69. Θα πρέπει να εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες. Για λόγους συμβολής στην αποσαφήνιση των NOAEL, θα πρέπει να εξετάζονται όργανα-στόχοι σε άλλες ομάδες δόσης, ιδίως σε ομάδες που θεωρείται ότι παρουσιάζουν NOAEL.

70. Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιδράσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

71. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο ξεχωριστά. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, όπου θα δίνεται για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμής, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν με ευθανασία, η χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός των γόνιμων ζώων, ο αριθμός των έγκυων θηλυκών, ο αριθμός των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικής δράσης, οι τύποι των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες. Στο προσάρτημα 3 παρέχεται ένας μορφότυπος συνοπτικής αναφοράς σε μορφή πίνακα που έχει αποδεχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος για την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη.

72. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια κατάλληλης στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Με τη σύγκριση των επιδράσεων σε ένα εύρος δόσεων αποφεύγεται η χρήση πολλών ελέγχων t. Οι στατιστικές μέθοδοι πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης. Η στατιστική ανάλυση πρωκτογεννητικής απόστασης και διατηρούμενων θηλών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις στη γέννα. Όπου αρμόζει, μονάδα της ανάλυσης θα πρέπει να είναι η γέννα από την ίδια μητέρα. Η στατιστική ανάλυση σωματικού βάρους των νεογνών θα πρέπει να βασίζεται σε ατομικά στοιχεία για κάθε νεογνό, και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πλήθος νεογνών της γέννας. Λόγω του περιορισμένου μεγέθους της μελέτης, οι στατιστικές αναλύσεις υπό μορφή ελέγχων σημαντικότητας είναι περιορισμένης αξίας για πολλές παραμέτρους, ιδίως τις παραμέτρους σχετικά με την αναπαραγωγή. Ορισμένες από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους, ιδίως παραμετρικοί έλεγχοι για μέτρα κεντρικής τάσης, είναι ακατάλληλες. Σε περίπτωση χρήσης στατιστικών αναλύσεων, η επιλεγόμενη μέθοδος θα πρέπει να είναι κατάλληλη για την κατανομή της υπό εξέταση μεταβλητής, και να επιλέγεται πριν από την έναρξη της μελέτης.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

73. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης τοξικότητας θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς τις παρατηρούμενες επιδράσεις, τα ευρήματα της νεκροψίας-νεκροτομής και τα μικροσκοπικά ευρήματα. Στην αξιολόγηση περιλαμβάνεται η σχέση μεταξύ της δόσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων, των ταυτοποιημένων οργάνων στόχων, της στειρότητας, των κλινικών ανωμαλιών, των επιδράσεων στις επιδόσεις στην αναπαραγωγή και στις γέννες, των μεταβολών στα σωματικά βάρη, των επιδράσεων στη θνησιμότητα και κάθε άλλου τοξικού φαινομένου.

74. Λόγω της σύντομης περιόδου αγωγής των αρσενικών, κατά την αξιολόγηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή των αρσενικών, μαζί με τα δεδομένα για τη γονιμότητα θα πρέπει να εξετάζεται και η ιστοπαθολογία των όρχεων και των επιδιδυμίδων. Επικουρικά, χρήσιμη στην ερμηνεία της μελέτης μπορεί να είναι και η χρήση ιστορικών δεδομένων μαρτύρων (π.χ. σχετικά με το μέγεθος της γέννας, την πρωκτογεννητική απόσταση, τις διατηρούμενες θηλές, τα επίπεδα T4 στον ορό), εάν υπάρχουν.

75. Για τον ποιοτικό έλεγχο προτείνεται η συλλογή ιστορικών δεδομένων ως μάρτυρα και ο υπολογισμός συντελεστών μεταβλητότητας για τα αριθμητικά δεδομένα, ιδίως όσον αφορά τις παραμέτρους που συνδέονται με την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για συγκρίσεις κατά την αξιολόγηση πραγματικών μελετών.

Έκθεση δοκιμής

76. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, αν υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.*Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):*

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν είναι το νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής,

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου είδους εκτός από τον επίμυ.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης,

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/τροφής και τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας τυχαιοποίησης για την επιλογή των νεογνών προς απομάκρυνση, εφόσον απαιτείται.

Αποτελέσματα:

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατά περίπτωση, κατανάλωση τροφής και νερού,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, περιλαμβανομένης της γονιμότητας, της κύησης, καθώς και όποιων άλλων σημείων τοξικότητας,

— διάρκεια κύησης,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στη μεταγεννητική ανάπτυξη κ.λπ.,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων και μη),

— αξιολόγηση των αισθητήριων λειτουργιών, της δύναμης της λαβής και της κινητικότητας,

— αιματολογικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— εξετάσεις κλινικής βιοχημείας με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— αριθμός ενήλικων θηλυκών με κανονικό ή μη κανονικό οιστρικό κύκλο και διάρκεια του κύκλου,

— αριθμός ζώντων νεογνών και απώλειες μετά την εμφύτευση,

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικά ορατές ανωμαλίες, μακροσκοπική εξέταση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, αριθμός καχεκτικών νεογνών,

— χρόνος θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή επιβίωση έως τη λήξη της,

— αριθμός εμφυτευμένων νεογνών, μέγεθος γέννας και βάρη νεογνών γέννας κατά τη χρονική στιγμή της καταγραφής,

— δεδομένα για το βάρος του σώματος των νεογνών,

— πρωκτογεννητική απόσταση για όλα τα νεογνά (και βάρος σώματος την ημέρα της μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης)

— διατηρούμενες θηλές σε αρσενικά νεογνά,

— επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών, σε νεογνά 13ης ΜΓΗ και σε ενήλικα αρσενικά (και σε μητέρες και νεογνά 4ης ΜΓΗ, εφόσον μετρώνται),

— βάρος σώματος κατά τη θανάτωση και δεδομένα βάρους οργάνων για τα γονικά ζώα,

— ευρήματα νεκροψίας-νεκροτομής,

— λεπτομερής περιγραφή των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση (εάν υπάρχουν διαθέσιμα),

— στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

77. Η μελέτη θα παράσχει αξιολογήσεις της τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη που συνδέεται με τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι δίνεται έμφαση σε παραμέτρους τόσο γενικής τοξικότητας όσο και τοξικότητας στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη, τα αποτελέσματα της μελέτης επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των επιδράσεων στην αναπαραγωγή/ανάπτυξη χωρίς γενική τοξικότητα και εκείνων που εκφράζονται μόνο σε επίπεδα που είναι τοξικά και για τα γονικά ζώα (βλ. παραγράφους 7-11). Μπορεί να περιλαμβάνει υπόδειξη της ανάγκης διενέργειας περαιτέρω ερευνών και παρέχει καθοδήγηση όσον αφορά τον σχεδιασμό επακόλουθων μελετών. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (19). Στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 106 του ΟΟΣΑ για την ιστολογική αξιολόγηση των ενδοκρινικών και αναπαραγωγικών δοκιμών σε τρωκτικά (16) παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία και την αξιολόγηση των (ενδοκρινικών) οργάνων και των κολπικών επιχρισμάτων, που μπορεί να είναι χρήσιμες για την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Διατίθεται κατόπιν αιτήματος από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και την Ανάπτυξη, Παρίσι.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol.* Appl. *Pharmacol.*, 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol.*, 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Στο: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ (20) GD 150 ΤΟΥ ΟΟΣΑ)

Ανδρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική ανδρογόνος ορμόνη (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιανδρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής ανδρογόνου ορμόνης (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιοιστρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής οιστρογόνου ορμόνης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιθυρεοειδική δραστηριότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημικό προϊόν μια ουσία ή ένα μείγμα.

Τοξικότητα στην ανάπτυξη η εκδήλωση τοξικότητας στην αναπαραγωγή, η οποία περιλαμβάνει προγεννητικές, περιγεννητικές και μεταγεννητικές δομικές ή λειτουργικές διαταραχές των απογόνων.

Δόση η χορηγούμενη ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου ανά ημέρα (π.χ. mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) ή σε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή.

Δοσολογία γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης.

Έκδηλη τοξικότητα γενικός όρος που δηλώνει σαφή σημεία τοξικότητας μετά από χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Αυτά πρέπει να επαρκούν για την εκτίμηση του κινδύνου και να είναι τέτοια ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

Εξασθένιση της γονιμότητας αντιπροσωπεύει διαταραχές των αναπαραγωγικών λειτουργιών η της ικανότητας αρσενικών ή θηλυκών.

Τοξικότητα στη μητέρα: δυσμενείς επιδράσεις σε κυοφορούντα θηλυκά, είτε ειδικής εκδήλωσης (άμεση επίδραση) είτε μη ειδικής εκδήλωσης (έμμεση επίδραση), που σχετίζονται με την κατάσταση κύησης.

NOAEL (no-observed-adverse effect level): πρόκειται για το υψηλότερο επίπεδο δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις λόγω της αγωγής.

Οιστρογονικότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Τοξικότητα στην αναπαραγωγή αντιπροσωπεύει τις επιβλαβείς επιδράσεις στους απογόνους και/ή την εξασθένιση των αναπαραγωγικών λειτουργιών ή ικανότητας αρσενικών και θηλυκών.

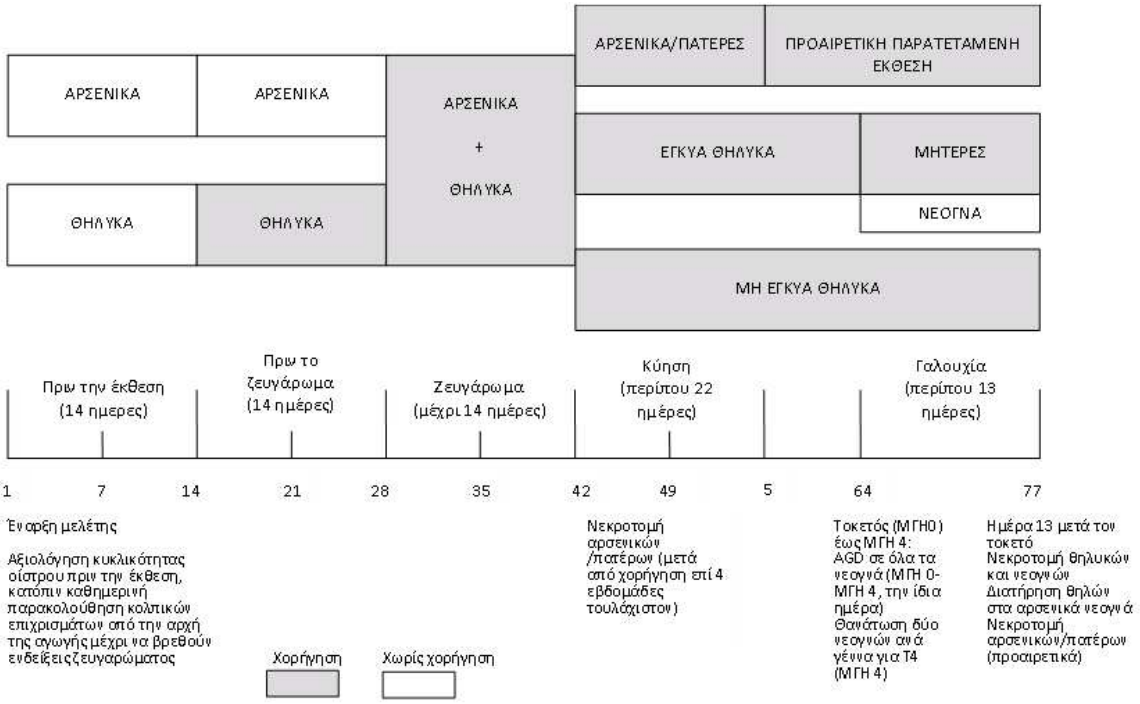
Υπό δοκιμή χημική ουσία κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

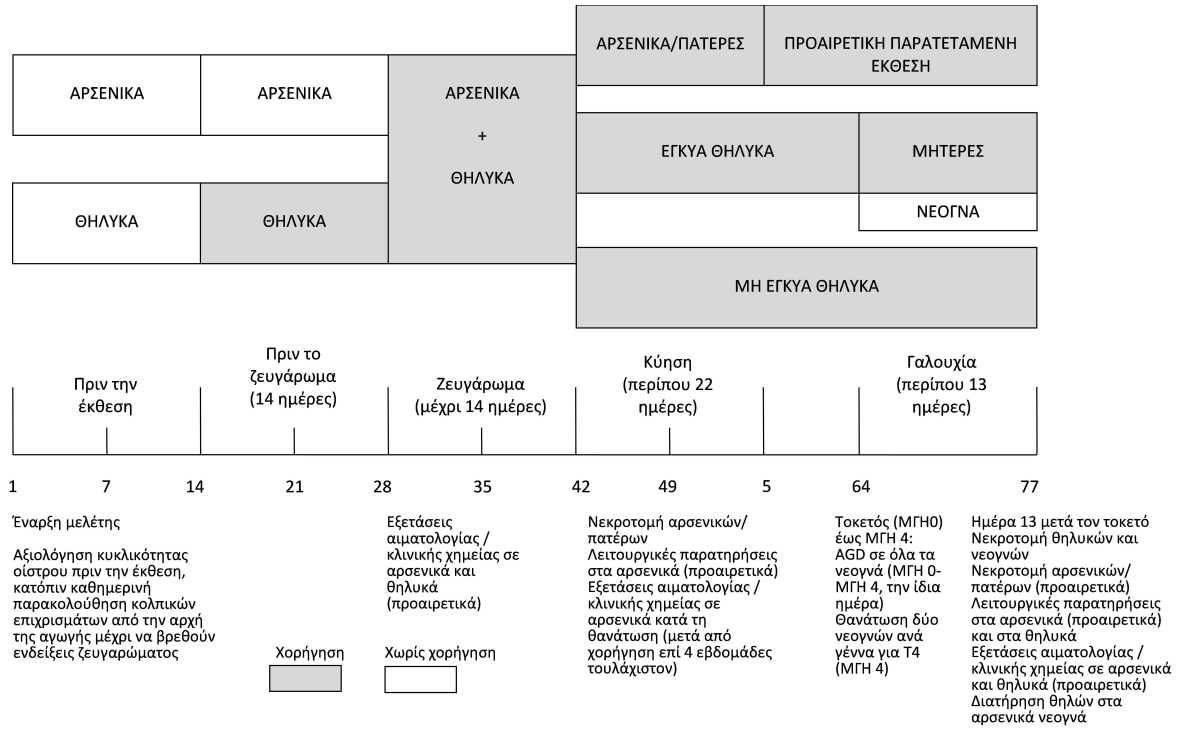
Θυρεοειδική δραστηριότητα η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Επικύρωση επιστημονική διαδικασία που αποσκοπεί στον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και στην απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

Προσάρτημα 2

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ, ΒΑΣΕΙ ΠΛΗΡΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ ΖΕΥΓΑΡΩΜΑΤΟΣ 14 ΗΜΕΡΩΝ





Προσάρτημα 3

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Δοσολογία (μονάδες)…….	0 (μάρτυρας)	…	…	…	…
Ζεύγη κατά την έναρξη (N)					
Οιστρικός κύκλος (τουλάχιστον μέση διάρκεια και συχνότητα μη κανονικών κύκλων)					
Θηλυκά που παρουσιάζουν ενδείξεις συνουσίας (N)					
Θηλυκά που καθίστανται έγκυα (N)					
Ημέρες σύλληψης 1 - 5 (N)					
Ημέρες σύλληψης 6 -… [1] (N)					
Εγκυμοσύνη ≤ 21 ημέρες (N)					
Εγκυμοσύνη = 22 ημέρες (N)					
Εγκυμοσύνη ≥ 23 ημέρες (N)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά (N)					
Μητέρες με ζώντα νεογνά την 4η ημέρα (N)					
Εμφυτευμένα έμβρυα/μητέρα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Ζώντα νεογνά/μητέρα κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά τη γέννα (μέσος όρος)					
Αναλογία φύλων (α/θ) κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος γέννας κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη γέννηση (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά τη μέτρηση της πρωκτογεννητικής απόστασης (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών)					
Πρωκτογεννητική απόσταση νεογνών κατά την ίδια μεταγεννητική ημέρα, τη γέννηση – την 4η ημέρα (μέσος όρος αρσενικών, μέσος όρος θηλυκών, καταγραφή της ΜΓΗ)					

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΤΙΜΕΣ				
Βάρος νεογνών κατά την 4η ημέρα (μέσος όρος)					
Βάρος νεογνών κατά την 13η ημέρα (μέσος όρος)					
Διατηρούμενες θηλές αρσενικών νεογνών τη 13η ημέρα (μέσος όρος)					
	ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΝΕΟΓΝΑ				
Μητέρες με 0					
Μητέρες με 1					
Μητέρες με ≥ 2					
ΑΠΩΛΕΙΑ ΑΠΟΓΟΝΩΝ					
Προγεννητική (εμφυτευμένα έμβρυα μείον ζώντα νεογνά)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					
Μεταγεννητική (ζώντα κατά τη γέννα μείον ζώντα κατά τη 13η ΜΓΗ)					
Θηλυκά με 0					
Θηλυκά με 1					
Θηλυκά με 2					
Θηλυκά με ≥ 3					

([1]) τελευταία ημέρα της περιόδου ζευγαρώματος

Β.65 *IN VITRO* ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΦΡΑΓΜΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 435 του ΟΟΣΑ (2015). Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο δέρμα που εκδηλώνεται με τη μορφή ορατής νέκρωσης που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο μετά από εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας, όπως ορίζεται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών των Ηνωμένων Εθνών [Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1]). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών, που είναι ισοδύναμη με την επικαιροποιημένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 435 του ΟΟΣΑ, αποτελεί *in vitro* μέθοδο δοκιμών φραγμού μεμβράνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των διαβρωτικών χημικών ουσιών. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών χρησιμοποιείται μια τεχνητή μεμβράνη, σχεδιασμένη έτσι ώστε να αντιδρά στις διαβρωτικές χημικές ουσίες κατά τρόπο ανάλογο με δέρμα ζώου *in situ*.
2. Η διαβρωτικότητα στο δέρμα αξιολογείται παραδοσιακά μέσω εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο δέρμα ζώντων ζώων και την αξιολόγηση της έκτασης της βλάβης στους ιστούς μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα (2). Πέραν της παρούσας μεθόδου δοκιμών, έχουν εγκριθεί αρκετές άλλες *in vitro* μέθοδοι δοκιμών ως εναλλακτικές λύσεις (3)(4) αντί της τυπικής *in vivo* διαδικασίας σε δέρμα κουνελιού (κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος, που ισοδυναμεί με την TG 404 του ΟΟΣΑ) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαβρωτικών χημικών ουσιών (2). Στη στρατηγική κλιμακωτών δοκιμών και αξιολόγησης του GHS του ΟΗΕ για την αξιολόγηση και την ταξινόμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα, και στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA) για τον ερεθισμό/διάβρωση του δέρματος» του ΟΟΣΑ συνιστάται η χρήση επικυρωμένων και αποδεκτών *in vitro* μεθόδων δοκιμών βάσει των ενοτήτων 3 και 4 (1)(5). Στην IATA περιγράφονται ορισμένες ενότητες για την ομαδοποίηση πηγών πληροφοριών και εργαλείων ανάλυσης, και i) παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο ενσωμάτωσης και χρήσης των υφιστάμενων δεδομένων δοκιμών και δεδομένων εκτός δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού των χημικών ουσιών για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος και ii) προτείνεται μια προσέγγιση σε περίπτωση που απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, συμπεριλαμβανομένων και των περιπτώσεων όπου λαμβάνονται αρνητικά αποτελέσματα (5). Στο πλαίσιο αυτής της τμηματικής προσέγγισης, τα θετικά αποτελέσματα από μεθόδους δοκιμών *in vitro* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας ως διαβρωτικής χωρίς να χρειαστεί να διεξαχθούν δοκιμές σε ζώα, ώστε να περιορίζεται και να βελτιώνεται η χρήση των ζώων και να αποφεύγεται η πρόκληση πόνου και αγωνίας.
3. Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης για το *in vitro* μοντέλο φραγμού μεμβράνης που διατίθεται στο εμπόριο με την επωνυμία Corrositex® (6)(7)(8), στις οποίες καταδεικνύεται συνολική ορθότητα πρόβλεψης της διαβρωτικότητας στο δέρμα 79 % (128/163), ευαισθησία 85 % (76/89) και ειδικότητα 70 % (52/74) σε μια βάση δεδομένων 163 ουσιών και μειγμάτων (7). Δεδομένης της αναγνωρισμένης εγκυρότητάς της, η εν λόγω επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς (VRM) συνιστάται για χρήση στο πλαίσιο στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών για την αξιολόγηση της δυνητικής επικινδυνότητας διάβρωσης του δέρματος που ενέχουν οι χημικές ουσίες (5)(7). Για να καταστεί δυνατή η χρήση *in vitro* μοντέλου φραγμού μεμβράνης για τη διάβρωση του δέρματος για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αξιοπιστία, η καταλληλότητα (ορθότητα) και οι περιορισμοί της σε σχέση με την προτεινόμενη χρήση της, ούτως ώστε να διασφαλίζεται ότι είναι παρεμφερή με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (9), σύμφωνα με τα προκαθορισμένα πρότυπα επιδόσεων (10). Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων του ΟΟΣΑ θα διασφαλίζεται μόνον αφού τυχόν προτεινόμενη νέα ή επικαιροποιημένη μέθοδος που συμμορφώνεται με τα πρότυπα επιδόσεων επανεξεταστεί και συμπεριληφθεί στην ισοδύναμη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ. Επί του παρόντος, η κατευθυντήρια γραμμή 435 του ΟΟΣΑ και η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτουν μόνο μία *in vitro* μέθοδο, το εμπορικά διαθέσιμο μοντέλο Corrositex®.
4. Άλλες μέθοδοι δοκιμών για τη διεξαγωγή δοκιμών διαβρωτικότητας στο δέρμα βασίζονται στη χρήση ανασυσταθέντος ανθρώπινου δέρματος (TG 431 ΟΟΣΑ) (3) και απομονωμένου δέρματος επίμυος (TG 430 ΟΟΣΑ) (4). Η παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών προβλέπει επίσης την ταξινόμηση των διαβρωτικών χημικών ουσιών στις τρεις υποκατηγορίες διαβρωτικότητας του GHS του ΟΗΕ και στις τρεις ομάδες συσκευασίας μεταφοράς του ΟΗΕ για τη διαβρωτικότητα. Αυτή η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών εγκρίθηκε αρχικά το 2006 και επικαιροποιήθηκε το 2015 ώστε να παραπέμπει στο έγγραφο καθοδήγησης IATA και για λόγους επικαιροποίησης του καταλόγου ουσιών ελέγχου ικανότητας.

ΟΡΙΣΜΟΙ

5. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

6. Η δοκιμή που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών επιτρέπει τον προσδιορισμό διαβρωτικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και την ταξινόμηση των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (πίνακας 1). Επιπλέον, αυτή η μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ληφθούν αποφάσεις περί της διαβρωτικότητας ή μη ειδικών κατηγοριών χημικών ουσιών, π.χ. οργανικών και ανόργανων οξέων, παραγώγων οξέων ([2]) καιβάσεων

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353/1 της 31.12.2008.

([2]) Ο όρος «παράγωγο οξύ» είναι ένας χαρακτηρισμός μη ειδικής κατηγορίας, ο οποίος αφορά, υπό την ευρεία έννοια, χημική ουσία που παράγεται από οξύ είτε άμεσα είτε μέσω τροποποίησης ή μερικής υποκατάστασης. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τους ανυδρίτες, τα αλογονωμένα οξέα, τα άλατα και άλλα είδη χημικών ουσιών.

για ορισμένες δοκιμές που αφορούν τις μεταφορές (7)(11)(12). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια γενική διαδικασία, παρεμφερής με αυτήν της επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών αναφοράς (7). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τον ερεθισμό του δέρματος, αλλά η μέθοδος δοκιμών B.46 (ισοδύναμη με την TG 439 του ΟΟΣΑ) αφορά ειδικά τον ερεθισμό του δέρματος *in vitro* (13). Για την πλήρη αξιολόγηση των τοπικών επιδράσεων στο δέρμα μετά από εφάπαξ έκθεση του δέρματος, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τις ολοκληρωμένες προσεγγίσεις για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (5).

Πίνακας 1

Η κατηγορία και οι υποκατηγορίες ουσιών διαβρωτικών του δέρματος κατά το GHS του ΟΗΕ [1]

Κατηγορία διαβρωτικών (κατηγορία 1) (για αρχές που δεν χρησιμοποιούν υποκατηγορίες)	Υποκατηγορίες δυνητικά διαβρωτικών [1] (για αρχές που χρησιμοποιούν υποκατηγορίες, περιλαμβανομένου του κανονισμού CLP)	Διαβρωτικό σε ≥ 1 από 3 ζώα	
		Έκθεση	Παρατήρηση
Διαβρωτικό	Υποκατηγορία διαβρωτικών 1A	≤ 3 λεπτά	≤ 1 ώρα
	Υποκατηγορία διαβρωτικών 1B	> 3 λεπτά / ≤ 1 ώρα	≤ 14 ημέρες
	Υποκατηγορία διαβρωτικών 1C	> 1 ώρα / ≤ 4 ώρες	≤ 14 ημέρες

[1] Για την ΕΕ, ο κανονισμός CLP εφαρμόζει τις τρεις υποκατηγορίες διάβρωσης του δέρματος 1A, 1B και 1C.

7. Ένας περιορισμός της επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών (7) είναι ότι πολλές μη διαβρωτικές χημικές ουσίες και ορισμένες διαβρωτικές χημικές ουσίες μπορεί να μην πληρούν τα κριτήρια ώστε να υποβληθούν σε δοκιμές, βάσει των αποτελεσμάτων της αρχικής δοκιμής συμβατότητας (βλ. παράγραφο 13). Οι υδατικές χημικές ουσίες με pH που κυμαίνεται από 4,5 έως 8,5 συχνά δεν πληρούν τα κριτήρια ώστε να υποβληθούν σε δοκιμές· εντούτοις, το 85 % των χημικών ουσιών με pH εντός της συγκεκριμένης κλίμακας που υποβλήθηκαν σε δοκιμές ήταν μη διαβρωτικές σε δοκιμές σε ζώα (7). Η *in vitro* μέθοδος φραγμού μεμβράνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο στερεών (διαλυτών ή μη διαλυτών στο νερό), υγρών (υδατικών ή μη υδατικών) και γαλακτωμάτων. Εντούτοις, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν προκαλούν ανιχνεύσιμες μεταβολές στη δοκιμή συμβατότητας [αλλαγή χρώματος στο σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS) της επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών αναφοράς] δεν μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή με τη μέθοδο φραγμού μεμβράνης και θα πρέπει να ελέγχονται με χρήση άλλων μεθόδων δοκιμών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Το σύστημα δοκιμής απαρτίζεται από δύο στοιχεία: έναν συνθετικό μακρομοριακό βιοφραγμό και ένα σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS)· η παρούσα μέθοδος δοκιμών ανιχνεύει μέσω του φραγμού μεμβράνης CDS τις βλάβες που προκαλούν οι διαβρωτικές χημικές ουσίες μετά την εφαρμογή τους στην επιφάνεια του συνθετικού μακρομοριακού φραγμού μεμβράνης (7), προφανώς μέσω του ή των ίδιων μηχανισμών διάβρωσης που λειτουργούν και στο ζωντανό δέρμα.
9. Η διείσδυση διαμέσου του φραγμού μεμβράνης («διαφυγή») μπορεί να μετρηθεί με χρήση διαφόρων διαδικασιών ή CDS, περιλαμβανομένης της αλλαγής του χρώματος χρωματικού δείκτη pH ή κάποιας άλλης ιδιότητας του διαλύματος δείκτη κάτω από τον φραγμό.
10. Ο φραγμός μεμβράνης θα πρέπει να ελέγχεται ως προς την εγκυρότητά του, δηλαδή την καταλληλότητα και την αξιοπιστία του για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Στο πλαίσιο του εν λόγω ελέγχου θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι τα διάφορα παρασκευάσματα συνάδουν με τις ιδιότητες του φραγμού, π.χ. μπορούν να διατηρούν έναν φραγμό όταν χρησιμοποιούνται μη διαβρωτικές χημικές ουσίες και να παρέχουν τη δυνατότητα κατηγοριοποίησης των διαβρωτικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών με βάση τις διάφορες υποκατηγορίες διαβρωτικότητας του GHS του ΟΗΕ (1). Η ταξινόμηση βασίζεται στον χρόνο που απαιτείται για τη διείσδυση μιας χημικής ουσίας μέσω του φραγμού μεμβράνης στο διάλυμα δείκτη.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

11. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική την *in vitro* μέθοδο φραγμού μεμβράνης, που συμμορφώνεται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις δώδεκα συνιστώμενες στον πίνακα 2 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον δικαιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro* [π.χ. από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς (10)], υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 2

Ουσίες ελέγχου ικανότητας [1]

Ουσία [2]	CASRN	Χημική κατηγορία	*In vivo* υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ [3]	*In vitro* υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ [3]
Τριφθοριούχο βόριο διένυδρο	13319-75-0	Ανόργανα οξέα	1A	1A
Νιτρικό οξύ	7697-37-2	Ανόργανα οξέα	1A	1A
Πενταχλωρίδιο του φωσφόρου	10026-13-8	Πρόδρομες ουσίες ανόργανων οξέων	1A	1A
Βαλεριανυλοχλωρίδιο	638-29-9	Χλωρίδια οξέων	1B	1B
Υδροξείδιο του νατρίου	1310-73-2	Ανόργανες βάσεις	1B	1B
1-(2-Αμινοαιθυλο)-πιπεραζίνη	140-31-8	Αλειφατικές αμίνες	1B	1B
Βενζυλοσουλφονυλοχλωρίδιο	98-09-9	Χλωρίδια οξέων	1C	1C
N,N-Διμεθυλοβενζυλαμίνη	103-83-3	Ανιλίνες	1C	1C
Τετρααιθυλενοπενταμίνη	112-57-2	Αλειφατικές αμίνες	1C	1C
Ευγενόλη	97-53-0	Φαινόλες	NC	NC
Ακρυλικός εννεϋλεστέρας	2664-55-3	Ακρυλικές/μεθακρυλικές ενώσεις	NC	NC
Όξινο ανθρακικό νάτριο	144-55-8	Ανόργανα άλατα	NC	NC

[1] Οι δώδεκα ουσίες που απαριθμούνται ανωτέρω περιλαμβάνουν τρεις ουσίες από καθεμία από τις τρεις υποκατηγορίες διαβρωτικών ουσιών του GHS του ΟΗΕ, διατίθενται άμεσα από εμπορικούς προμηθευτές, και η κατάταξη σε υποκατηγορία του GHS του ΟΗΕ βασίζεται στα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμών υψηλής ποιότητας. Οι εν λόγω ουσίες προέρχονται από τον κατάλογο των 40 ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στον κατάλογο ελαχίστων χημικών ουσιών που έχει διαπιστωθεί ότι αποδεικνύουν την ορθότητα και καταλληλότητα των μεθόδων δοκιμών που είναι δομικά και λειτουργικά παρεμφερείς με την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς, και οι οποίες επιλέχθηκαν από τις 163 χημικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την επικύρωση της μεθόδου δοκιμών αναφοράς (Corrositex®) (7) (10) (14). Ο στόχος της εν λόγω διαδικασίας επιλογής ήταν η συμπερίληψη, στον βαθμό που ήταν εφικτό, χημικών ουσιών που παρουσίαζαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: ήταν αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων διαβρωτικότητας (π.χ. μη διαβρωτικές, διαβρωτικές των ομάδων συσκευασίας I, II και III του ΟΗΕ) τις οποίες η επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών αναφοράς μπορεί να μετρά ή να προβλέπει, ήταν αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία επικύρωσης, έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές, επήγαγαν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στην επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς, επήγαγαν οριστικά αποτελέσματα στην *in vivo* δοκιμή αναφοράς, ήταν εμπορικά διαθέσιμες, και δεν συνεπάγονταν απαγορευτικό κόστος απόρριψης (14).

[2] Οι ουσίες υποβλήθηκαν σε δοκιμή αμιγείς ή με καθαρότητα ≥ 90 %

[3] Οι ομάδες συσκευασίας του ΟΗΕ I, II και III αντιστοιχούν στις υποκατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ. NC: Μη διαβρωτικό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

12. Στις ακόλουθες παραγράφους περιγράφονται τα στοιχεία και οι διαδικασίες μεθόδου δοκιμών τεχνητού φραγμού μεμβράνης για την αξιολόγηση της διαβρωτικότητας (7)(15), με βάση την υφιστάμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, τη μέθοδο Corrositex® του εμπορίου. Ο φραγμός μεμβράνης και τα διαλύματα συμβατότητας/δείκτη και κατηγοριοποίησης μπορούν να κατασκευαστούν, να παρασκευαστούν ή να αποκτηθούν από το εμπόριο, όπως στην περίπτωση της μεθόδου Corrositex®. Για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς διατίθεται παράδειγμα πρωτοκόλλου μεθόδου δοκιμών (7). Οι δοκιμές θα πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (17-25 °C) και τα στοιχεία της μεθόδου θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις.

Δοκιμή συμβατότητας χημικών ουσιών

13. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής φραγμού μεμβράνης, διεξάγεται δοκιμή συμβατότητας για να προσδιοριστεί εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ανιχνεύσιμη από το CDS. Εάν το CDS δεν ανιχνεύει την υπό δοκιμή χημική ουσία, η μέθοδος δοκιμών φραγμού μεμβράνης δεν είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης ουσίας και θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί διαφορετική μέθοδος δοκιμών. Το CDS και οι συνθήκες έκθεσης που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή συμβατότητας θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν την έκθεση στην επακόλουθη δοκιμή φραγμού μεμβράνης.

Δοκιμή κατηγορίας χρονικής κλίμακας για υπό δοκιμή χημική ουσία

14. Εφόσον αρμόζει για τη μέθοδο δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία που έχει χαρακτηριστεί συμβατή βάσει της δοκιμής συμβατότητας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή κατηγορίας χρονικής κλίμακας, δηλαδή μια δοκιμή διαλογής για τη διάκριση μεταξύ ασθενών και ισχυρών οξέων ή βάσεων. Για παράδειγμα, στην επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς χρησιμοποιείται δοκιμή κατηγοριοποίησης χρονικής κλίμακας προκειμένου να υποδειχθεί ποια από τις δύο χρονικές κλίμακες θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί με βάση το κατά πόσον ανιχνεύεται σημαντικό όξινο/αλκαλικό απόθεμα. Για τον προσδιορισμό της διαβρωτικότητας και της υποκατηγορίας διαβρωτικότητας στο δέρμα κατά GHS του ΟΗΕ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές χρονικές κλίμακες διαφυγής, με βάση το όξινο/αλκαλικό απόθεμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ ΦΡΑΓΜΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Φραγμός μεμβράνης

15. Ο φραγμός μεμβράνης απαρτίζεται από δύο στοιχεία: μια πρωτεϊνούχο μακρομοριακή υδατική γέλη και μια διαπερατή μεμβράνη υποστήριξης. Η πρωτεϊνούχος γέλη θα πρέπει να είναι αδιαπέρατη από τα υγρά και τα στερεά, αλλά να μπορεί να διαβρωθεί και να καταστεί διαπερατή. Ο πλήρως κατασκευασμένος φραγμός μεμβράνης θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό προκαθορισμένες συνθήκες που έχει καταδειχθεί ότι αποτρέπουν κάθε αλλοίωση της γέλης, π.χ. ξήρανση, ανάπτυξη μικροβίων, μετατόπιση ή ράγισμα, που θα μπορούσε να υποβαθμίσει τις επιδόσεις της. Θα πρέπει να καθορίζεται η αποδεκτή περίοδος αποθήκευσης και τα παρασκευάσματα φραγμού μεμβράνης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από αυτή την περίοδο.

16. Η διαπερατή μεμβράνη υποστήριξης παρέχει μηχανική στήριξη στην πρωτεϊνούχο γέλη κατά τη διεργασία σχηματισμού της γέλης και την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η μεμβράνη υποστήριξης θα πρέπει να αποτρέπει τη χαλάρωση ή τη μετατόπιση της γέλης και θα πρέπει να είναι εύκολα διαπερατή από όλες τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

17. Η πρωτεϊνούχος γέλη αποτελείται από πρωτεΐνες, π.χ. κερατίνη, κολλαγόνο, ή μείγματα πρωτεϊνών που σχηματίζουν μία μήτρα γέλης, και χρησιμεύει ως στόχος για την υπό δοκιμή χημική ουσία. Το πρωτεϊνούχο υλικό τοποθετείται στην επιφάνεια της μεμβράνης υποστήριξης και αφήνεται να σχηματίσει γέλη προτού ο φραγμός μεμβράνης τοποθετηθεί πάνω από το διάλυμα δείκτη. Το πάχος και η πυκνότητα της πρωτεϊνούχου γέλης θα πρέπει να είναι ομοιόμορφα σε όλη τη γέλη και δεν θα πρέπει να υπάρχουν φυσαλίδες αέρα ή ελαττώματα που θα μπορούσαν να βλάψουν τη λειτουργική ακεραιότητά της.

Σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS)

18. Το διάλυμα δείκτης, που είναι το ίδιο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή συμβατότητας, θα πρέπει να αποκρίνεται στην παρουσία υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται χρωματικός δείκτης ή συνδυασμός χρωματικών δεικτών pH, π.χ. ερυθρό κρεζόλης και πορτοκαλί του μεθυλίου, που θα αλλάξουν χρώμα παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Το σύστημα μέτρησης μπορεί να είναι οπτικό ή ηλεκτρονικό.

19. Τα συστήματα ανίχνευσης που αναπτύσσονται για την ανίχνευση της διέλευσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσω της μεμβράνης φραγμού θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την καταλληλότητα και την αξιοπιστία τους προκειμένου να καταδεικνύεται το φάσμα των χημικών ουσιών που μπορούν να ανιχνευθούν καθώς και τα ποσοτικά όρια της ανίχνευσης.

ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συναρμολόγηση των στοιχείων της μεθόδου δοκιμών

20. Ο φραγμός μεμβράνης τοποθετείται σε φιαλίδιο (ή σωλήνα) που περιέχει το διάλυμα δείκτη κατά τρόπον ώστε η μεμβράνη υποστήριξης να έρχεται σε πλήρη επαφή με το διάλυμα δείκτη χωρίς να υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται η ακεραιότητα του φραγμού.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

21. Κατάλληλη ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. 500 μl υγρού ή 500 mg στερεού που έχει κονιοποιηθεί σε λεπτούς κόκκους (7), επιστρώνεται προσεκτικά και κατανέμεται ομοιόμορφα στην επάνω επιφάνεια του φραγμού μεμβράνης. Προετοιμάζεται κατάλληλος αριθμός πανομοιότυπων φιαλιδίων, π.χ. τέσσερις (7) για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και τους αντίστοιχους μάρτυρες (βλ. παραγράφους 23 έως 25). Καταγράφεται η χρονική στιγμή εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φραγμό μεμβράνης. Προκειμένου να διασφαλίζεται η ορθή καταγραφή των σύντομων χρόνων διάβρωσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία τοποθετείται σε κάθε πανομοιότυπο φιαλίδιο αφού παρέλθει ένα ορισμένο χρονικό διάστημα μετά την τοποθέτηση στο προηγούμενο φιαλίδιο.

Μέτρηση διεισδύσεων φραγμού μεμβράνης

22. Κάθε φιαλίδιο παρακολουθείται δεόντως, καταγράφεται η χρονική στιγμή της πρώτης παρατηρούμενης αλλαγής στο διάλυμα δείκτη, δηλαδή της διείσδυσης μέσω του φραγμού, και προσδιορίζεται ο χρόνος μεταξύ της εφαρμογής και της διείσδυσης μέσω του φραγμού μεμβράνης.

Μάρτυρες

23. Σε δοκιμές που περιλαμβάνουν τη χρήση φορέα ή διαλύτη με την υπό δοκιμή χημική ουσία, ο φορέας ή ο διαλύτης θα πρέπει να είναι συμβατοί με το σύστημα φραγμού μεμβράνης, δηλ. να μην υποβαθμίζουν την ακεραιότητα του συστήματος φραγμού μεμβράνης, και δεν θα πρέπει να αλλοιώνουν τη διαβρωτικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Ανάλογα με την περίπτωση, ένας μάρτυρας διαλύτη (ή φορέα) θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή παράλληλα με την υπό δοκιμή χημική ουσία προκειμένου να καταδεικνύεται η συμβατότητα του διαλύτη με το σύστημα φραγμού μεμβράνης.

24. Ένας θετικός (διαβρωτικός) μάρτυρας μέτριας διαβρωτικής δραστηριότητας, π.χ. 110 ± 15 mg υδροξειδίου του νατρίου (υποκατηγορία διαβρωτικών 1B του GHS του ΟΗΕ) (7), θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή παράλληλα με την υπό δοκιμή χημική ουσία προκειμένου να αξιολογείται κατά πόσον οι επιδόσεις του συστήματος δοκιμής είναι αποδεκτές. Ένας δεύτερος θετικός μάρτυρας της ίδιας χημικής κατηγορίας με την υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να είναι χρήσιμος για την αξιολόγηση του σχετικού δυναμικού διαβρωτικότητας μιας διαβρωτικής ουσίας. Θα πρέπει να επιλέγονται θετικοί μάρτυρες μέτριας διαβρωτικότητας (π.χ. υποκατηγορία 1B του GHS του ΟΗΕ) προκειμένου να ανιχνεύονται αλλαγές που επιμηκύνουν ή συντομεύουν τον χρόνο διείσδυσης σε βαθμό μη αποδεκτό σε σχέση με την καθορισμένη τιμή αναφοράς, και που, ως εκ τούτου, υποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής δεν λειτουργεί σωστά. Για τον σκοπό αυτό, οι εξαιρετικά διαβρωτικές (υποκατηγορία 1A του GHS του ΟΗΕ) ή οι μη διαβρωτικές χημικές ουσίες δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμες. Μια διαβρωτική χημική ουσία υποκατηγορίας 1B του GHS του ΟΗΕ θα επιτρέψει τον εντοπισμό ιδιαίτερα σύντομου ή ιδιαίτερα αργού χρόνου διαφυγής. Ένα ασθενές διαβρωτικό (υποκατηγορία 1C του GHS του ΟΗΕ) μπορεί να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της ικανότητας της μεθόδου δοκιμών να διακρίνει με συνέπεια τις ασθενώς διαβρωτικές από τις μη διαβρωτικές ουσίες. Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη προσέγγιση, θα πρέπει να αναπτύσσεται ένα αποδεκτό εύρος απόκρισης θετικού μάρτυρα με βάση το ιστορικό εύρος χρόνων διαφυγής για τους χρησιμοποιούμενους θετικούς μάρτυρες, όπως οι μέσες τιμές ± 2-3 τυπικές αποκλίσεις. Σε κάθε μελέτη, θα πρέπει να καθορίζεται ο ακριβής χρόνος διαφυγής για τον θετικό μάρτυρα ούτως ώστε να είναι εφικτός ο εντοπισμός των αποκλίσεων που δεν εμπίπτουν στο αποδεκτό εύρος.

25. Επίσης, θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή αρνητικός (μη διαβρωτικός) μάρτυρας, π.χ. 10 % κιτρικό οξύ, 6 % προπιονικό οξύ (7), παράλληλα με την υπό δοκιμή χημική ουσία, ως ένα ακόμη μέτρο ποιοτικού ελέγχου που καταδεικνύει τη λειτουργική ακεραιότητα του φραγμού μεμβράνης.

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

26. Σύμφωνα με τις καθιερωμένες χρονικές παραμέτρους για καθεμία από τις υποκατηγορίες διαβρωτικότητας του GHS του ΟΗΕ, ο χρόνος (σε λεπτά) που παρέρχεται μεταξύ της εφαρμογής μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φραγμό μεμβράνης και της διείσδυσης διαμέσου του φραγμού χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της διαβρωτικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Προκειμένου μια μελέτη να θεωρηθεί αποδεκτή, ο παράλληλος θετικός μάρτυρας θα πρέπει να εμφανίζει τον αναμενόμενο χρόνο απόκρισης διείσδυσης (π.χ. 8-16 λεπτά χρόνου διαφυγής για το υδροξείδιο του νατρίου, εφόσον χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας), ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας δεν θα πρέπει να είναι διαβρωτικός, και, εφόσον περιλαμβάνεται, ο παράλληλος μάρτυρας με διαλύτη δεν θα πρέπει να είναι ούτε διαβρωτικός ούτε να αλλοιώνει το δυναμικό διαβρωτικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική μια μέθοδο που συμφωνεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να μπορούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις συνιστώμενες δώδεκα ουσίες που εμφαίνονται στον πίνακα 2. Για τις νέες μεθόδους παρόμοιου τύπου («me-too») που αναπτύσσονται βάσει της παρούσας μεθόδου δοκιμών και οι οποίες είναι δομικά και λειτουργικά παρεμφερείς με την επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς (14), θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα προκαθορισμένα πρότυπα επιδόσεων για να καταδεικνύεται η αξιοπιστία και η ορθότητα της νέας μεθόδου, πριν από τη χρήση της για τη διεξαγωγή δοκιμών για κανονιστικούς σκοπούς (10).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και κατηγοριοποίηση διαβρωτικότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

27. Ο χρόνος (σε λεπτά) που παρέρχεται μεταξύ της εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον φραγμό μεμβράνης και της διείσδυσης μέσω της μεμβράνης χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως προς τις υποκατηγορίες διαβρωτικών του GHS του ΟΗΕ (1) και, ανάλογα με την περίπτωση, την ομάδα συσκευασίας ΟΗΕ (16). Για κάθε προτεινόμενη μέθοδο δοκιμών καθορίζονται τιμές χρόνου αποκοπής για καθεμία από τις τρεις υποκατηγορίες διαβρωτικών. Κατά τις τελικές αποφάσεις σχετικά με τους χρόνους αποκοπής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ανάγκη ελαχιστοποίησης της υποτίμησης της επικινδυνότητας διάβρωσης κατά την ταξινόμηση (ψευδοαρνητικά αποτελέσματα). Στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι χρόνοι αποκοπής της μεθόδου Corrositex®, όπως δίνονται στον πίνακα 3, διότι αυτή είναι η μοναδική μέθοδος δοκιμών που εμπίπτει επί του παρόντος στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (7).

Πίνακας 3

Μοντέλο πρόβλεψης Corrositex®

Μέσος χρόνος διαφυγής (λεπτά)		Πρόβλεψη του GHS του ΟΗΕ ([3])
Χημικές ουσίες δοκιμής κατηγορίας 1 ([1]) (καθορίζονται βάσει της δοκιμής κατηγοριοποίησης της μεθόδου)	Χημικές ουσίες δοκιμής κατηγορίας 2 ([2]) (καθορίζονται βάσει της δοκιμής κατηγοριοποίησης της μεθόδου)	
0-3 λεπτά	0-3 λεπτά	Διαβρωτικό προαιρετική υποκατηγορία 1A
> 3 έως 60 λεπτά	> 3 έως 30 λεπτά	Διαβρωτικό προαιρετική υποκατηγορία 1B
> 60 έως 240 λεπτά	> 30 έως 60 λεπτά	Διαβρωτικό προαιρετική υποκατηγορία 1C
> 240 λεπτά	> 60 λεπτά	Μη διαβρωτικό

([1]) Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με υψηλό όξινο/αλκαλικό απόθεμα (6)
([2]) Υπό δοκιμή χημικές ουσίες με χαμηλό όξινο/αλκαλικό απόθεμα (6)
([3]) Υποκατηγορίες 1A, 1B και 1C του GHS του ΟΗΕ που αντιστοιχούν στις ομάδες συσκευασίας I, II και III του ΟΗΕ αντίστοιχα

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

28. Ο χρόνος (σε λεπτά) που παρέρχεται μεταξύ της εφαρμογής και της διείσδυσης μέσω του φραγμού για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τον θετικό μάρτυρα/-ες θα πρέπει να αναφέρεται υπό μορφή πίνακα ως δεδομένα μεμονωμένων πανομοιότυπων δειγμάτων, καθώς και ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση για κάθε δοκιμή.

Έκθεση δοκιμής

29. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες:

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— προέλευση, αριθμός παρτίδας εάν είναι διαθέσιμος,

— κατεργασία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας/μάρτυρα πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης ή ημερομηνία νέας ανάλυσης, εάν είναι γνωστή,

— συνθήκες φύλαξης.

Φορέας:

— ταυτοποίηση, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Χρησιμοποιούμενο in vitro μοντέλο φραγμού μεμβράνης και πρωτόκολλο, περιλαμβανομένης της καταδειχθείσας ορθότητας και αξιοπιστίας

Συνθήκες δοκιμής:

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος εξοπλισμού και διαδικασιών προετοιμασίας,

— προέλευση και σύνθεση του χρησιμοποιηθέντος *in vitro* φραγμού μεμβράνης,

— σύνθεση και ιδιότητες του διαλύματος δείκτη,

— μέθοδος ανίχνευσης,

— ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μαρτύρων,

— αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων,

— περιγραφή και αιτιολόγηση της δοκιμής κατηγοριοποίησης χρονικής κλίμακας,

— μέθοδος εφαρμογής,

— χρόνοι παρατήρησης,

— περιγραφή των κριτηρίων αξιολόγησης και ταξινόμησης που εφαρμόστηκαν,

— κατάδειξη της τεχνικής ικανότητας διεξαγωγής της μεθόδου δοκιμών προτού χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική, μέσω ελέγχου των χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Αποτελέσματα:

— παρουσίαση υπό μορφή πίνακα των ατομικών ανεπεξέργαστων δεδομένων από μεμονωμένα δείγματα δοκιμής και μάρτυρα για κάθε πανομοιότυπο δείγμα,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(3) Κεφάλαιο B.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE).

(4) Κεφάλαιο B.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος *in vitro*: Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Κεφάλαιο B.46 του παρόντος παραρτήματος: Δερματικός ερεθισμός *in vitro*: μέθοδος δοκιμών σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Σύστημα ανίχνευσης χημικών ουσιών (CDS): σύστημα οπτικής ή ηλεκτρονικής μέτρησης με διάλυμα δείκτη που αντιδρά στην παρουσία μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. με αλλαγή του χρωματικού δείκτη ή του συνδυασμού χρωματικών δεικτών pH, των οποίων το χρώμα αλλάζει παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ή με άλλα είδη χημικών ή ηλεκτροχημικών αντιδράσεων.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται ενίοτε εναλλακτικά προς τον όρο «ορθότητα», και ορίζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν ταξινομηθεί ορθά ως θετικές ή αρνητικές. Η συμφωνία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιπολασμό των θετικών ουσιών στα είδη των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ελέγχονται (9).

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals – Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

NC: μη διαβρωτικό.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Περιλαμβάνονται i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και iii) τα ανάλογα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (9).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της μεθόδου δοκιμών με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η μέθοδος δοκιμών μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (9).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (9).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη, η αιμορραγία, οι αιματηρές εσχάρες και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τέλεια αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (9).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Β.66 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ με βάση τις επιδόσεις

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 455 του ΟΟΣΑ (2016). Η TG 455 είναι μια κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών με βάση τις επιδόσεις (PBTG), στην οποία περιγράφονται οι *in vitro* δοκιμασίες διενεργοποίησης σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων για την ανίχνευση αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (δοκιμασίες ER TA). Περιλαμβάνει αρκετές μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερείς μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (δηλ. ERα και/ή ERβ) και αναμένεται να διευκολύνει την ανάπτυξη νέων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών, σύμφωνα με τις αρχές επικύρωσης που καθορίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης «Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment» (Έγγραφο καθοδήγησης για την επικύρωση και τη διεθνή αποδοχή νέων ή επικαιροποιημένων μεθόδων δοκιμών για την αξιολόγηση του κινδύνου) του ΟΟΣΑ (1). Οι πλήρως επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών αναφοράς (προσάρτημα 2 και προσάρτημα 3) που αποτελούν τη βάση για την εν λόγω PBTG είναι οι ακόλουθες:

— Η δοκιμασία διενεργοποίησης σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (STTA) (2) όπου χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά (h) ERα-HeLa-9903, και

— Η δοκιμασία ER TA VM7Luc (3) όπου χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά VM7Luc4E2 ([1]), η οποία εκφράζει κυρίως τον hERα με κάποια συμβολή και του hERβ (4)(5).

Όσον αφορά την ανάπτυξη και την επικύρωση παρεμφερών δοκιμασιών για την ίδια παράμετρο επικινδυνότητας, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (6) (7). Επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της PBTG 455, ούτως ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να προστίθενται νέες παρεμφερείς δοκιμασίες σε μια επικαιροποιημένη PBTG· εντούτοις, παρεμφερείς δοκιμασίες θα προστίθενται μόνο αφού τις εξετάσει ο ΟΟΣΑ και συμφωνήσει ότι πληρούνται τα πρότυπα επιδόσεων. Οι δοκιμασίες που περιλαμβάνονται στην TG 455 μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών μελών του ΟΟΣΑ όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με τη διενεργοποίηση των υποδοχέων οιστρογόνων, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

Ιστορικό και αρχές των δοκιμασιών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

2. Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δράση πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων και την εκπόνηση νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών αναθεωρήθηκε το 2012. Το αρχικό και το αναθεωρημένο εννοιακό πλαίσιο περιλαμβάνονται ως παραρτήματα στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ «Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption» (Τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού χημικών ουσιών ως ενδοκρινικών διαταρακτών) (8). Το εννοιακό πλαίσιο περιλαμβάνει πέντε επίπεδα, καθένα εκ των οποίων αντιστοιχεί σε διαφορετικό επίπεδο βιολογικής πολυπλοκότητας. Οι δοκιμασίες διενεργοποίησης (TA) ER που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών κατατάσσονται στο επίπεδο 2, το οποίο περιλαμβάνει «*in vitro δοκιμασίες για την παροχή δεδομένων σχετικά με επιλεγμένους ενδοκρινικούς μηχανισμούς/οδούς*». Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά *in vitro* δοκιμασίες διενεργοποίησης (TA) που έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό των αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων (ER).

3. Η αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με τους ER μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων, με αποτέλεσμα την επαγωγή ή την αναστολή κυτταρικών διεργασιών, περιλαμβανομένων όσων είναι αναγκαίες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου και την αναπαραγωγική λειτουργία (9)(10)(11). Η διατάραξη των φυσιολογικών οιστρογονικών συστημάτων μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη (οντογένεση), την αναπαραγωγική υγεία και την ακεραιότητα του αναπαραγωγικού συστήματος.

4. Οι *in vitro* δοκιμασίες TA βασίζονται στην άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση των ουσιών με ειδικό υποδοχέα που ρυθμίζει τη μεταγραφή προϊόντος γονιδίου αναφοράς. Οι δοκιμασίες αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως για την αξιολόγηση της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζεται από ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς όπως οι ER (12) (13) (14) (15) (16). Έχουν προταθεί για την ανίχνευση της οιστρογονικής διενεργοποίησης που ρυθμίζεται από τον ER (17) (18) (19). Υπάρχουν τουλάχιστον δύο κύριοι υποτύποι πυρηνικών ER, οι α και β, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες καθώς και διαφορετικές κατανομές στους ιστούς και συγγένειες δέσμευσης προσδεμάτων (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Ο πυρηνικός ERα διαμεσολαβεί την κλασική οιστρογονική απόκριση (27)(28)(29)(30) και, ως εκ τούτου, τα περισσότερα μοντέλα που αναπτύσσονται σήμερα για τη μέτρηση της ενεργοποίησης ή αναστολής των ER αφορούν ειδικά τον ERα. Οι δοκιμασίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών πουενεργοποιούν

(ή αναστέλλουν) τον ER μετά τη δέσμευση του προσδέματος, μετά την οποία το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος συνδέεται σε ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί ένα γονίδιο αναφοράς, με αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρική έκφραση μιας πρωτεΐνης δείκτη. Στις δοκιμασίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές αποκρίσεις γονιδίων αναφοράς. Σε συστήματα που βασίζονται στη λουσιφεράση, το ένζυμο λουσιφεράση μετασχηματίζει το υπόστρωμα λουσιφερίνη σε βιοφωταυγές προϊόν που μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με λουμινόμετρο. Άλλα παραδείγματα κοινών γονιδίων αναφοράς είναι η φθορίζουσα πρωτεΐνη και το γονίδιο *LacZ*, που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που μπορεί να μετασχηματίσει το άχρωμο υπόστρωμα X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλογαλακτοπυρανοζίτης) σε κυανό προϊόν που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με φασματοφωτόμετρο. Τα εν λόγω γονίδια αναφοράς μπορούν να αξιολογηθούν γρήγορα και με χαμηλό κόστος με χρήση εμπορικά διαθέσιμων κιτ δοκιμής.

5. Μελέτες επικύρωσης της STTA και των δοκιμασιών VM7Luc έχουν καταδείξει την καταλληλότητα και την αξιοπιστία τους ως προς τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται (3)(4)(5)(30). Τα πρότυπα επιδόσεων για τις δοκιμασίες ER TA με βάση τη φωταύγεια που χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές μαστού περιλαμβάνονται στην έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων έχουν τροποποιηθεί με σκοπό να μπορούν να εφαρμόζονται και στις δύο δοκιμασίες TA, την STTA και τη VM7Luc (2).

6. Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

Πεδίο εφαρμογής και περιορισμοί που σχετίζονται με τις δοκιμασίες TA

7. Οι δοκιμασίες αυτές προτείνονται για σκοπούς διαλογής και απόδοσης προτεραιότητας, αλλά μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες μηχανιστικού χαρακτήρα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης. Αφορούν TA που επάγεται από τη δέσμευση χημικών ουσιών στους ER σε σύστημα *in vitro*. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να παρεκβάλλονται άμεσα στην πολύπλοκη σηματοδότηση και ρύθμιση του ακέραιου ενδοκρινικού συστήματος *in vivo*.

8. Η TA που διαμεσολαβείται από τους ER θεωρείται ένας από τους κύριους μηχανισμούς διατάραξης του ενδοκρινικού συστήματος, αν και υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί όπως i) αλληλεπιδράσεις με άλλους υποδοχείς και ενζυμικά συστήματα του ενδοκρινικού συστήματος, ii) σύνθεση ορμονών, iii) μεταβολική ενεργοποίηση και/ή αδρανοποίηση ορμονών, iv) κατανομή των ορμονών στους ιστούς στόχους, και v) απομάκρυνση των ορμονών από το σώμα. Καμία από τις δοκιμασίες στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών δεν αφορά τους συγκεκριμένους τρόπους δράσης.

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την ικανότητα των χημικών ουσιών να ενεργοποιούν (δηλ. να δρουν ως αγωνιστές) καθώς επίσης και να καταστέλλουν (δηλ. να δρουν ως ανταγωνιστές) της μεταγραφής που εξαρτάται από τους ER. Ορισμένες χημικές ουσίες μπορούν να δρουν τόσο ως αγωνιστές όσο και ως ανταγωνιστές, ανάλογα με τον τύπο του εκάστοτε κυττάρου, και είναι γνωστές ως επιλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων (SERM). Πριν από την εξαγωγή συμπεράσματος περί μη δέσμευσής τους στον ER, οι χημικές ουσίες που είναι αρνητικές στις δοκιμασίες αυτές μπορούν να αξιολογούνται σε δοκιμασία δέσμευσης στον υποδοχέα. Επιπλέον, οι δοκιμασίες χρησιμεύουν στη διευκρίνιση της δράσης του γονικού μορίου μόνον εφόσον ληφθούν υπόψη οι περιορισμένες μεταβολικές ικανότητες των *in vitro* κυτταρικών συστημάτων. Δεδομένου ότι κατά την επικύρωση χρησιμοποιήθηκαν μόνο μεμονωμένες χημικές ουσίες, δεν έχει εξεταστεί η εφαρμοσιμότητα σε μείγματα δοκιμών. Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως θεωρητικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών, UVCB και μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε πολυσυστατική ουσία, UVCB ή μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

10. Για λόγους πληροφόρησης, στον πίνακα 1 παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών αγωνιστών για τις 34 ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο πλαίσιο αμφότερων των πλήρως επικυρωμένων μεθόδων δοκιμών αναφοράς που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Εξ αυτών των ουσιών, οι 26 είναι ταξινομημένες ως οριστικοί αγωνιστές ER και οι 8 ως αρνητικές με βάση δημοσιευμένες εργασίες, περιλαμβανομένων και *in vitro* δοκιμασιών για δέσμευση στους ER και για TA, και/ή της μητροτροφικής δοκιμασίας (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών ανταγωνιστών για τις 15 ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο πλαίσιο αμφότερων των πλήρως επικυρωμένων μεθόδων δοκιμών αναφοράς που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Εξ αυτών των ουσιών, οι 4 είναι ταξινομημένες ως οριστικοί/θεωρούμενοι ανταγωνιστές ER και οι 10 ως αρνητικές με βάση δημοσιευμένες εργασίες, περιλαμβανομένων και *in vitro* δοκιμασιών για δέσμευση στους ER και για TA (2)(3)(18)(31). Όσον αφορά τα δεδομένα που παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1 και στον πίνακα 2, υπήρξε 100 % συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων δοκιμών αναφοράς σχετικά με τις ταξινομήσεις όλων των ουσιών, με εξαίρεση μία ουσία (μιφεπριστόνη) για δοκιμασία ανταγωνιστών, και κάθε ουσία ταξινομήθηκε σωστά ως αγωνιστής/ανταγωνιστής ER ή ως αρνητική. Συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εν λόγω ομάδα χημικών ουσιών καθώς και πρόσθετων χημικών ουσιών που υποβλήθηκαν σε δοκιμή με τις μεθόδους ER TA STTA και VM7Luc στη διάρκεια των μελετών επικύρωσης παρέχονται στα πρότυπα επιδόσεων για την ERTA (6)(7), προσάρτημα 2 (πίνακες 1, 2 και 3).

Πίνακας 1

Επισκόπηση των αποτελεσμάτων από τις δοκιμασίες STTA και ER TA VM7Luc για ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή και στις δύο δοκιμασίες αγωνιστών και ταξινομήθηκαν ως αγωνιστές ER (ΘΕΤ.) ή αρνητικές (ΑΡΝ.)

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA [4]			Δοκιμασία ER TA VM7Luc [5]		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση [7]		
			Δράση TA ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} [2] (M)	Δράση TA ER	Τιμή EC_{50} [2], [6] (M)	Άλλες ER TA [3]	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
1	17β-Οιστραδιόλη [1]	50-28-2	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$5{,}63 \times 10^{-12}$	ΘΕΤ. (227/227)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
2	17α-Οιστραδιόλη [1]	57-91-0	ΘΕΤ.	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.	$1{,}40 \times 10^{-9}$	ΘΕΤ.(11/11)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
3	17α-Αιθινυλοιστραδιόλη [1]	57-63-6	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$7{,}31 \times 10^{-12}$	ΘΕΤ.(22/22)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
4	17β-Τρενβολόνη	10161-33-8	ΘΕΤ.	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$4{,}20 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ. (2/2)	Δ/Ε	Δ/Ε
5	19-Νορτεστοστερόνη [1]	434-22-0	ΘΕΤ.	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1{,}80 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(4/4)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
6	4-Κουμυλοφαινόλη [1]	599-64-4	ΘΕΤ.	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$3{,}20 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(5/5)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
7	4-*tert*-Οκτυλοφαινόλη [1]	140-66-9	ΘΕΤ.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.	$3{,}19 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.(21/24)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
8	Απιγενίνη [1]	520-36-5	ΘΕΤ.	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1{,}60 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(26/26)	ΘΕΤ.	Δ/Ε

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA [4]			Δοκιμασία ER TA VM7Luc [5]		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση [7]		
			Δράση TA ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} [2] (M)	Δράση TA ER	Τιμή EC_{50} [2], [6] (M)	Άλλες ER TA [3]	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
9	Ατραζίνη [1]	1912-24-9	APN.	–	–	APN.	–	APN. (30/30)	APN.	Δ/Ε
10	Δισφαινόλη Α [1]	80-05-7	ΘΕΤ.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$5{,}33 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ. (65/65)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
11	Δισφαινόλη Β [1]	77-40-7	ΘΕΤ.	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1{,}95 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(6/6)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
12	Φθαλικό βουτύλιο βενζύλιο [1]	85-68-7	ΘΕΤ.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$1{,}98 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(12/14)	ΘΕΤ.	APN.
13	Κορτικοστερόνη [1]	50-22-6	APN.	—	—	APN.	—	APN.(6/6)	APN.	Δ/Ε
14	Κουμεστρόλη [1]	479-13-0	ΘΕΤ.	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.	$1{,}32 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(30/30)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
15	Δαϊδζεΐνη [1]	486-66-8	ΘΕΤ.	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$7{,}95 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(39/39)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
16	Διαιθυλοστιλβεστρόλη [1]	56-53-1	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$3{,}34 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.(42/42)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
17	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο	84-74-2	ΘΕΤ.	$4{,}09 \times 10^{-6}$		ΘΕΤ.	$4{,}09 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(6/11)	ΘΕΤ.	APN.
18	4-Υδροξυβενζοϊκό αιθύλιο	120-47-8	ΘΕΤ.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(χωρίς PC_{50})	ΘΕΤ.	$2{,}48 \times 10^{-5}$	ΘΕΤ.		Δ/Ε
19	Οιστρόνη [1]	53-16-7	ΘΕΤ.	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.	$2{,}34 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.(26/28)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
20	Γενιστεΐνη [1]	446-72-0	ΘΕΤ.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	ΘΕΤ.	$2{,}71 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(100/102)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA [4]			Δοκιμασία ER TA VM7Luc [5]		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση [7]		
			Δράση TA ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} [2] (M)	Δράση TA ER	Τιμή EC_{50} [2], [6] (M)	Άλλες ER TA [3]	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
21	Αλοπεριδόλη	52-86-8	APN.	—	—	APN.	—	APN. (2/2)	APN.	Δ/Ε
22	Καμφερόλη [1]	520-18-3	ΘΕΤ.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$3{,}99 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(23/23)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
23	Κεπόνη [1]	143-50-0	ΘΕΤ.	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.(14/18)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
24	Κετοκοναζόλη	65277-42-1	APN.	—	—	APN.	—	APN. (2/2)	APN.	Δ/Ε
25	Λινουρόνη [1]	330-55-2	APN.	—	—	APN.	—	APN. (8/8)	APN.	Δ/Ε
26	*meso*-Εξεστρόλη [1]	84-16-2	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.	$1{,}65 \times 10^{-11}$	ΘΕΤ.(4/4)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
27	Μεθυλοτεστοστερόνη [1]	58-18-4	ΘΕΤ.	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$2{,}68 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(5/6)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
28	Μορίνη	480-16-0	ΘΕΤ.	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$2{,}37 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(2/2)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
29	Νορεθυνοδρέλη [1]	68-23-5	ΘΕΤ.	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	ΘΕΤ.	$9{,}39 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.(5/5)	ΘΕΤ.	Δ/Ε
30	*p,p'*-Methoxychlor [1]	72-43-5	ΘΕΤ.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(χωρίς PC_{50}) [2]	ΘΕΤ.	$1{,}92 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.(24/27)	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.
31	Φαινοβαρβιτάλη [1]	57-30-7	APN.	—	—	APN.	—	APN. (2/2)	APN.	Δ/Ε

	Ουσία	CASRN	Δοκιμασία STTA (4)			Δοκιμασία ER TA VM7Luc (5)		Πηγή δεδομένων για ταξινόμηση (7)		
			Δράση TA ER	Τιμή PC_{10} (M)	Τιμή PC_{50} (2) (M)	Δράση TA ER	Τιμή EC_{50} (2), (6) (M)	Άλλες ER TA (3)	Δέσμευση στους ER	Μητροτροφική
32	Ρεσερπίνη	50-55-5	APN.	—	—	APN.	—	APN. (4/4)	APN.	Δ/Ε
33	Σπειρονολακτόνη (1)	52-01-7	APN.	—	—	APN.	—	APN. (4/4)	APN.	Δ/Ε
34	Τεστοστερόνη	58-22-0	ΘΕΤ.	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	ΘΕΤ.	$1{,}75 \times 10^{-5}$	ΘΕΤ.(5/10)	ΘΕΤ.	Δ/Ε

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, M = γραμμομοριακή, EC_{50} = ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, ΘΕΤ. = θετική, Δ/Ε = δεν ελέγχθηκε, PC_{10} (και PC_{50}) = η συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία η απόκριση είναι το 10 % (ή το 50 % για την PC_{50}) της απόκρισης που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2, 1 nm) σε κάθε τρυβλίο.

(1) Κοινές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc και οι οποίες χαρακτηρίστηκαν αγωνιστές ER ή αρνητικές και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc (έκθεση αξιολόγησης ICCVAM VM7Luc ER TA, πίνακας 4-1 (3)).

(2) Η μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε όταν δεν υπήρχαν περιορισμοί λόγω κυτταροτοξικότητας ή αδιαλυτότητας ήταν 1×10^{-5} M (δοκιμασία STTA) και 1×10^{-3} M (δοκιμασία ER TA VM7Luc).

(3) Ο αριθμός σε παρένθεση αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα της δοκιμής που ταξινομήθηκαν ως θετικά (ΘΕΤ.) ή αρνητικά (APN.) επί του συνολικού αριθμού των αναφερόμενων μελετών.

(4) Οι τιμές αναφέρονται στο «Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)»

(5) Έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): «An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists» (3)

(6) Οι μέσες τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

(7) Η ταξινόμηση ως αγωνιστή ER ή αρνητική βασίστηκε στις πληροφορίες που περιλαμβάνονται στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις μεθόδους δοκιμών δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε πληροφορίες που ελήφθησαν από δημοσιευμένα έντυπα και εξετάστηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34). Σημειώσεις: Κάθε δοκιμασία στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιλαμβάνει διαφορετικές μετρήσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} δεν είναι εφικτός λόγω του ότι δεν παράγεται πλήρης καμπύλη απόκρισης. Παρότι με τη δοκιμασία STTA η τιμή PC_{10} αποτελεί βασική μέτρηση, ενδέχεται να υπάρχουν και άλλα παραδείγματα στα οποία μια τιμή PCx θα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες.

Πίνακας 2

Σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις δοκιμασίες STTA και ER TA VM7Luc για ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή και στις δύο δοκιμασίες ανταγωνιστών και ταξινομήθηκαν ως ανταγωνιστές ER (ΘΕΤ.) ή αρνητικές (ΑΡΝ.)

	Ουσία [1]	CASRN	Δοκιμασία STTA ER [3]		Δοκιμασία ER TA VM7Luc [4]		Πιθανές επιδράσεις STTA ER [6]	Συναινετική ταξινόμηση [7] ICCVAM	MeSH [8] Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος [9]
			Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} [2] (M)	Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} [2], [5] (M)				
1	4-Υδροξυταμοξιφαίνη	68047-06-3	ΘΕΤ.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	ΘΕΤ.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
2	Διβενζο[a.h]ανθρακένιο	53-70-3	ΘΕΤ.	Χωρίς IC_{50}	ΘΕΤ.	Χωρίς IC_{50}	ΘΕΤ.	Θ/ΘΕΤ.	Πολυκυκλική ένωση	Εργαστηριακή χημική ουσία, φυσικό προϊόν
3	Μιφεπριστόνη	84371-65-3	ΘΕΤ.	$5{,}61 \times 10^{-6}$	ΑΡΝ.	—	ήπια ΘΕΤ.	ΑΡΝ.	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν
4	Υδροχλωρική ραλοξιφαίνη	82640-04-8	ΘΕΤ.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	ΘΕΤ.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
5	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	ΘΕΤ.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
6	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	Θ/ΑΡΝ.	Θ/ΑΡΝ.	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
7	Απιγενίνη	520-36-5	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Ετεροκυκλική ένωση	Χρωστική, φυσικό προϊόν, ενδιάμεση φαρμακευτική ουσία,

	Ουσία [1]	CASRN	Δοκιμασία STTA ER [3]		Δοκιμασία ER TA VM7Luc [4]		Πιθανές επιδράσεις STTA ER [6]	Συναινετική ταξινόμηση [7] ICCVAM	MeSH [8] Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος [9]
			Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} [2] (M)	Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} [2], [5] (M)				
8	Ατραζίνη	1912-24-9	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	Θ/ΑΡΝ.	Ετεροκυκλική ένωση	Ζιζανιοκτόνο
9	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο	84-74-2	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Εστέρας, φθαλικό οξύ	Συστατικό καλλυντικών, βιομηχανική χημική ουσία, πλαστικοποιητής
10	Φεναριμόλη	60168-88-9	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	δεν ελέγχθηκε	Δ/Ε	Ετεροκυκλική ένωση, πυριμιδίνη	Μυκητοκτόνο
11	Φλαβόνη	525-82-6	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	Θ/ΑΡΝ.	Θ/ΑΡΝ.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
12	Φλουταμίδη	13311-84-7	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	Θ/ΑΡΝ.	Αμίδιο	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
13	Γενιστεΐνη	446-72-0	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	Θ/ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
14	p-n-Εννεϋλοφαινόλη	104-40-5	ΑΡΝ.	—	ΑΡΝ.	—	δεν ελέγχθηκε	ΑΡΝ.	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία

	Ουσία ([1])	CASRN	Δοκιμασία STTA ER ([3])		Δοκιμασία ER TA VM7Luc ([4])		Πιθανές επιδράσεις STTA ER ([6])	Συναινετική ταξινόμηση ([7]) ICCVAM	MeSH ([8]) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος ([9])
			Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} ([2]) (M)	Δράση TA ER	Τιμή IC_{50} ([2]), ([5]) (M)				
15	Ρεσβερατρόλη	501-36-0	APN.	—	APN.	—	Θ/APN.	APN.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φυσικό προϊόν

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, M = γραμμομοριακή, IC_{50} = το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, Θ/APN.= θεωρούμενη αρνητική, ΘΕΤ. = θετική, Θ/ΘΕΤ. = θεωρούμενη θετική.

([1]) Κοινές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc και οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ανταγωνιστές ER ή αρνητικές και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc (2) (3).

([2]) Η μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε όταν δεν υπήρχαν περιορισμοί λόγω κυτταροτοξικότητας ή αδιαλυτότητας ήταν 1×10^{-3} M (δοκιμασία STTA) και 1×10^{-5} M (δοκιμασία ER TA VM7Luc).

([3]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

([4]) Έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL® ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists» (3).

([5]) Οι μέσες τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

([6]) Δραστηριότητα STTA ER που συνάγεται από τις αναφερόμενες επιδράσεις τους που είναι γνωστές από τα ιστορικά δεδομένα CERI της δοκιμασίας δέσμευσης υποδοχέων ER, τη μητροτροφική δοκιμασία και πληροφορίες από τη δημόσια βιβλιογραφία (2)

([7]) Η ταξινόμηση ως ανταγωνιστή ER ή αρνητική βασίστηκε στις πληροφορίες που περιλαμβάνονται στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε πληροφορίες που ελήφθησαν από δημοσιευμένα έντυπα και εξετάστηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([8]) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([9]) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA

Βασικά στοιχεία της δοκιμασίας

11. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε δοκιμασίες που χρησιμοποιούν σταθερώς διαμολυνθέντα ή ενδογενή υποδοχέα ERα και σταθερώς διαμολυνθέν κατασκεύασμα γονιδίου αναφοράς υπό τον έλεγχο ενός ή περισσότερων στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα· ενδέχεται ωστόσο να υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς, όπως ο ERβ. Πρόκειται για βασικά στοιχεία της δοκιμασίας.

Μάρτυρες

12. Θα πρέπει να περιγράφεται η βάση των προτεινόμενων παράλληλων προτύπων αναφοράς για καθεμία από τις δοκιμασίες αγωνιστών και ανταγωνιστών. Οι παράλληλοι μάρτυρες (αρνητικός, διαλύτης και θετικός), ανάλογα με την περίπτωση, χρησιμεύουν ως ένδειξη της λειτουργικότητας της δοκιμασίας υπό τις συνθήκες δοκιμής και παρέχουν μια βάση για συγκρίσεις μεταξύ πειραμάτων· αποτελούν συνήθως μέρος των κριτηρίων αποδοχής για συγκεκριμένο πείραμα (1).

Τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου

13. Οι τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να διεκπεραιώνονται σύμφωνα με τα οριζόμενα για κάθε δοκιμασία προκειμένου να διασφαλίζεται ότι η κυτταρική σειρά παραμένει σταθερή κατόπιν πολλαπλών ανακαλλιεργειών, ελεύθερη μυκοπλάσματος (δηλ. ελεύθερη βακτηριακής μόλυνσης), και διατηρεί την ικανότητα να παρέχει τις αναμενόμενες διαμεσολαβούμενες από τους ER αποκρίσεις με την πάροδο του χρόνου. Οι κυτταρικές σειρές θα πρέπει να ελέγχονται περαιτέρω ως προς την ορθότητα της ταυτότητάς τους καθώς και για άλλους παράγοντες μόλυνσης (π.χ. μύκητες, ζυμομύκητες και ιούς).

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

14. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών με άγνωστες χημικές ουσίες με οποιαδήποτε εκ των δοκιμασιών στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την τεχνική ικανότητά του ως προς τη χρήση της δοκιμασίας. Για να αποδείξει την τεχνική ικανότητά του, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να υποβάλλει σε δοκιμή τις 14 ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 3 για τη δοκιμασία αγωνιστών και τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του πίνακα 4 για τη δοκιμασία ανταγωνιστών. Οι εν λόγω δοκιμές ελέγχου τεχνικής ικανότητας θα επιβεβαιώνουν επίσης τη δυνατότητα απόκρισης του συστήματος δοκιμών. Ο κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας είναι ένα υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων για τις δοκιμασίες ER TA (6). Οι εν λόγω ουσίες είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, αντιπροσωπεύουν τις κατηγορίες χημικών ουσιών που συνδέονται συνήθως με δράση αγωνιστή ή ανταγωνιστή ER, παρουσιάζουν το κατάλληλο φάσμα ισχύος που αναμένεται για τους αγωνιστές/ανταγωνιστές ER (δηλ. ισχυρές έως ασθενείς) και περιλαμβάνουν αρνητικές ουσίες. Οι δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να επαναλαμβάνονται τουλάχιστον δύο φορές, σε διαφορετικές ημέρες. Η τεχνική ικανότητα αποδεικνύεται μέσω της ορθής ταξινόμησης (θετική/αρνητική) κάθε ουσίας ελέγχου ικανότητας. Οι δοκιμές ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να επαναλαμβάνονται από κάθε τεχνικό κατά την εκμάθηση των δοκιμασιών. Ανάλογα με τον τύπο κυττάρων, ορισμένες από τις εν λόγω ουσίες ελέγχου τεχνικής ικανότητας μπορεί να συμπεριφέρονται ως SERM και να δρουν τόσο ως αγωνιστές όσο και ως ανταγωνιστές. Ωστόσο, οι ουσίες ελέγχου ικανότητας ταξινομούνται στους πίνακες 3 και 4 βάσει της γνωστής κύριας δράσης τους, η οποία και θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας.

15. Για να αποδείξει τις επιδόσεις του και για λόγους ποιοτικού ελέγχου, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάσεις ιστορικών δεδομένων για τους αγωνιστές και τους ανταγωνιστές με δεδομένα προτύπου αναφοράς (π.χ. 17β-οιστραδιόλη και ταμοξιφαίνη), χημικών ουσιών θετικού και αρνητικού μάρτυρα και μάρτυρα διαλύτη (π.χ. DMSO). Αρχικά, η βάση δεδομένων θα πρέπει να δημιουργείται από τουλάχιστον 10 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών αγωνιστών (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) και 10 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών ανταγωνιστών (π.χ. ταμοξιφαίνη). Η βάση δεδομένων θα πρέπει να διευρύνεται με την προσθήκη των αποτελεσμάτων μελλοντικών αναλύσεων των εν λόγω προτύπων αναφοράς και μαρτύρων διαλύτη προκειμένου το εργαστήριο να διασφαλίζει τη διαχρονική συνοχή και τις επιδόσεις της βιοδοκιμασίας.

Πίνακας 3

Κατάλογος (14) ουσιών ελέγχου ικανότητας για δοκιμασία αγωνιστών ([8])

Αριθ. ([7])	Ουσία	CASRN	Αναμενόμενη απόκριση ([1])	Δοκιμασία STTA			Δοκιμασία ER TA VM7Luc		Χημική κατηγορία MeSH ([5])	Κατηγορία προϊόντος ([6])
				Τιμή PC_{10} (M) ([2])	Τιμή PC_{50} (M) ([2])	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Τιμή VM7Luc EC_{50} (M) ([3])	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) ([4])		
14	Διαιθυλοστιλβεστρόλη	56-53-1	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
12	17α-Οιστραδιόλη	57-91-0	ΘΕΤ.	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
15	*meso*-Εξεστρόλη	84-16-2	ΘΕΤ.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
11	4-*tert*-Οκτυλοφαινόλη	140-66-9	ΘΕΤ.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
9	Γενιστεΐνη	446-72-0	ΘΕΤ.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
6	Δισφαινόλη Α	80-05-7	ΘΕΤ.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία

Αριθ. (7)	Ουσία	CASRN	Αναμενόμενη απόκριση (1)	Δοκιμασία STTA			Δοκιμασία ER TA VM7Luc		Χημική κατηγορία MeSH (5)	Κατηγορία προϊόντος (6)
				Τιμή PC_{10} (M) (2)	Τιμή PC_{50} (M) (2)	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Τιμή VM7Luc EC_{50} (M) (3)	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) (4)		
2	Καμφερόλη	520-18-3	ΘΕΤ.	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν
3	Φθαλικό βενζύλιο βουτύλιο	85-68-7	ΘΕΤ.	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Καρβοξυλικό οξύ, εστέρας, φθαλικό οξύ	Πλαστικοποιητής, βιομηχανική χημική ουσία
4	*p,p'*-Methoxychlor	72-43-5	ΘΕΤ.	$1,23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Υδρογονάνθρακας (αλογονωμένος)	Φυτοφάρμακο, κτηνιατρικός παράγοντας
1	4-Υδροξυβενζοϊκό αιθύλιο	120-47-8	ΘΕΤ.	$5,00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Καρβοξυλικό οξύ, φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, συντηρητικό
17	Ατραζίνη	1912-24-9	ΑΡΝ.	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4,64 \times 10^{-4}$	Ετεροκυκλική ένωση	Ζιζανιοκτόνο
20	Σπειρονολακτόνη	52-01-7	ΑΡΝ.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2,40 \times 10^{-3}$	Λακτόνη, στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν

Αριθ. (7)	Ουσία	CASRN	Αναμενόμενη απόκριση (1)	Δοκιμασία STTA			Δοκιμασία ER TA VM7Luc		Χημική κατηγορία MeSH (5)	Κατηγορία προϊόντος (6)
				Τιμή PC_{10} (M) (2)	Τιμή PC_{50} (M) (2)	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Τιμή VM7Luc EC_{50} (M) (3)	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) (4)		
21	Κετοκοναζόλη	65277-42-1	APN.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Ετεροκυκλική ένωση	Φαρμακευτικό προϊόν
22	Ρεσερπίνη	50-55-5	APN.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Ετεροκυκλική ένωση, ινδόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, EC_{50} = ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, ΘΕΤ. = θετική, PC_{10} (και PC_{50}) = η συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία η απόκριση είναι το 10 % (ή το 50 % για την PC_{50}) της απόκρισης που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2, 1 nm) σε κάθε τρυβλίο.

(1) Η ταξινόμηση σε θετικές ή αρνητικές ως προς τη δράση αγωνιστών ER βασίστηκε στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε εμπειρικά δεδομένα και άλλες πληροφορίες που ελήφθησαν από τις αναφερόμενες μελέτες που δημοσιεύτηκαν και μελετήθηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Οι τιμές αναφέρονται στο «Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30)»

(3) Οι μέσες τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

(4) Οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις ήταν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (δοκιμή προσδιορισμού του εύρους) κατά την επικύρωση της δοκιμασίας ER TA VM7Luc. Σε περίπτωση διαφορών μεταξύ συγκεντρώσεων, αναφέρεται η υψηλότερη συγκέντρωση. Βλ. πίνακα 4-10 της έκθεσης αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών της ICCVAM· η μέθοδος δοκιμών LUMI-Cell®ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3)».

(5) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

(7) Από τον πίνακα 1 [κατάλογος χημικών ουσιών αναφοράς (22) για την αξιολόγηση της ορθότητας αγωνιστών ER] των προτύπων επιδόσεων (6)

(8) Σε περίπτωση που μια ουσία ελέγχου ικανότητας δεν διατίθεται πλέον στο εμπόριο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ουσία με την ίδια ταξινόμηση και συγκρίσιμη ισχύ, τρόπο δράσης και χημική κατηγορία.

Πίνακας 4

Κατάλογος (10) ουσιών ελέγχου ικανότητας για δοκιμασία ανταγωνιστών

	Ουσία ([1])	CASRN	Δοκιμασία STTA ER ([2])			Δοκιμασία ER TA VM7Luc ([3])			Πιθανές επιδράσεις STTA ER ([2])	Ταξινόμηση ([6]) συναίνεσης ICCVAM	MeSH ([7]) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος ([8])
			Δράση TA ER	IC_{50} (M)	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Δράση TA ER	IC_{50} ([4]) (M)	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) ([5])				
1	4-Υδροξυταμοξιφαίνη	68047-06-3	ΘΕΤ.	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
2	Υδροχλωρική ραλοξιφαίνη	82640-04-8	ΘΕΤ.	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	ΘΕΤ.	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	μέτρια ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
3	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	ΘΕΤ.	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	ΘΕΤ.	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	ΘΕΤ.	ΘΕΤ.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν
4	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	ΑΡΝ.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	ΑΡΝ.	—	$3,67 \times 10^{-3}$	να είναι αρνητική (*)	Θ/ΑΡΝ.	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
5	Απιγενίνη	520-36-5	ΑΡΝ.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	ΑΡΝ.	—	$3,70 \times 10^{-4}$	ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Ετεροκυκλική ένωση	Χρωστική, φυσικό προϊόν, ενδιάμεση φαρμακευτική ουσία,
6	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο	84-74-2	ΑΡΝ.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	ΑΡΝ.	—	$3,59 \times 10^{-3}$	ΑΡΝ.	ΑΡΝ.	Εστέρας, φθαλικό οξύ	Συστατικό καλλυντικών, βιομηχανική χημική ουσία, πλαστικοποιητής

	Ουσία (1)	CASRN	Δοκιμασία STTA ER (2)			Δοκιμασία ER TA VM7Luc (3)			Πιθανές επιδράσεις STTA ER (2)	Ταξινόμηση (6) συναίνεσης ICCVAM	MeSH (7) Χημική κατηγορία	Κατηγορία προϊόντος (8)
			Δράση TA ER	IC_{50} (M)	Περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Δράση TA ER	IC_{50} (4) (M)	Υψηλότερη συγκέντρωση για τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους (M) (5)				
7	Φλαβόνη	525-82-6	APN.	—	10^{-8} – 10^{-3}	APN.	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	να είναι αρνητική (*)	Θ/APN.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
8	Γενιστεΐνη	446-72-0	APN.	—	10^{-9} – 10^{-4}	APN.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	να είναι αρνητική (*)	APN.	Φλαβονοειδές, ετεροκυκλική ένωση	Φυσικό προϊόν, φαρμακευτικό προϊόν
9	p-n-Εννεϋλοφαινόλη	104-40-5	APN.	—	10^{-9} – 10^{-4}	APN.	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	δεν ελέγχθηκε	APN.	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
10	Ρεσβερατρόλη	501-36-0	APN.	—	10^{-8} – 10^{-3}	APN.	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	να είναι αρνητική (*)	APN.	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φυσικό προϊόν

Συντμήσεις: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service, M = γραμμομοριακή, IC_{50} = το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, APN. = αρνητική, Θ/APN.= θεωρούμενη αρνητική, ΘΕΤ. = θετική.

(*) ταξινομημένη ως αρνητική σύμφωνα με επισκόπηση της βιβλιογραφίας (2).

(1) Κοινές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc και οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ανταγωνιστές ER ή αρνητικές και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ορθότητας στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc (2) (3).

(2) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

(3) Έκθεση αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών LUMI-CELL ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists» (3).

(4) Οι μέσες τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν με τιμές που ανέφεραν τα εργαστήρια της μελέτης επικύρωσης ER TA VM7Luc (XDS, ECVAM και Hiyoshi) (3).

(5) Οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις ήταν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (δοκιμή προσδιορισμού του εύρους) κατά την επικύρωση της δοκιμασίας ER TA VM7Luc. Σε περίπτωση διαφορών μεταξύ συγκεντρώσεων, αναφέρεται η υψηλότερη συγκέντρωση. Βλ. πίνακα 4-11 της έκθεσης αξιολόγησης μεθόδων δοκιμών της ICCVAM· η μέθοδος δοκιμών LUMI-Cell®ER (ER TA VM7Luc): «An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3)».

(6) Η ταξινόμηση ως ανταγωνιστή ER ή αρνητική βασίστηκε στις πληροφορίες που περιλαμβάνονται στα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις μεθόδους δοκιμών δέσμευσης ER και TA (31) καθώς και σε πληροφορίες που ελήφθησαν από δημοσιευμένα έντυπα και εξετάστηκαν μετά την ολοκλήρωση των εγγράφων επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM (2) (3) (18) (31).

(7) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(8) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών

16. Η αποδοχή ή η απόρριψη μιας σειράς δοκιμών βασίζεται στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για τα πρότυπα αναφοράς και τους μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα. Οι τιμές των PC_{50} (EC_{50}) ή IC_{50} για τα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής, όπως καθορίζονται για την επιλεγμένη δοκιμασία (για την STTA βλ. προσάρτημα 2, για την ER TA VM7Luc βλ. προσάρτημα 3), και όλοι οι θετικοί/αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να είναι σωστά ταξινομημένοι για κάθε αποδεκτό πείραμα. Η ικανότητα συνεπούς διεξαγωγής της δοκιμασίας θα πρέπει να αποδεικνύεται μέσω της ανάπτυξης και διατήρησης βάσης ιστορικών δεδομένων για τα πρότυπα αναφοράς και τους μάρτυρες (βλ. παράγραφο 15). Ως μέτρο της εντός του εργαστηρίου αναπαραγωγιμότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι τυπικές αποκλίσεις ή οι συντελεστές μεταβλητότητας για τους μέσους όρους των παραμέτρων προσαρμογής των καμπυλών προτύπων αναφοράς από πολλαπλά πειράματα. Επιπλέον, αναφορικά με τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να διασφαλίζεται η συμμόρφωση με τις ακόλουθες αρχές:

— Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι επαρκή για την ποσοτική αξιολόγηση της ενεργοποίησης ER (για τη δοκιμασία αγωνιστών) ή της καταστολής ER (για τη δοκιμασία ανταγωνιστών) (δηλ. δραστικότητα και ισχύς).

— Η μέση δραστηριότητα των γονιδίων αναφοράς για τη συγκέντρωση αναφοράς του οιστρογόνου αναφοράς θα πρέπει να αντιστοιχεί τουλάχιστον στην ελάχιστη δραστηριότητα που καθορίζεται στη δοκιμασία σε σχέση με αυτήν του μάρτυρα (διαλύτη) φορέα προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής ευαισθησία. Για τις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc, πρόκειται για το τετραπλάσιο της δραστηριότητας του μέσου μάρτυρα φορέα σε κάθε τρυβλίο.

— Οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται θα πρέπει να παραμένουν εντός του φάσματος διαλυτότητας των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και να μην εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα.

Ανάλυση των δεδομένων

17. Για την ταξινόμηση θετικής ή αρνητικής απόκρισης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η καθορισμένη για κάθε δοκιμασία διαδικασία ερμηνείας.

18. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής (παράγραφος 16) υποδεικνύει ότι η δοκιμασία λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη σειρά δοκιμών θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων της πρώτης σειράς δοκιμών αποτελεί την καλύτερη ένδειξη ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα. Εάν παραχθούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα από δύο σειρές δοκιμών (π.χ. και οι δύο σειρές δοκιμών υποδεικνύουν ως θετική μια υπό δοκιμή χημική ουσία), δεν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί τρίτη σειρά δοκιμών.

19. Εάν από δύο σειρές δοκιμών δεν παραχθούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα (π.χ. μια υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική σε μια σειρά δοκιμών και αρνητική στην άλλη σειρά δοκιμών), ή εάν απαιτείται υψηλότερος βαθμός βεβαιότητας όσον αφορά το αποτέλεσμα της παρούσας δοκιμασίας, θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε αυτή την περίπτωση, η ταξινόμηση βασίζεται στα δύο από τα τρία αποτελέσματα που συμφωνούν μεταξύ τους.

Γενικά κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

20. Επί του παρόντος δεν υφίσταται καθολικά αποδεκτή μέθοδος ερμηνείας των δεδομένων ER TA. Εντούτοις, η ποιοτική (π.χ. θετική/αρνητική) και/ή η ποσοτική (π.χ. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) αξιολόγηση της διαμεσολαβούμενης από τους ER δραστηριότητας θα πρέπει να βασίζεται σε εμπειρικά δεδομένα και ορθή επιστημονική κρίση. Ει δυνατόν, τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να συνοδεύονται από περιγραφή τόσο του μεγέθους της επίδρασης σε σύγκριση με τον μάρτυρα φορέα (διαλύτη) ή το οιστρογόνο αναφοράς όσο και της συγκέντρωσης στην οποία εκδηλώνεται η επίδραση (π.χ. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{max}, IC_{50} κ.λπ.).

Έκθεση δοκιμής

21. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Δοκιμασία:

— χρησιμοποιηθείσα δοκιμασία,

— μάρτυρας/πρότυπο αναφοράς/υπό δοκιμή χημική ουσία,

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης/φορέας:

— χαρακτηρισμός (φύση, προμηθευτής και παρτίδα),

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές,

Κύτταρα:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων:

  • εκφράζεται ο ER ενδογενώς; Εάν όχι, ποιος ή ποιοι υποδοχείς διαμολύνθηκαν;

  • κατασκευάσματα γονιδίων αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν (περιλαμβανομένων των ειδών προέλευσης),

  • μέθοδος διαμόλυνσης,

  • μέθοδος επιλογής για τη διατήρηση της σταθερής διαμόλυνσης (κατά περίπτωση),

  • είναι η μέθοδος διαμόλυνσης κατάλληλη για σταθερές σειρές;

— αριθμός ανακαλλιεργειών των κυττάρων (από την απόψυξη),

— αριθμός ανακαλλιεργειών των κυττάρων κατά την απόψυξη,

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών.

Συνθήκες δοκιμής:

— περιορισμοί διαλυτότητας,

— περιγραφή των μεθόδων αξιολόγησης της βιωσιμότητας που εφαρμόστηκαν,

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— όγκος του φορέα και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκε,

— θερμοκρασία και υγρασία επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την έναρξη και κατά τη διάρκεια της αγωγής,

— θετικά και αρνητικά πρότυπα αναφοράς,

— αντιδραστήρια γονιδίων αναφοράς (όνομα προϊόντος, προμηθευτής και παρτίδα),

— κριτήρια χαρακτηρισμού των σειρών δοκιμής ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων.

Έλεγχος αποδοχής:

— συντελεστές διαφοράς στην επαγωγή για κάθε τρυβλίο δοκιμασίας και κατά πόσο πληρούν τις ελάχιστες απαιτήσεις στο πλαίσιο της δοκιμασίας με βάση τους ιστορικούς μάρτυρες,

— πραγματικές τιμές για τα κριτήρια αποδοχής, π.χ. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ και τιμές κλίσης Hill, για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες/πρότυπα αναφοράς.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα και κανονικοποιημένα δεδομένα,

— το μέγιστο επίπεδο πολλαπλάσιας επαγωγής,

— δεδομένα κυτταροτοξικότητας,

— η χαμηλότερη αποτελεσματική συγκέντρωση (LEC), εάν υπάρχει,

— τιμές RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} και/ή EC_{50}, κατά περίπτωση,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— στατιστικές αναλύσεις, εάν υπάρχουν, μαζί με μια ένδειξη του βαθμού σφάλματος και του επιπέδου εμπιστοσύνης (π.χ. SEM, SD, CV ή 95 % CI) και περιγραφή του τρόπου υπολογισμού των εν λόγω τιμών.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Κριτήρια αποδοχής: Ελάχιστα πρότυπα για τις επιδόσεις των πειραματικών ελέγχων και πρότυπα αναφοράς. Για να θεωρηθεί ένα πείραμα έγκυρο, θα πρέπει να πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής.

Ορθότητα (συμφωνία): ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμασίας και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμασίας (1).

Αγωνιστής: ουσία που επάγει απόκριση, π.χ. μεταγραφή, όταν δεσμεύεται σε ειδικό υποδοχέα.

Ανταγωνιστής: τύπος προσδέματος υποδοχέα ή χημικής ουσίας που δεν επάγει βιολογική απόκριση καθαυτό/καθαυτή όταν δεσμεύεται σε υποδοχέα, αλλά εμποδίζει ή εξασθενεί αποκρίσεις διαμεσολαβούμενες από αγωνιστές.

Αντιοιστρογόνος δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση της 17β-οιστραδιόλης η οποία διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς οιστρογόνων.

Μορφολογία των κυττάρων: το σχήμα και η εμφάνιση των κυττάρων που καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα σε μία μεμονωμένη κοιλότητα τρυβλίου ιστοκαλλιέργειας. Η μορφολογία των θνήσκοντων κυττάρων είναι συχνά μη φυσιολογική.

CF: (Conceptual Framework) το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση των ενδοκρινικών διαταρακτών.

Κατεργασία με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη: κατεργασία του ορού που χρησιμοποιείται στην κυτταροκαλλιέργεια. Η κατεργασία με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη (η οποία αναφέρεται συχνά ως «απογύμνωση») απομακρύνει τις ενδογενείς ορμόνες και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τις ορμόνες.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κυτταροτοξικότητα: επιβλαβείς επιδράσεις στη δομή ή τη λειτουργία των κυττάρων που μπορούν να καταλήξουν στον θάνατο των κυττάρων και οι οποίες αποτυπώνονται στη μείωση του αριθμού των κυττάρων που είναι παρόντα στην κοιλότητα στο τέλος της περιόδου έκθεσης, ή στη μείωση της ικανότητας κάποιου μέτρου της κυτταρικής λειτουργίας σε σύγκριση με τον παράλληλο μάρτυρα με φορέα.

CV: συντελεστής μεταβλητότητας

DCC-FBS: βόειος εμβρυϊκός ορός που έχει υποστεί κατεργασία με ενεργό άνθρακα επιχρισμένο με δεξτράνη.

DMEM: τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

E2: 17β-οιστραδιόλη

EC50: ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

ED: ενδοκρινική διαταραχή

hERα: ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α

hERβ: ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων β

EFM: μέσο ελεύθερο οιστρογόνων. Τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco (DMEM), συμπληρωμένο με 4,5 % κατεργασμένου με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη FBS, 1,9 % L-γλουταμίνη και 0,9 % Pen-Strep.

ER: υποδοχέας οιστρογόνων

ERE: στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα

Οιστρογονική δραστηριότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να μιμείται την ικανότητα της 17β-οιστραδιόλης να δεσμεύεται στους υποδοχείς οιστρογόνων και να τους ενεργοποιεί. Η μεσολαβούμενη από τον hERα οιστρογονική δράση μπορεί να ανιχνευτεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ERTA: διενεργοποίηση υποδοχέα οιστρογόνων

FBS: βόειος εμβρυϊκός ορός

HeLa: αθάνατη ανθρώπινη τραχηλική κυτταρική σειρά

HeLa9903: υποκλώνος των κυττάρων HeLa ο οποίος έχει διαμολυνθεί σταθερώς με hERα και γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης

IC_{50}: ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης μιας ανασταλτικής χημικής ουσίας

ICCVAM: (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ΗΠΑ)

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια, που χρησιμοποιούν το ίδιο πρωτόκολλο και ελέγχουν τις ίδιες ουσίες, μπορούν να παράγουν ανάλογα αποτελέσματα από ποιοτική και ποσοτική άποψη. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (1).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός εργαστηρίου» (1).

LEC: (lowest effective concentration) η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επάγει απόκριση (δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η πολλαπλάσια επαγωγή είναι στατιστικά διαφορετική από τον παράλληλο μάρτυρα με φορέα).

Δοκιμή παρόμοιου τύπου («me-too»): έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε δοκιμασία η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών».

MT: μεταλλοθειονίνη

MMTV: ιός καρκίνου του μαστού του ποντικού

OHT: 4-υδροξυταμοξιφαίνη

PBTG: κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών με βάση τις επιδόσεις

PC (θετικός μάρτυρας): ισχυρά δραστική ουσία, κατά προτίμηση 17β-οιστραδιόλη, που περιλαμβάνεται σε όλες τις δοκιμές με σκοπό τη διασφάλιση της ορθής λειτουργίας της δοκιμασίας.

PC_{10}: η συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η μετρούμενη δραστηριότητα σε δοκιμασία αγωνιστών αντιστοιχεί στο 10 % της μέγιστης δραστηριότητας που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2 σε 1 nM για τη δοκιμασία STTA) σε κάθε τρυβλίο.

PC_{50}: η συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η μετρούμενη δραστηριότητα σε δοκιμασία αγωνιστών αντιστοιχεί στο 50 % της μέγιστης δραστηριότητας που επάγεται από τον θετικό μάρτυρα (E2 σε 1 nM για τη δοκιμασία STTA) σε κάθε τρυβλίο.

PC_{Max}: η συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επάγει την RPCMax

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη δοκιμασία και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης δοκιμασίας η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Στα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνονται 1) τα βασικά στοιχεία της δοκιμασίας, 2) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και 3) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη δοκιμασία όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (1).

Ουσίες ελέγχου ικανότητας: υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται από τα εργαστήρια για να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα στη διεξαγωγή τυποποιημένης μεθόδου δοκιμών. Τα κριτήρια επιλογής για τις εν λόγω ουσίες είναι συνήθως τα εξής: αντιπροσωπεύουν όλο το φάσμα αποκρίσεων, διατίθενται στο εμπόριο και συνοδεύονται από διαθέσιμα δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας.

Τεχνική ικανότητα: η αποδεδειγμένη ικανότητα ορθής διεξαγωγής δοκιμασίας, πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών με άγνωστες ουσίες.

Οιστρογόνο αναφοράς (θετικός μάρτυρας, PC): 17β-οιστραδιόλη (E2, CAS 50-28-2).

Πρότυπο αναφοράς: ουσία αναφοράς που χρησιμοποιείται για την κατάδειξη της επάρκειας μιας δοκιμασίας. Η 17β-οιστραδιόλη είναι το πρότυπο αναφοράς για τις δοκιμασίες ER TA STTA και VM7Luc.

Μέθοδοι δοκιμών αναφοράς: Οι δοκιμές στις οποίες βασίζεται η PBTG 455.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης μιας δοκιμασίας με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον είναι κατάλληλη και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμασία μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) μιας δοκιμασίας (1).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμασία μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

RLU: (Relative Light Units) σχετικές μονάδες φωτός

RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ

RPC_{Max}: το μέγιστο επίπεδο απόκρισης που επάγεται από υπό δοκιμή χημική ουσία, εκφραζόμενο ως ποσοστό της απόκρισης που επάγεται από 1 nM E2 στο ίδιο τρυβλίο

RPMI: θρεπτικό μέσο RPMI 1 640 που συμπληρώνεται με 0,9 % Pen-Strep και 8,0 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS)

Σειρά δοκιμών: μεμονωμένο πείραμα βάσει του οποίου εκτιμάται η χημική δράση στο βιολογικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας. Κάθε σειρά δοκιμών αποτελεί ένα πλήρες πείραμα που διεξάγεται σε πανομοιότυπες κοιλότητες ταυτόχρονα επιστρωμένων κυττάρων που προέρχονται από κοινό απόθεμα κυττάρων.

Ανεξάρτητη σειρά δοκιμών: χωριστό, ανεξάρτητο πείραμα διά του οποίου εκτιμάται η χημική δράση στο βιολογικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας, με χρήση κυττάρων από διαφορετικό απόθεμα και πρόσφατα αραιωμένων χημικών ουσιών, και το οποίο διεξάγεται σε διαφορετικές ημέρες ή την ίδια ημέρα από άλλο προσωπικό.

SD: τυπική απόκλιση

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμασία. Αποτελεί μέτρο ορθότητας μιας δοκιμασίας με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμασίας (1).

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας μιας δοκιμασίας με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμασίας (1).

Σταθερή διαμόλυνση: η διαμόλυνση καλλιεργημένων κυττάρων με DNA κατά τρόπον ώστε να επιτυγχάνεται η σταθερή ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη σταθερή έκφραση των διαμολυνθέντων γονιδίων. Οι κλώνοι σταθερώς διαμολυθέντων κυττάρων επιλέγονται με σταθερούς δείκτες (π.χ. αντοχή στο G418).

Δοκιμασία STTA: δοκιμασία διενεργοποίησης σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων, η δοκιμασία μεταγραφικής ενεργοποίησης ERα με χρήση της κυτταρικής σειράς HeLa 9 903.

Μελέτη: Το πλήρες φάσμα πειραματικών εργασιών που εκτελείται για την αξιολόγηση μιας μεμονωμένης, συγκεκριμένης ουσίας με χρήση συγκεκριμένης δοκιμασίας. Μια μελέτη περιλαμβάνει όλα τα στάδια, δηλ. δοκιμές αραίωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, προκαταρκτικές σειρές δοκιμών προσδιορισμού εύρους τιμών, όλες τις απαραίτητες ολοκληρωμένες σειρές δοκιμών, αναλύσεις δεδομένων, διασφάλιση ποιότητας, αξιολογήσεις κυτταροτοξικότητας, κ.λπ. Η ολοκλήρωση μιας μελέτης επιτρέπει την ταξινόμηση της δραστηριότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας επί του στόχου της τοξικότητας (δραστική, αδρανής ή αβέβαιη), η οποία εκτιμάται από τη χρησιμοποιούμενη δοκιμασία, καθώς και μια εκτίμηση της ισχύος σε σχέση με τη θετική χημική ουσία αναφοράς.

Ουσία: σύμφωνα με τον κανονισμό REACH ([1]), μια ουσία ορίζεται ως ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται από οποιαδήποτε διεργασία παρασκευής, συμπεριλαμβανομένου κάθε προσθέτου που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της σταθερότητάς της και κάθε πρόσμειξης που προέρχεται από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αποκλειόμενου κάθε διαλύτη που μπορεί να διαχωρισθεί, χωρίς να επηρεάσει τη σταθερότητα της ουσίας ή να μεταβάλει τη σύνθεσή της. Ένας παρόμοιος ορισμός χρησιμοποιείται και στο GHS του ΟΗΕ (1).

ΤΑ (διενεργοποίηση): η έναρξη της σύνθεσης mRNA ως απόκριση σε ειδικό χημικό σήμα, όπως η δέσμευση οιστρογόνου στον υποδοχέα οιστρογόνων

Δοκιμασία: στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, μια δοκιμασία είναι μία από τις μεθοδολογίες που θεωρείται ότι πληρούν τα περιγραφόμενα κριτήρια επιδόσεων. Μεταξύ των στοιχείων της δοκιμασίας περιλαμβάνεται, για παράδειγμα, η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά με τις σχετικές συνθήκες ανάπτυξης, το συγκεκριμένο μέσο στο οποίο διεξάγεται η δοκιμή, οι συνθήκες προετοιμασίας των τρυβλίων, η διάταξη και οι αραιώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών μαζί με τυχόν άλλα μέτρα ελέγχου της ποιότητας και σχετικά στάδια αξιολόγησης δεδομένων.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μεταγραφή: σύνθεση mRNA

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων και βιολογικά υλικά:

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: δοκιμασία για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιορίστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (1).

Επικύρωση: η διαδικασία διά της οποίας διακριβώνεται η αξιοπιστία και η καταλληλότητα μιας συγκεκριμένης προσέγγισης, μεθόδου, δοκιμασίας, διεργασίας ή αξιολόγησης για καθορισμένο σκοπό (1).

VC (μάρτυρας με φορέα): ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών μαρτύρων υποβάλλεται σε δοκιμή αποκλειστικά ως φορέας, χωρίς διαλυμένη χημική ουσία.

VM7: αθανατοποιημένο κύτταρο αδενοκαρκινώματος που εκφράζει ενδογενώς τον υποδοχέα οιστρογόνων.

VM7Luc4E2: η κυτταρική σειρά VM7Luc4E2 προήλθε από αθανατοποιημένα ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος VM7 που εκφράζουν ενδογενώς και τις δύο μορφές του υποδοχέα οιστρογόνων (ERα και ERβ) και τα οποία έχουν διαμολυνθεί σταθερώς με το πλασμίδιο pGudLuc7.ERE. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει τέσσερα αντίγραφα ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που περιλαμβάνει το στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα ανάντη του υποκινητή του ιού καρκίνου του μαστού του ποντικού (MMTV) και το γονίδιο λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας.

Ασθενής θετικός μάρτυρας: ασθενώς δραστική ουσία που επιλέγεται από τον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνεται σε όλες τις δοκιμές με σκοπό τη διασφάλιση της ορθής λειτουργίας της δοκιμασίας.

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ (ΕΕ L 304 της 22.11.2007, σ. 1).

Προσάρτημα 2

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Α ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΩΣ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ HERA-HELA-9903

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Στην παρούσα δοκιμασία διενεργοποίησης (ΤΑ) χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903 για την ανίχνευση της δράσης αγωνιστών οιστρογόνων που μεσολαβείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα οιστρογόνων α (hERα). Στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας διενεργοποίησης σταθερά διαμολυνθέντων κυττάρων (STTA) που διενήργησε το ιαπωνικό Ινστιτούτο Αξιολόγησης και Έρευνας Χημικών Ουσιών (CERI) με χρήση της κυτταρικής σειράς hERα-HeLa-9903 για την ανίχνευση της δράσης αγωνιστών και ανταγωνιστών οιστρογόνων που μεσολαβείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα οιστρογόνων α (hERα), κατεδείχθη η καταλληλότητα και η αξιοπιστία της δοκιμασίας για τον προβλεπόμενο σκοπό (1).

2. Η παρούσα δοκιμασία έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση της μεσολαβούμενης από τον hERα ΤΑ μέσω μέτρησης της χημειοφωταύγειας ως παραμέτρου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί σήματα φωταύγειας που δεν μεσολαβούνται από υποδοχείς σε συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων υψηλότερες του 1 μM, λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης (2) (3). Παρότι η καμπύλη δόσης-απόκρισης υποδεικνύει ότι η πραγματική ενεργοποίηση του συστήματος ER λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η έκφραση της λουσιφεράσης που επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ανάλογων ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι επάγουν ανάλογη με τα φυτοοιστρογόνα υπερενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά σε συστήματα δοκιμασίας ER ΤΑ σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (προσάρτημα 1).

3. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ» και «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 2.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛΕΠΕ ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

4. Η δοκιμασία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της σύνδεσης του υποδοχέα οιστρογόνων με πρόσδεμα. Μετά τη δέσμευση του προσδέματος, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δεσμεύει ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί ένα γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής έκφρασης του ενζύμου λουσιφεράση. Η λουσιφερίνη είναι υπόστρωμα που μετασχηματίζεται από το ένζυμο λουσιφεράση σε βιοφωταυγές προϊόν που μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με λουμινόμετρο. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης μπορεί να αξιολογηθεί γρήγορα και με χαμηλό κόστος με χρήση διαφόρων κιτ δοκιμής του εμπορίου.

5. Το σύστημα δοκιμής χρησιμοποιεί την κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903, η οποία προέρχεται από όγκο ανθρώπινου τραχήλου, με δύο σταθερώς εντεθειμένα κατασκευάσματα: i) το κατασκεύασμα έκφρασης του hERα (που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο υποδοχέα πλήρους μήκους), και ii) ένα κατασκεύασμα γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας που φέρει πέντε διαδοχικές επαναλήψεις στοιχείου απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE) λεκιθογενίνης που υποκινείται από ένα στοιχείο TATA υποκινητή μεταλλοθειονίνης ποντικού (MT). Το κατασκεύασμα TATA MT ποντικού έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει τις βέλτιστες επιδόσεις και, ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ευρέως. Κατά συνέπεια, η εν λόγω κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903 μπορεί να μετρά την ικανότητα μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει τη μεσολαβούμενη από τον hERα διενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου λουσιφεράσης.

6. Στην περίπτωση της δοκιμασίας αγωνιστών ER, η ερμηνεία των δεδομένων βασίζεται στο κατά πόσον το μέγιστο επίπεδο απόκρισης που επάγεται από υπό δοκιμή χημική ουσία ισοδυναμεί ή υπερβαίνει απόκριση αγωνιστών ίση με το 10 % της απόκρισης που επάγεται από συγκέντρωση που επάγει τη μέγιστη απόκριση (1 nM) του θετικού μάρτυρα (PC) 17β-οιστραδιόλη (E2) (δηλ. την PC10). Στην περίπτωση δοκιμασίας ανταγωνιστών ER, η ερμηνεία των δεδομένων βασίζεται στο κατά πόσον η απόκριση εμφανίζει κατά 30 % τουλάχιστον μείωση δραστηριότητας σε σχέση με την απόκριση που επάγεται από τον εμβολιασμένο μάρτυρα (25 pM E2) χωρίς κυτταροτοξικότητα. Η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων εξετάζονται αναλυτικά στις παραγράφους 34 - 48.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυτταρικές σειρές

7. Για τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η σταθερώς διαμολυνθείσα κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903. Η κυτταρική σειρά μπορεί να ληφθεί από την τράπεζα κυττάρων της Ιαπωνικής Συλλογής Ερευνητικών Βιολογικών Πόρων (JCRB) ([1]), μετά από την υπογραφή συμφωνίας μεταφοράς υλικού.

8. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κύτταρα που έχει διαπιστωθεί ότι είναι ελεύθερα μυκοπλάσματος. Η RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) είναι η προτιμώμενη μέθοδος ευαίσθητης ανίχνευσης μόλυνσης από μυκόπλασμα (4) (5) (6).

Σταθερότητα της κυτταρικής σειράς

9. Για την παρακολούθηση της σταθερότητας της κυτταρικής σειράς, ως πρότυπα αναφοράς για τη δοκιμασία αγωνιστών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι Ε2, 17α-οιστραδιόλη, 17α-μεθυλοτεστοστερόνη και κορτικοστερόνη, και θα πρέπει να μετράται μια πλήρης καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης στην περιοχή συγκεντρώσεων δοκιμής που παρατίθεται στον πίνακα 1 τουλάχιστον μία φορά σε κάθε διεξαγωγή της δοκιμασίας, ενώ τα αποτελέσματα θα πρέπει να συμφωνούν με τα αποτελέσματα που παρέχονται στον πίνακα 1.

10. Στην περίπτωση δοκιμασίας ανταγωνιστών, θα πρέπει να μετρώνται ταυτόχρονα με κάθε σειρά δοκιμών πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για δύο πρότυπα αναφοράς, την ταμοξιφαίνη και τη φλουταμίδη. Θα πρέπει να παρακολουθείται η ορθότητα της ταξινόμησης των δύο χημικών ουσιών ως θετικών ή αρνητικών.

Συνθήκες καλλιέργειας και επίστρωσης κυττάρων

11. Τα κύτταρα θα πρέπει να διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (EMEM) χωρίς ερυθρό της φαινόλης, συμπληρούμενο με 60 mg/l του αντιβιοτικού καναμυκίνη και 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού κατεργασμένου με επιχρισμένο με δεξτράνη ενεργό άνθρακα (DCC-FBS), σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2) στους 37±1 °C. Μετά την επίτευξη συρροής 75–90 %, τα κύτταρα μπορούν να ανακαλλιεργηθούν σε 10 ml 0,4 x 10^5 – 1 x 10^5 κυττάρων/ml για τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας των 100 mm. Τα κύτταρα θα πρέπει να εναιωρούνται με 10 % FBS-EMEM (που είναι το ίδιο με το EMEM με DCC-FBS) και, κατόπιν, να επιστρώνονται σε κοιλότητες τρυβλίου μικροτιτλοδότησης σε πυκνότητα 1 x 10^4 κυττάρων/(100 μl x κοιλότητα). Στη συνέχεια, τα κύτταρα θα πρέπει να προεπωάζονται σε επωαστήρα 5 % CO_2 στους 37 °±1 °C επί 3 ώρες, πριν από την έκθεση στη χημική ουσία. Ο πλαστικός εξοπλισμός θα πρέπει να είναι ελεύθερος οιστρογονικής δραστηριότητας.

12. Για τη διατήρηση της ακεραιότητας της απόκρισης, τα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από μία ανακαλλιέργειες από το κατεψυγμένο απόθεμα στα εγκλιματισμένα θρεπτικά μέσα, ενώ δεν θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από 40 ανακαλλιέργειες. Για την κυτταρική σειρά hERα-HeLa-9903, αυτό δεν υπερβαίνει τους τρεις μήνες. Ωστόσο, η καλλιέργεια των κυττάρων υπό ακατάλληλες συνθήκες ενδέχεται να έχει ως συνέπεια τη μείωση των επιδόσεών τους.

13. Το DCC-FBS μπορεί να παρασκευάζεται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στο προσάρτημα 2.2, ή να λαμβάνεται από το εμπόριο.

Κριτήρια αποδοχής

Θετικά και αρνητικά πρότυπα αναφοράς για τη δοκιμασία αγωνιστών ER

14. Πριν και κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να επαληθεύεται η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής με χρήση των κατάλληλων συγκεντρώσεων ενός ισχυρού οιστρογόνου (της Ε2), ενός ασθενούς οιστρογόνου (17α-οιστραδιόλη), ενός ιδιαίτερα ασθενούς αγωνιστή (17α-μεθυλοτεστοστερόνη) και μιας αρνητικής ουσίας (κορτικοστερόνη). Στον πίνακα 1 φαίνονται οι αποδεκτές τιμές εύρους που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (1). Τα εν λόγω 4 παράλληλα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα και τα αποτελέσματα θα πρέπει να εμπίπτουν εντός των καθορισμένων αποδεκτών ορίων. Σε διαφορετική περίπτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αιτία μη συμμόρφωσης με τα κριτήρια αποδοχής (π.χ. χειρισμοί των κυττάρων, και ορός και αντιβιοτικά για την ποιότητα και συγκέντρωση) και να επαναλαμβάνεται η δοκιμασία. Εφόσον επιτευχθεί η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής, είναι απολύτως απαραίτητη

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Ιαπωνία. Αρ. φαξ: +81-72-641-9812

συνεπής χρήση των υλικών για τις καλλιέργειες των κυττάρων, προκειμένου να διασφαλίζεται ο περιορισμός στο ελάχιστο της μεταβλητότητας των τιμών EC_{50}, PC_{50} και PC_{10}. Τα τέσσερα παράλληλα πρότυπα αναφοράς, που πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα (το οποίο διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες, περιλαμβανομένων των υλικών, του επιπέδου ανακαλλιέργειας των κυττάρων και του τεχνικού προσωπικού), μπορούν να διασφαλίζουν την ευαισθησία της δοκιμασίας, δεδομένου ότι οι τιμές PC_{10} των τριών θετικών προτύπων αναφοράς θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός του αποδεκτού εύρους, όπως και οι τιμές PC_{50} και EC_{50}, εφόσον μπορούν να υπολογιστούν (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 1

Αποδεκτές τιμές εύρους των τεσσάρων προτύπων αναφοράς για τη δοκιμασία αγωνιστών ER

Ονομασία	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Κλίση Hill	Εύρος δοκιμής
17β-οιστραδιόλη (E2) Αριθ. CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-οιστραδιόλη Αριθ. 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
Κορτικοστερόνη Αριθ. CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-μεθυλοτεστοστερόνη Αριθ. CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Θετικά και αρνητικά πρότυπα αναφοράς για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

15. Πριν και κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να επαληθεύεται η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής με χρήση των κατάλληλων συγκεντρώσεων θετικής ουσίας (ταμοξιφαίνη) και αρνητικής ουσίας (φλουταμίδη). Στον πίνακα 2 φαίνονται οι αποδεκτές τιμές εύρους που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (1). Τα εν λόγω δύο παράλληλα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα και τα αποτελέσματα θα πρέπει να κρίνονται ορθά, όπως ορίζεται στα κριτήρια. Σε διαφορετική περίπτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται η αιτία μη συμμόρφωσης με τα κριτήρια αποδοχής (π.χ. χειρισμοί των κυττάρων, και ορός και αντιβιοτικά για την ποιότητα και συγκέντρωση) και να επαναλαμβάνεται η δοκιμασία. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζονται οι τιμές IC_{50} για θετική ουσία (ταμοξιφαίνη) και τα αποτελέσματα θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των καθορισμένων αποδεκτών ορίων. Εφόσον επιτευχθεί η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής, είναι απολύτως απαραίτητη η συνεπής χρήση των υλικών για τις καλλιέργειες των κυττάρων, προκειμένου να διασφαλίζεται ο περιορισμός στο ελάχιστο της μεταβλητότητας των τιμών IC50. Τα δύο παράλληλα πρότυπα αναφοράς, που πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα (το οποίο διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες, περιλαμβανομένων των υλικών, του επιπέδου ανακαλλιέργειας των κυττάρων και του τεχνικού προσωπικού), μπορούν να διασφαλίζουν την ευαισθησία της δοκιμασίας (βλ. πίνακα 2).

Πίνακας 2

Κριτήρια και αποδεκτές τιμές εύρους των δύο προτύπων αναφοράς για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

Ονομασία	Κριτήρια	$LogIC_{50}$	Εύρος δοκιμής
Ταμοξιφαίνη Αριθ. CAS: 10540-29-1	Θετική: Θα πρέπει να υπολογιστεί το IC50	-5,942~-7,596	10^{-10}~10^{-5}M
Φλουταμίδη Αριθ. CAS: 13311-84-7	Αρνητική: Δεν θα πρέπει να υπολογιστεί το IC30	—	10^{-10}~10^{-5}M

Θετικοί μάρτυρες και μάρτυρες με φορέα

16. Ο θετικός μάρτυρας (PC) για τη δοκιμασία αγωνιστών ER (1 nM E2) και για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER (10 μM TAM) θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον τρεις φορές σε κάθε τρυβλίο. Ο φορέας που χρησιμοποιείται για τη διάλυση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ελέγχεται ως μάρτυρας με φορέα τουλάχιστον τρεις φορές σε κάθε τρυβλίο. Πέραν του εν λόγω μάρτυρα με φορέα, εάν ο θετικός μάρτυρας χρησιμοποιεί διαφορετικό φορέα από ό,τι η υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να ελέγχεται και άλλος μάρτυρας με φορέα τουλάχιστον τρεις φορές στο ίδιο τρυβλίο με τον θετικό μάρτυρα.

Κριτήρια ποιότητας για τη δοκιμασία αγωνιστών ER

17. Η μέση δραστηριότητα της λουσιφεράσης του θετικού μάρτυρα (1 nM E2) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τετραπλάσια σε σχέση με τη μέση τιμή του μάρτυρα με φορέα σε κάθε τρυβλίο. Το κριτήριο αυτό διαμορφώνεται βάσει της αξιοπιστίας των τιμών παραμέτρου που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (ιστορικά, η δραστικότητα αυτή είναι πολλαπλάσια κατά τέσσερις έως τριάντα φορές).

18. Όσον αφορά τον ποιοτικό έλεγχο της δοκιμασίας, η πολλαπλάσια επαγωγή που αντιστοιχεί στην τιμή του PC10 του παράλληλου θετικού μάρτυρα (1 nM E2) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1+2SD της τιμής πολλαπλάσιας επαγωγής (=1) του παράλληλου μάρτυρα με φορέα. Για λόγους ιεράρχησης προτεραιοτήτων, η τιμή του θετικού μάρτυρα PC10 μπορεί να είναι χρήσιμη για την απλούστευση της απαιτούμενης ανάλυσης δεδομένων σε σύγκριση με τη στατιστική ανάλυση. Παρότι η στατιστική ανάλυση παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σημαντικότητα, δεν αποτελεί ποσοτική παράμετρο όσον αφορά το δυναμικό με βάση τη συγκέντρωση και, ως εκ τούτου, είναι λιγότερο χρήσιμη για τους σκοπούς της ιεράρχησης προτεραιοτήτων.

Κριτήρια ποιότητας για τη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

19. Η μέση δραστηριότητα της λουσιφεράσης του εμβολιασμένου μάρτυρα (25 pM E2) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τετραπλάσια σε σχέση με τη μέση τιμή του μάρτυρα με φορέα σε κάθε τρυβλίο. Το κριτήριο αυτό διαμορφώνεται βάσει της αξιοπιστίας των τιμών παραμέτρου που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης.

20. Όσον αφορά τον ποιοτικό έλεγχο της δοκιμασίας, η σχετική μεταγραφική ενεργοποίηση (RTA) της E2 1 nM θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 100 %, ενώ η RTA 1 μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης (OHT) θα πρέπει να είναι μικρότερη από 40,6 % και η RTA 100 μM διγιτονίνης (Dig) θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0 %.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (βλ. παράγραφο 14 και πίνακες 3 και 4 στην ενότητα «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA» της παρούσας μεθόδου δοκιμών)

Φορέας

21. Ως παράλληλος μάρτυρας με φορέα θα πρέπει να χρησιμοποιείται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), ή κατάλληλος διαλύτης, στην ίδια συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τους διάφορους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε διαλύτη που διαλύει τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία και που αναμειγνύεται με το θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Κατάλληλοι φορείς είναι το νερό, η αιθανόλη (καθαρότητας 95 % έως 100 %) και το DMSO. Εάν χρησιμοποιηθεί το DMSO, το επίπεδο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % κ.ό. Για οποιονδήποτε φορέα, θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι ο μέγιστος όγκος που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν επηρεάζει τις επιδόσεις της δοκιμασίας.

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

22. Γενικά, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε DMSO ή άλλο κατάλληλο διαλύτη και να αραιώνονται διαδοχικά με τον ίδιο διαλύτη σε κοινή αναλογία 1:10 προκειμένου να παρασκευάζονται τα διαλύματα για αραίωση με το θρεπτικό μέσο.

Διαλυτότητα και κυτταροτοξικότητα: ζητήματα σχετικά με τον προσδιορισμό εύρους

23. Θα πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή για να προσδιορίζεται το κατάλληλο εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και να διαπιστώνονται τυχόν προβλήματα διαλυτότητας και κυτταροτοξικότητας. Αρχικά, οι χημικές ουσίες ελέγχονται έως τη μέγιστη συγκέντρωση του 1 μl/ml, 1 mg/ml, ή 1 mM, όποιο από τα τρία είναι χαμηλότερο. Με βάση τον βαθμό κυτταροτοξικότητας ή αδιαλυτότητας που παρατηρείται κατά την προκαταρκτική δοκιμή, κατά την πρώτη οριστική σειρά δοκιμών η χημική ουσία θα πρέπει να ελέγχεται σε λογαριθμικές διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM, 100 μM, 10 μM, κ.λπ.) και να καταγράφεται η παρουσία θολερότητας ή ο σχηματισμός ιζήματος ή η κυτταροτοξικότητα. Οι συγκεντρώσεις στη δεύτερη και, εάν είναι απαραίτητο, στην τρίτη σειρά δοκιμών θα πρέπει να προσαρμόζονται αναλόγως προκειμένου να χαρακτηρίζεται καλύτερα η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης και να αποφεύγονται συγκεντρώσεις που διαπιστώνεται ότι είναι μη διαλυτές ή επάγουν υπερβάλλουσα κυτταροτοξικότητα.

24. Όσον αφορά τους αγωνιστές και ανταγωνιστές ER, η παρουσία αυξανόμενων επιπέδων κυτταροτοξικότητας μπορεί να αλλοιώσει σε σημαντικό βαθμό ή να εξαλείψει την τυπική σιγμοειδή απόκριση και θα πρέπει να συνεκτιμάται κατά την ερμηνεία των δεδομένων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι δοκιμών κυτταροτοξικότητας που μπορούν να παράσχουν πληροφορίες σχετικά με το 80 % της κυτταρικής βιωσιμότητας, με χρήση κατάλληλης δοκιμασίας βάσει της εμπειρίας του εργαστηρίου.

25. Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα της δοκιμής κυτταροτοξικότητας δείχνουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πλήθους των κυττάρων κατά 20 % ή περισσότερο, η εν λόγω συγκέντρωση θα πρέπει να θεωρείται κυτταρροτοξική, και οι συγκεντρώσεις που είναι ισοδύναμες ή υπερβαίνουν την κυτταροτοξική συγκέντρωση θα πρέπει να αποκλείονται από την αξιολόγηση.

Έκθεση σε χημικές ουσίες και οργάνωση τρυβλίων της δοκιμασίας

26. Η διαδικασία για τις αραιώσεις των χημικών ουσιών (στάδια 1 και 2) και την έκθεση των κυττάρων (στάδιο 3) μπορεί να διενεργηθεί ως εξής:

Στάδιο 1: Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να αραιώνεται διαδοχικά σε DMSO, ή κατάλληλο διαλύτη, και να προστίθεται στις κοιλότητες τρυβλίου μικροτιτλοδότησης έτσι ώστε να προκύπτουν οι τελικές διαδοχικές συγκεντρώσεις που έχουν καθοριστεί βάσει της προκαταρκτικής δοκιμής προσδιορισμού εύρους (κατά κανόνα, μια σειρά π.χ. 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM και 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) για δοκιμές εις τριπλούν.

Στάδιο 2: Αραίωση χημικής ουσίας: Αραιώνονται πρώτα 1,5 μl της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε διαλύτη μέχρις όγκου 500 μl θρεπτικού μέσου.

Στάδιο 3: Έκθεση των κυττάρων στη χημική ουσία: Προστίθενται 50 μl αραίωσης με θρεπτικό μέσο (που παρασκευάστηκε κατά το στάδιο 2) σε κοιλότητα της δοκιμασίας που περιέχει 10^4 κύτταρα/100 μl/κοιλότητα.

Ο συνιστώμενος τελικός όγκος μέσου που πρέπει να υπάρχει σε κάθε κοιλότητα είναι 150 μl. Τα δείγματα και τα πρότυπα αναφοράς της δοκιμής μπορούν να κατανεμηθούν όπως φαίνεται στους πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 3

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των προτύπων αναφοράς στο τρυβλίο δοκιμασίας αγωνιστών ER

Σειρά	17α-Μεθυλοτεστοστερόνη			Κορτικοστερόνη			17α-Οιστραδιόλη			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	συγκ. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	συγκ. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
Γ	συγκ. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
Δ	συγκ. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	συγκ. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
ΣΤ	συγκ. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
Z	συγκ. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Μάρτυρας με φορέα (0,1 % DMSO), PC: Θετικός μάρτυρας (1 nM E2)

27. Τα πρότυπα αναφοράς (Ε2, 17α-οιστραδιόλη, 17α-μεθυλοτεστοστερόνη και κορτικοστερόνη) θα πρέπει να ελέγχονται σε κάθε σειρά δοκιμών (πίνακας 3). Σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται μόνο οι κοιλότητες θετικού μάρτυρα με 1 nM Ε2 που μπορούν να προκαλέσουν μέγιστη επαγωγή Ε2 και οι κοιλότητες μάρτυρα με φορέα που έχουν υποστεί κατεργασία με DMSO (ή κατάλληλο διαλύτη) (πίνακας 4). Σε περίπτωση που στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιούνται κύτταρα διαφορετικής προέλευσης (π.χ. διαφορετικού αριθμού ανακαλλιέργειας, διαφορετικής παρτίδας κ.λπ.), τα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να ελέγχονται για τα κύτταρα όλων των προελεύσεων.

Πίνακας 4

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών μαρτύρων τρυβλίου στο τρυβλίο δοκιμασίας αγωνιστών ER

Σειρά	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3			Υπό δοκιμή χημική ουσία 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	συγκ. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	συγκ. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
Γ	συγκ. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
Δ	συγκ. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	συγκ. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
ΣΤ	συγκ. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
Z	συγκ. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Μάρτυρας με φορέα (0,1 % DMSO), PC: Θετικός μάρτυρας (1 nM E2)

Πίνακας 5

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των προτύπων αναφοράς στο τρυβλίο δοκιμασίας ανταγωνιστών ER

Σειρά	**Ταμοξιφαίνη**			**Φλουταμίδη**			**Υπό δοκιμή χημική ουσία 1**			**Υπό δοκιμή χημική ουσία 2**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	**συγκ. 1 (10 μM)**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→
B	**συγκ. 2 (1 μM)**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→
Γ	**συγκ. 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
Δ	**συγκ. 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**συγκ. 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
ΣΤ	**συγκ. 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
Z	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 μM OHT**	→	→	**100 μM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: μάρτυρας με φορέα (0,1% DMSO), PC: θετικός μάρτυρας (1 nM E2), OHT: 4-υδροξυταμοξιφαίνη, Dig: διγιτονίνη.

= εμβολιασμένη με 25 pM E2

28. Για την αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δραστηριότητας των χημικών ουσιών, οι κοιλότητες δοκιμασίας στις σειρές A έως Z θα πρέπει να εμβολιάζονται με 25 pM E2. Τα πρότυπα αναφοράς (ταμοξιφαίνη και φλουταμίδη) θα πρέπει να ελέγχονται σε κάθε σειρά δοκιμών. Σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται οι κοιλότητες θετικού μάρτυρα που υποβάλλονται σε κατεργασία με 1 nM E2 και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου της κυτταρικής σειράς hERα-HeLa-9903, οι κοιλότητες μάρτυρα με φορέα που υποβάλλονται σε κατεργασία με DMSO (ή κατάλληλο διαλύτη), οι κοιλότητες 0,1 % DMSO που υποβάλλονται σε κατεργασία με προσθήκη DMSO στην εμβολιασθείσα E2 και που αντιστοιχούν στον εμβολιασμένο μάρτυρα, οι κοιλότητες που υποβάλλονται σε κατεργασία με τελική συγκέντρωση 1 μM OHT και οι κοιλότητες που υποβάλλονται σε κατεργασία με 100 μM Dig (πίνακας 5). Το επακόλουθο τρυβλίο δοκιμασίας θα πρέπει να έχει την ίδια διάταξη τρυβλίου χωρίς τις κοιλότητες προτύπων αναφοράς (πίνακας 6). Σε περίπτωση που στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιούνται κύτταρα διαφορετικής προέλευσης (π.χ. διαφορετικού αριθμού ανακαλλιέργειας, διαφορετικής παρτίδας κ.λπ.), τα πρότυπα αναφοράς θα πρέπει να ελέγχονται για τα κύτταρα όλων των προελεύσεων.

Πίνακας 6

Παράδειγμα κατανομής συγκεντρώσεων τρυβλίου των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών μαρτύρων τρυβλίου στο τρυβλίο δοκιμασίας ανταγωνιστών ER

Σειρά	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3			Υπό δοκιμή χημική ουσία 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	συγκ. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	συγκ. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
Γ	συγκ. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
Δ	συγκ. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	συγκ. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
ΣT	συγκ. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
Z	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: μάρτυρας με φορέα (0,1% DMSO), PC: θετικός μάρτυρας (1 nM E2), OHT: 4-υδροξυταμοξιφαίνη, Dig: διγιτονίνη.

: εμβολιασμένη με 25 pM E2

29. Θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η έλλειψη φαινομένων άκρου (edge effects), όπου απαιτείται, και εάν υπάρχουν υπόνοιες για τέτοια φαινόμενα θα πρέπει να τροποποιείται η διάταξη του τρυβλίου με σκοπό την αποφυγή τους. Για παράδειγμα, μπορεί να εφαρμόζεται διάταξη τρυβλίου στην οποία αποκλείονται οι κοιλότητες των άκρων.

30. Μετά την προσθήκη των χημικών ουσιών, τα τρυβλία δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε επωαστήρα 5 % CO_2 στους 37±1°C επί 20-24 ώρες με σκοπό την επαγωγή των προϊόντων γονιδίου αναφοράς.

31. Ειδική μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται για τις ενώσεις υψηλής πτητικότητας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μια παρακείμενη κοιλότητα μάρτυρα μπορεί να οδηγήσει στη λήψη ψευδοθετικού αποτελέσματος, ενδεχόμενο που θα πρέπει να συνεκτιμάται με βάση τις αναμενόμενες τιμές και τις τιμές ιστορικών μαρτύρων. Στις λίγες περιπτώσεις στις οποίες η πτητικότητα μπορεί να αποτελεί πρόβλημα, συνιστάται η χρήση καλυμμάτων σφράγισης των τρυβλίων καθώς μπορεί να βοηθήσει στην αποτελεσματική απομόνωση των κοιλοτήτων κατά τη διάρκεια των δοκιμών.

32. Προκειμένου να διασφαλίζεται η ανεξαρτησία, θα πρέπει να διεξάγονται επαναλαμβανόμενες οριστικές δοκιμές για την ίδια χημική ουσία σε διαφορετικές ημέρες.

Δοκιμασία λουσιφεράσης

33. Για τη δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιείται αντιδραστήριο δοκιμασίας λουσιφεράσης του εμπορίου [π.χ. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, ή ισοδύναμο)] ή τυποποιημένο σύστημα δοκιμασίας λουσιφεράσης (π.χ. Promega, E1500, ή ισοδύναμο), εφόσον πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής. Τα αντιδραστήρια της δοκιμασίας θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την ευαισθησία του λουμινόμετρου που θα χρησιμοποιηθεί. Όταν χρησιμοποιείται το τυποποιημένο σύστημα δοκιμασίας λουσιφεράσης, πριν από την προσθήκη του υποστρώματος θα πρέπει να χρησιμοποιείται αντιδραστήριο λύσης κυτταροκαλλιέργειας (π.χ. Promega, E1531, ή ισοδύναμο). Η εφαρμογή του αντιδραστηρίου λουσιφεράσης θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση τις οδηγίες του παρασκευαστή.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Δοκιμασία αγωνιστών ER

34. Στην περίπτωση δοκιμασίας αγωνιστών ER, για τη μέτρηση της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας στον θετικό μάρτυρα PC (1 nM E2) μπορούν να αναλύονται τα σήματα φωταύγειας από το ίδιο τρυβλίο με βάση τα ακόλουθα στάδια (άλλες ισοδύναμες μαθηματικές διαδικασίες είναι επίσης αποδεκτές):

Στάδιο 1: Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα.

Στάδιο 2: Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3: Υπολογισμός της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου θετικού μάρτυρα.

Στάδιο 4: Διαίρεση της κανονικοποιημένης τιμής κάθε κοιλότητας του τρυβλίου διά της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου θετικού μάρτυρα (PC=100 %).

Η τελική τιμή κάθε κοιλότητας είναι η σχετική μεταγραφική δραστηριότητα για τη συγκεκριμένη κοιλότητα σε σύγκριση με την απόκριση θετικού μάρτυρα.

Στάδιο 5: Υπολογισμός της μέσης τιμής της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας για κάθε ομάδα συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η απόκριση περιλαμβάνει δύο διαστάσεις: τη μέση μεταγραφική δραστηριότητα (απόκριση) και τη συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η απόκριση (βλ. επόμενη ενότητα).

Παράμετροι επαγωγής EC_{50}, PC_{50} και PC_{10}

35. Για τον υπολογισμό της EC50 είναι απαραίτητη η πλήρης καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης, χωρίς ωστόσο αυτό να είναι πάντοτε εφικτό ή χρήσιμο στην πράξη λόγω των περιορισμών του εύρους συγκεντρώσεων της δοκιμής (π.χ. λόγω προβλημάτων κυτταροτοξικότητας ή διαλυτότητας). Εντούτοις, καθώς η EC50 και το μέγιστο επίπεδο επαγωγής (που αντιστοιχεί στην ανώτατη τιμή της εξίσωσης Hill) είναι διαφωτιστικές παράμετροι, θα πρέπει να αναφέρονται, όταν αυτό είναι εφικτό. Για τον υπολογισμό της EC50 και του μέγιστου επιπέδου επαγωγής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλο λογισμικό στατιστικής ανάλυσης (π.χ. το λογισμικό στατιστικής ανάλυσης Graphpad Prism). Εάν η λογιστική εξίσωση Hill είναι εφαρμοστέα στα δεδομένα απόκρισης συγκέντρωσης, η EC50 θα πρέπει να υπολογίζεται βάσει της ακόλουθης εξίσωσης (7):

Y= ελάχιστη απόκριση + (μέγιστη απόκριση − ελάχιστη απόκριση) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x κλίση Hill)), όπου:

X είναι ο λογάριθμος της συγκέντρωσης και

Y είναι η απόκριση, και η Y ξεκινά από την ελάχιστη απόκριση και καταλήγει στη μέγιστη απόκριση ακολουθώντας πορεία σιγμοειδούς καμπύλης. Στη λογιστική εξίσωση Hill, η ελάχιστη απόκριση είναι καθορισμένη σε τιμή μηδέν.

36. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να παρέχονται τα ακόλουθα:

η RPCMax, η οποία είναι το μέγιστο επίπεδο απόκρισης που επάγεται από υπό δοκιμή χημική ουσία, εκφραζόμενη ως ποσοστό της απόκρισης που επάγεται από 1 nM E2 στο ίδιο τρυβλίο, καθώς και η PC_{Max} (η συγκέντρωση που συνδέεται με την RPCMax), και

για τις θετικές χημικές ουσίες, οι συγκεντρώσεις που επάγουν την PC10 και, κατά περίπτωση, την PC50.

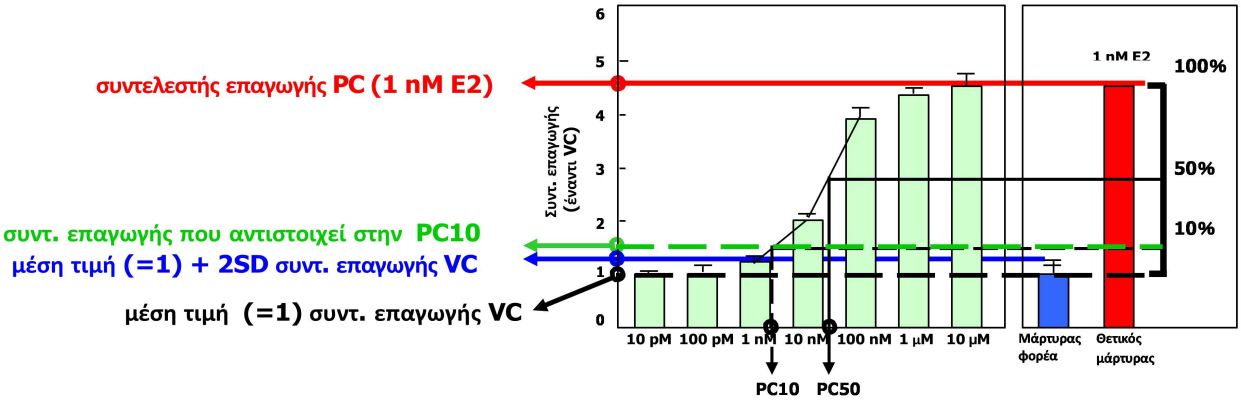
37. Η τιμή PCx μπορεί να υπολογιστεί μέσω παρεκβολής μεταξύ 2 σημείων των συντεταγμένων X-Y, ένα αμέσως υψηλότερο και ένα αμέσως χαμηλότερο από μια τιμή PCx. Αν τα σημεία δεδομένων που βρίσκονται αμέσως υψηλότερα και αμέσως χαμηλότερα από την τιμή PCx έχουν ως συντεταγμένες τις (a,b) και (c,d) αντίστοιχα, τότε η τιμή PCx μπορεί να υπολογιστεί βάσει της ακόλουθης εξίσωσης:

$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. Στο σχήμα 1 παρακάτω παρέχονται περιγραφές των τιμών θετικού μάρτυρα (PC).

Σχήμα 1

Παράδειγμα υπολογισμού τιμών θετικού μάρτυρα (PC). Ο PC (1 nM E2) περιλαμβάνεται σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας



Δοκιμασία ανταγωνιστών ER

39. Στην περίπτωση δοκιμασίας ανταγωνιστών ER, για τη μέτρηση της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας (RTA) στον εμβολιασμένο μάρτυρα PC (25 pM E2) μπορούν να αναλύονται τα σήματα φωταύγειας από το ίδιο τρυβλίο με βάση τα ακόλουθα στάδια (άλλες ισοδύναμες μαθηματικές διαδικασίες είναι επίσης αποδεκτές):

Στάδιο 1: Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα.

Στάδιο 2: Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων. Στάδιο 3: Υπολογισμός της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου εμβολιασμένου μάρτυρα.

Στάδιο 4: Διαίρεση της κανονικοποιημένης τιμής κάθε κοιλότητας του τρυβλίου διά της μέσης τιμής του κανονικοποιημένου εμβολιασμένου μάρτυρα (εμβολιασμένος μάρτυρας = 100 %).

Η τελική τιμή κάθε κοιλότητας είναι η σχετική μεταγραφική δραστηριότητα για τη συγκεκριμένη κοιλότητα σε σύγκριση με την απόκριση εμβολιασμένου μάρτυρα.

Στάδιο 5: Υπολογισμός της μέσης τιμής της σχετικής μεταγραφικής δραστηριότητας για κάθε αγωγή.

Παράμετροι επαγωγής IC_{30} και IC_{50}

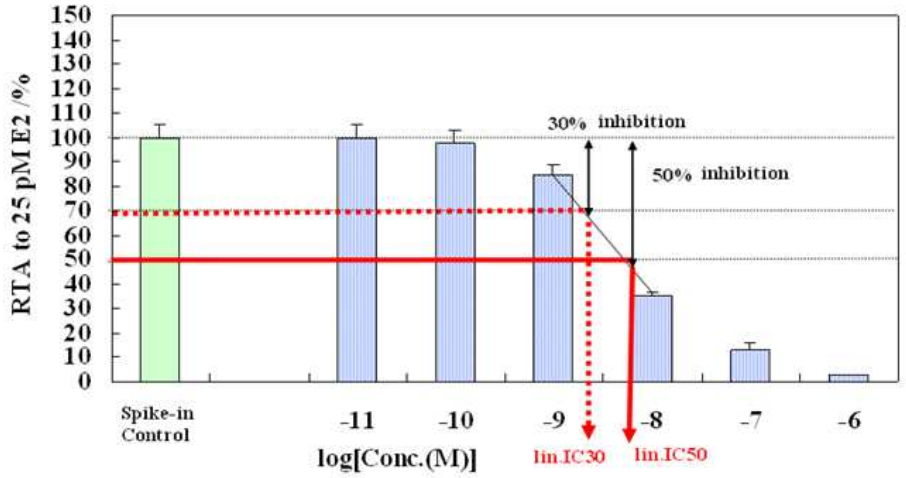
40. Για τις θετικές χημικές ουσίες, θα πρέπει να παρέχονται οι συγκεντρώσεις που επάγουν την IC30 και, κατά περίπτωση, την IC50.

41. Η τιμή ICx μπορεί να υπολογιστεί μέσω παρεκβολής μεταξύ 2 σημείων των συντεταγμένων X-Y, ένα αμέσως υψηλότερο και ένα αμέσως χαμηλότερο από μια τιμή ICx. Αν τα σημεία δεδομένων που βρίσκονται αμέσως υψηλότερα και αμέσως χαμηλότερα από την τιμή ICx έχουν ως συντεταγμένες τις (c,d) και (a,b) αντίστοιχα, τότε η τιμή ICx μπορεί να υπολογιστεί βάσει της ακόλουθης εξίσωσης:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c)/(b-d)

Σχήμα 2

Παράδειγμα υπολογισμού τιμών IC. Ο εμβολιασμένος μάρτυρας (25 pM E2) περιλαμβάνεται σε κάθε τρυβλίο δοκιμασίας



RTA: σχετική μεταγραφική δραστηριότητα

42. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να βασίζονται σε δύο (ή τρεις) ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που από δύο σειρές δοκιμών προκύπτουν συγκρίσιμα και, ως εκ τούτου, αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Για να είναι αποδεκτά, τα αποτελέσματα θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

— να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (βλ. κριτήρια αποδοχής, παράγραφοι 14-20),

— να είναι αναπαραγώγιμα.

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

Πίνακας 7

Κριτήρια λήψης απόφασης χαρακτηρισμού του αποτελέσματος ως θετικού ή αρνητικού στη δοκιμασία αγωνιστών ER

Θετικό	Εάν προκύψει RPCMax που ισοδυναμεί ή υπερβαίνει το 10 % της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε τουλάχιστον δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.
Αρνητικό	Εάν η RPCMax δεν αντιστοιχεί σε τουλάχιστον 10 % της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.

Πίνακας 8

Κριτήρια λήψης απόφασης χαρακτηρισμού του αποτελέσματος ως θετικού ή αρνητικού στη δοκιμασία ανταγωνιστών ER

Θετικό	Εάν υπολογίζεται η IC30 σε τουλάχιστον δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.
Αρνητικό	Εάν δεν μπορεί να υπολογιστεί η IC30 σε δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.

43. Τα κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων φαίνονται στους πίνακες 7 και 8. Για τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρεται τόσο το μέγεθος της επίδρασης όσο και η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η επίδραση. Και τα δύο αυτά επιτυγχάνονται όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση στην οποία επιτυγχάνεται το 50 % (PC50) ή το 10 % (PC10) των τιμών θετικού μάρτυρα (PC) για τη δοκιμασία αγωνιστών, και ως συγκέντρωση στην οποία αναστέλλεται το 50 % (IC50) ή το 30 % (IC30) της τιμής του εμβολιασμένου μάρτυρα για τη δοκιμασία ανταγωνιστών. Ωστόσο, μια υπό δοκιμή χημική ουσία χαρακτηρίζεται θετική εάν η μέγιστη απόκριση που επάγει (RPCMax) είναι ίση ή υπερβαίνει το 10 % της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε τουλάχιστον δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών, ενώ θεωρείται αρνητική εάν η RPCMax δεν αντιστοιχεί στο 10 % τουλάχιστον της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε δύο από δύο ή δύο από τρεις σειρές δοκιμών.

44. Οι τιμές των PC10, PC50 και PCMax στη δοκιμασία αγωνιστών ER και οι τιμές των IC30 και IC50 στη δοκιμασία ανταγωνιστών ER μπορούν να υπολογιστούν με χρήση υπολογιστικού φύλλου που διατίθεται με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών στον δημόσιο δικτυακό τόπο του ΟΟΣΑ ([2]).

45. Ο υπολογισμός των τιμών PC10 ή PC50 και IC30 ή IC50 τουλάχιστον δύο φορές αναμένεται ότι θα είναι επαρκής. Εντούτοις, σε περίπτωση που η προκύπτουσα γραμμή βάσης για τα δεδομένα στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων εμφανίζει μεταβλητότητα με απαράδεκτα υψηλό συντελεστή μεταβλητότητας (CV, %), τα δεδομένα δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα και θα πρέπει να προσδιορίζεται η αιτία της υψηλής μεταβλητότητας. Ο συντελεστής μεταβλητότητας των τριπλών ανεπεξέργαστων δεδομένων (δηλ. τα δεδομένα έντασης φωταύγειας) των σημείων δεδομένων που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του PC10 θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 20 %.

46. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής υποδεικνύει ότι το σύστημα δοκιμασίας λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη σειρά δοκιμών θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων της πρώτης σειράς δοκιμών είναι ο καλύτερος τρόπος να επιβεβαιώνεται ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα.

47. Σε περίπτωση δοκιμασίας αγωνιστών ER, όταν απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες για τις θετικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες, για σκοπούς πέρα από τη διαλογή και την ιεράρχηση προτεραιοτήτων της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών, ιδίως για τις χημικές ουσίες PC10-PC49 και για τις χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι υπερενεργοποιούν τη λουσιφεράση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανταγωνιστής του ERα για να επιβεβαιωθεί ότι η παρατηρούμενη δραστηριότητα λουσιφεράσης αποτελεί αποκλειστικά και μόνο απόκριση που σχετίζεται με τον ERα (βλ. προσάρτημα 2.1).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

48. Βλ. παράγραφο 20 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al*. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

Προσάρτημα 2.1

ΨΕΥΔΟΘΕΤΙΚΕΣ ΕΚΒΑΣΕΙΣ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

1. Οι ψευδοθετικές εκβάσεις στη δοκιμασία αγωνιστών ER μπορεί να οφείλονται σε ενεργοποίηση του γονιδίου λουσιφεράσης χωρίς μεσολάβηση ER ή σε άμεση ενεργοποίηση του γονιδιακού προϊόντος ή σε φθορισμό από άσχετη πηγή. Τέτοιες επιδράσεις αναγνωρίζονται από ατελή ή ασυνήθη καμπύλη δόσης-απόκρισης. Σε περίπτωση που υπάρχουν υπόνοιες για παρόμοιες επιδράσεις, θα πρέπει να εξετάζεται η επίδραση ενός ανταγωνιστή ER [π.χ. 4-υδροξυταμοξιφαίνη (OHT) σε μη τοξική συγκέντρωση] επί της απόκρισης. Ο καθαρός ανταγωνιστής ICI 1827 80 μπορεί να μην είναι κατάλληλος για αυτόν τον σκοπό, δεδομένου ότι επαρκής συγκέντρωση ICI 1827 80 μπορεί να μειώσει την τιμή του μάρτυρα με φορέα (VC), με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η ανάλυση δεδομένων.

2. Για να διασφαλίζεται η εγκυρότητα της προσέγγισης, θα πρέπει να ελέγχονται τα ακόλουθα στο ίδιο τρυβλίο:

   — αγωνιστική δραστικότητα της άγνωστης χημικής ουσίας με/χωρίς 10 μM OHT

   — VC (εις τριπλούν)

   — OHT (εις τριπλούν)

   — 1 nM E2 (εις τριπλούν) ως θετικός μάρτυρας αγωνιστή

   — 1 nM E2 + OHT (εις τριπλούν)

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

Σημείωση: όλες οι κοιλότητες θα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή με την ίδια συγκέντρωση του φορέα.

— Εάν η αγωνιστική δραστικότητα της άγνωστης χημικής ουσίας ΔΕΝ επηρεάζεται από την αγωγή με τον ανταγωνιστή ER, ταξινομείται ως «αρνητική».

— Εάν η αγωνιστική δραστικότητα της άγνωστης χημικής ουσίας αναστέλλεται πλήρως, εφαρμόστε τα κριτήρια λήψης απόφασης.

— Εάν η αγωνιστική δραστικότητα στη χαμηλότερη συγκέντρωση ισούται με ή υπερβαίνει την απόκριση PC10, η άγνωστη χημική ουσία αναστέλλεται σε ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο από αυτόν της απόκρισης PC10. Υπολογίζεται η διαφορά στις αποκρίσεις μεταξύ των κοιλοτήτων που δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή και των κοιλοτήτων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον ανταγωνιστή ER, και αυτή η διαφορά θα πρέπει να θεωρείται η πραγματική απόκριση και να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των κατάλληλων παραμέτρων για τη λήψη απόφασης περί της ταξινόμησης.

Ανάλυση δεδομένων

Έλεγχος του προτύπου επιδόσεων.

Έλεγχος του συντελεστή μεταβλητότητας (CV) μεταξύ των κοιλοτήτων που υποβλήθηκαν σε αγωγή υπό τις ίδιες συνθήκες.

1. Υπολογισμός της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα (VC)

2. Αφαίρεση της μέσης τιμής μάρτυρα με φορέα από την τιμή κάθε κοιλότητας που **δεν** υποβλήθηκε σε αγωγή με OHT

3. Υπολογισμός της μέσης τιμής OHT

4. Αφαίρεση της μέσης τιμής μάρτυρα με φορέα από την τιμή κάθε κοιλότητας που υποβλήθηκε σε αγωγή με OHT

5. Υπολογισμός της μέσης τιμής θετικού μάρτυρα

6. Υπολογισμός της σχετικής μεταγραφικής δραστικότητας όλων των υπόλοιπων κοιλοτήτων σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

Προσάρτημα 2.2

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΡΟΥ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΕΤΑΙ ΣΕ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΠΙΧΡΙΣΜΕΝΟ ΜΕ ΔΕΞΤΡΑΝΗ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ (DCC)

1. Η κατεργασία ορού με επιχρισμένο με δεξτράνη ενεργό άνθρακα (DCC) αποτελεί γενική μέθοδο απομάκρυνσης των οιστρογονικών ενώσεων από τον ορό που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, με σκοπό τον αποκλεισμό της εσφαλμένης απόκρισης που συνδέεται με κατάλοιπα οιστρογόνων στον ορό. Με τη διαδικασία αυτή μπορούν να υποβληθούν σε κατεργασία 500 ml βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS).

Στοιχεία

2. Θα χρειαστούν τα ακόλουθα υλικά και εξοπλισμός:

Υλικά

Ενεργός άνθρακας

Δεξτράνη

Εξάνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Σακχαρόζη

Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1 M (pH 7,4)

Υπερκαθαρό νερό από σύστημα φίλτρων

Εξοπλισμός

Αποστειρωμένος σε αυτόκαυστο γυάλινος περιέκτης (το μέγεθός του θα πρέπει να προσαρμόζεται κατάλληλα) Φυγόκεντρος εργαστηρίου γενικής χρήσης (που μπορεί να ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 4 °C)

Διαδικασία

3. Η ακόλουθη διαδικασία έχει προσαρμοστεί για τη χρήση σωλήνων φυγοκέντρου 50 ml:

[Ημέρα 1] Παρασκευή εναιωρήματος επιχρισμένου με δεξτράνη ενεργού άνθρακα με 1 L υπερκαθαρού νερού που περιέχει 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M σακχαρόζης, 2,5 g ενεργού άνθρακα, 0,25 g δεξτράνης και 5 mM HEPES και ολονύχτια ανάδευση στους 4 °C.

[Ημέρα 2] Μετάγγιση του εναιωρήματος σε σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml και φυγοκέντρηση στις 10 000 σ.α.λ. στους 4 °C επί 10 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και φύλαξη του μισού ιζήματος ενεργού άνθρακα στους 4 °C για χρήση την ημέρα 3. Εναιώρηση του υπόλοιπου μισού ενεργού άνθρακα με FBS που έχει αποψυχθεί με ήπιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση, αδρανοποίηση σε θερμοκρασία 56 °C επί 30 λεπτά και, κατόπιν, μεταφορά σε αποστειρωμένο γυάλινο περιέκτη, π.χ. φιάλη Erlenmeyer. Ολονύχτια ανάδευση του εναιωρήματος στους 4 °C.

[Ημέρα 3] Μετάγγιση του εναιωρήματος με το FBS σε σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκέντρηση στις 10 000 σ.α.λ. στους 4 °C επί 10 λεπτά. Συλλογή του FBS και μεταφορά στο νέο ίζημα ενεργού άνθρακα που έχει παρασκευαστεί και φυλαχθεί την ημέρα 2. Εναιώρηση του ιζήματος ενεργού άνθρακα και ολονύχτια ήπια ανάδευση του εναιωρήματος σε αποστειρωμένο γυάλινο περιέκτη στους 4 °C.

[Ημέρα 4] Μετάγγιση του εναιωρήματος για φυγοκέντρηση στις 10 000 σ.α.λ. στους 4 °C επί 10 λεπτά και αποστείρωση του υπερκείμενου υγρού με διήθηση μέσα από στείρο φίλτρο 0,2 μm. Αυτός ο ορός FBS που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με DCC θα πρέπει να φυλάσσεται στους −20 °C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός διαστήματος ενός έτους το πολύ.

Προσάρτημα 3

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ VM7LUC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Η παρούσα δοκιμασία χρησιμοποιεί την κυτταρική σειρά VM7Luc4E2 ([1]). Έχει επικυρωθεί από το National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), και την Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων) (1). Οι κυτταρικές σειρές VM7Luc εκφράζουν κατά κύριο λόγο ενδογενή ERα και μικρή ποσότητα ERβ (2) (3) (4).

2. Η παρούσα δοκιμασία εφαρμόζεται σε ευρύ φάσμα ουσιών, υπό την προϋπόθεση ότι μπορούν να διαλυθούν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, CASRN 67-68-5), δεν αντιδρούν με το DMSO ή το μέσο κυτταροκαλλιέργειας και δεν είναι κυτταροτοξικές στις υπό δοκιμή συγκεντρώσεις. Σε περίπτωση που δεν είναι εφικτή η χρήση DMSO, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλος φορέας όπως η αιθανόλη ή το νερό (βλ. παράγραφο 12). Οι καταδειχθείσες επιδόσεις της δοκιμασίας (αντ-)αγωνιστών VM7Luc ER TA υποδεικνύουν ότι η εν λόγω δοκιμασία μπορεί να παρέχει διαφωτιστικά δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης που μεσολαβούνται από τους ER, τα οποία μπορούν να λαμβάνονται υπόψη για την κατά προτεραιότητα ιεράρχηση των ουσιών προς διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

3. Η παρούσα δοκιμασία έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση της μεσολαβούμενης από τον hERα και τον hERβ TA μέσω μέτρησης της χημειοφωταύγειας ως παραμέτρου. Η χρήση της χημειοφωταύγειας στις βιοδοκιμασίες αποτελεί ευρέως διαδεδομένη πρακτική διότι η φωταύγεια έχει υψηλή αναλογία σήματος προς υπόβαθρο. Εντούτοις, ουσίες που αναστέλλουν το ένζυμο λουσιφεράση μπορούν να προκαλέσουν σύγχυση ως προς τη δραστικότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας σε κυτταρικές δοκιμασίες, προκαλώντας είτε φαινομενική αναστολή είτε αυξημένη φωταύγεια λόγω σταθεροποίησης πρωτεϊνών. Επιπλέον, σε ορισμένες δοκιμασίες γονιδίου αναφοράς ER που χρησιμοποιούν τη λουσιφεράση, έχουν αναφερθεί σήματα φωταύγειας που δεν μεσολαβούνται από υποδοχείς σε συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων υψηλότερες του 1 μM λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης (9) (11). Παρότι η καμπύλη δόσης-απόκρισης υποδεικνύει ότι η πραγματική ενεργοποίηση του συστήματος ER λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η έκφραση της λουσιφεράσης που επιτυγχάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ανάλογων ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι επάγουν ανάλογη με τα φυτοοιστρογόνα υπερενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά σε συστήματα δοκιμασίας ER TA σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (βλ. προσάρτημα 2).

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ» και «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η δοκιμασία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δέσμευσης προσδεμάτων στον ER, την οποία ακολουθεί η μετατόπιση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέματος στον πυρήνα. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος δεσμεύεται σε ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς (*luc*), με αποτέλεσμα την παραγωγή λουσιφεράσης και την επακόλουθη εκπομπή φωτός, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με χρήση λουμινόμετρου. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης μπορεί να αξιολογηθεί γρήγορα και με χαμηλό κόστος με χρήση διαφόρων κιτ δοκιμής του εμπορίου. Η ER TA VM7Luc χρησιμοποιεί μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του μαστού που αποκρίνεται στον ER, τη VM7, η οποία έχει διαμολυνθεί σταθερά με κατασκεύασμα γονιδίου αναφοράς *luc* της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο τεσσάρων στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα που βρίσκονται ανάντη του υποκινητή ιούκαρκίνου

([1]) Πριν από τον Ιούνιο του 2016 αυτή η κυτταρική σειρά ονομαζόταν BG1Luc. Τα κύτταρα BG-1 περιγράφηκαν αρχικά από τους Geisinger et al. (1998) (12) και χαρακτηρίστηκαν αργότερα από ερευνητές του Εθνικού Ινστιτούτου Περιβαλλοντικών Επιστημών Υγείας των ΗΠΑ (NIEHS) (13). Σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές παραλλαγές των κυττάρων BG-1 που χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές, τα κύτταρα BG-1 Fr και BG-1 NIEHS. Εις βάθος ανάλυση, που περιλάμβανε και αναλύσεις DNA, αυτών των δύο παραλλαγών της κυτταρικής σειράς BG-1, που διενήργησαν οι Li και συνεργάτες (2014) (14), κατέδειξε ότι η BG-1 Fr ήταν μοναδική και ότι η BG-1 NIEHS, δηλαδή η αρχική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της δοκιμασίας, δεν ήταν η κυτταρική σειρά καρκινώματος των ωοθηκών του ανθρώπου BG1 αλλά μια παραλλαγή της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού του ανθρώπου MCF7. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία, η οποία ονομαζόταν αρχικά BG1Luc4E2 (15), θα ονομάζεται στο εξής VM7Luc4E2 («V» = παραλλαγή· «M7» = κύτταρα MCF7). Αντίστοιχα, η δοκιμασία θα ονομάζεται στο εξής ER TA VM7Luc. Παρότι, με βάση τα παραπάνω, αλλάζει η προέλευση της κυτταρικής σειράς στην οποία βασίζεται η δοκιμασία, δεν επηρεάζονται οι δημοσιευμένες μελέτες επικύρωσης ούτε η χρησιμότητα και η εφαρμογή της εν λόγω δοκιμασίας για τη διαλογή των χημικών ουσιών με οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο δράση.

του μαστού του ποντικού (MMTV), για την ανίχνευση ουσιών με *in vitro* δραστικότητα αγωνιστή ή ανταγωνιστή για τον ER. Ο εν λόγω υποκινητής MMTV παρουσιάζει περιορισμένη μόνο διασταυρούμενη αντίδραση σε άλλες στεροειδείς και μη στεροειδείς ορμόνες (8). Τα κριτήρια για την ερμηνεία των δεδομένων περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 41. Εν συντομία, η θετική απόκριση προσδιορίζεται βάσει καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης που περιέχει τουλάχιστον τρία σημεία με μη επικαλυπτόμενες ράβδους σφάλματος (μέση τιμή ± SD), καθώς και βάσει της μεταβολής του πλάτους [κανονικοποιημένη σχετική μονάδα φωτός (RLU)] κατά τουλάχιστον 20 % της μέγιστης τιμής του προτύπου αναφοράς (17β-οιστραδιόλη [E2, CASRN 50-28-2] για τη δοκιμασία αγωνιστών, υδροχλωρική ραλοξιφαίνη [Ral, CASRN 84 449-90-1]/E2 για τη δοκιμασία ανταγωνιστών).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυτταρική σειρά

6. Για τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η σταθερώς διαμολυνθείσα κυτταρική σειρά VM7Luc4E2. Προς το παρόν η κυτταρική σειρά διατίθεται μόνο κατόπιν σύναψης συμφωνίας άδειας τεχνικής συνδρομής με το πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια (Davis, Καλιφόρνια, ΗΠΑ) ([2]) και τη Xenobiotic Detection Systems Inc. (Durham, Βόρεια Καρολίνα, ΗΠΑ) ([3]).

Σταθερότητα της κυτταρικής σειράς

7. Για τη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητας της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από μία ανακαλλιέργειες από το κατεψυγμένο απόθεμα σε θρεπτικά μέσα συντήρησης κυττάρων (βλ. παράγραφο 9). Τα κύτταρα δεν θα πρέπει να καλλιεργούνται για περισσότερες από 30 ανακαλλιέργειες. Για την κυτταρική σειρά VM7Luc4E2, οι 30 ανακαλλιέργειες διαρκούν περίπου τρεις μήνες.

Συνθήκες καλλιέργειας και επίστρωσης κυττάρων

8. Για τη διασφάλιση της ποιότητας όλων των υλικών και των μεθόδων, με σκοπό τη διαφύλαξη της ακεραιότητας, της εγκυρότητας και της αναπαραγωγιμότητας κάθε εκτελούμενης εργασίας, θα πρέπει να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο υλικό καθοδήγησης σχετικά με την ορθή πρακτική καλλιέργειας κυττάρων (5) (6).

9. Τα κύτταρα VM7Luc4E2 συντηρούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI 1 640 που έχει συμπληρωθεί με 0,9 % Pen-Strep και 8,0 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS) σε επωαστήρα καλλιέργειας ιστών αποκλειστικής χρήσης, σε θερμοκρασία 37°C ± 1°C, υγρασία 90 % ± 5 % και 5,0 % ± 1 % CO_2/αέρα.

10. Μετά την επίτευξη συρροής ~80 %, τα κύτταρα VM7Luc4E2 ανακαλλιεργούνται και εγκλιματίζονται σε περιβάλλον ελεύθερο οιστρογόνων επί 48 ώρες, προτού επιστρωθούν σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων με σκοπό την έκθεσή τους στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και την ανάλυση της επαγόμενης από τα οιστρογόνα δραστικότητας λουσιφεράσης. Το ελεύθερο οιστρογόνων μέσο (EFM) περιέχει τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco (DMEM) χωρίς ερυθρό της φαινόλης, συμπληρωμένο με 4,5 % κατεργασμένου με ενεργό άνθρακα/δεξτράνη FBS, 1,9 % L-γλουταμίνη, και 0,9 % Pen-Strep. Ο πλαστικός εξοπλισμός θα πρέπει να είναι στο σύνολό του ελεύθερος οιστρογονικής δραστικότητας [βλ. αναλυτικό πρωτόκολλο (7)].

Κριτήρια αποδοχής

11. Η αποδοχή ή απόρριψη μιας δοκιμής εξαρτάται από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των προτύπων αναφοράς και των μαρτύρων κάθε πειράματος που διεξήχθη σε τρυβλίο 96 κοιλοτήτων. Κάθε πρότυπο αναφοράς ελέγχεται σε πολλές συγκεντρώσεις και λαμβάνονται πολλαπλά δείγματα από κάθε συγκέντρωση αναφοράς και μάρτυρα. Τααποτελέσματα

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, αρ. τηλεφώνου: 919/-688-4804, αρ. φαξ: 919-688-4404

συγκρίνονται με τους ποιοτικούς ελέγχους (QC) για τις εν λόγω παραμέτρους που έχουν ληφθεί από τις βάσεις ιστορικών δεδομένων αγωνιστών και ανταγωνιστών που δημιουργεί κάθε εργαστήριο στο πλαίσιο της διαδικασίας απόδειξης της τεχνικής ικανότητας. Οι βάσεις ιστορικών δεδομένων επικαιροποιούνται διαρκώς με τις τιμές προτύπων αναφοράς και μαρτύρων. Οι αλλαγές στον εξοπλισμό ή τις εργαστηριακές συνθήκες ενδέχεται να επιβάλουν την επικαιροποίηση των βάσεων ιστορικών δεδομένων.

Δοκιμή αγωνιστών

Δοκιμή προσδιορισμού εύρους

- Επαγωγή: Η επαγωγή των τρυβλίων θα πρέπει να μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής σχετικής μονάδας φωτός των προτύπων αναφοράς E2 (RLU) διά της μέσης τιμής RLU των μαρτύρων DMSO. Συνήθως επιτυγχάνεται πενταπλάσια επαγωγή αλλά, για σκοπούς ελέγχου αποδοχής, η επαγωγή θα πρέπει να είναι τετραπλάσια ή μεγαλύτερη.

- Αποτελέσματα μάρτυρα DMSO: Οι τιμές RLU των μαρτύρων με διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κατά περισσότερο από 2,5 φορές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής RLU των ιστορικών μαρτύρων με διαλύτη.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα δύο κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να απορρίπτεται και να επαναλαμβάνεται.

Συνολική δοκιμή

Περιλαμβάνει τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής προσδιορισμού εύρους αγωνιστών και τα ακόλουθα κριτήρια:

- Αποτελέσματα προτύπων αναφοράς: Η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης προτύπων αναφοράς E2 θα πρέπει να είναι σιγμοειδούς σχήματος και να περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις τιμές εντός του γραμμικού τμήματός της.

- Αποτελέσματα θετικού μάρτυρα: Οι τιμές RLU του μάρτυρα methoxychlor θα πρέπει να υπερβαίνουν τη μέση τιμή του DMSO συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή του DMSO.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να απορρίπτεται και να επαναλαμβάνεται.

Δοκιμή ανταγωνιστών

Δοκιμή προσδιορισμού εύρους

- Μείωση: Η μείωση στα τρυβλία θα πρέπει να μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής RLU των προτύπων αναφοράς Ral/E2 διά της μέσης τιμής RLU των μαρτύρων DMSO. Συνήθως επιτυγχάνεται πενταπλάσια μείωση αλλά, για σκοπούς ελέγχου αποδοχής, η μείωση θα πρέπει να είναι τριπλάσια ή μεγαλύτερη.

- Αποτελέσματα μαρτύρων E2: Οι τιμές RLU των μαρτύρων E2 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κατά περισσότερο από 2,5 φορές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής RLU των ιστορικών μαρτύρων E2.

- Αποτελέσματα μαρτύρων DMSO: Οι τιμές RLU των μαρτύρων DMSO δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κατά περισσότερο από 2,5 φορές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής RLU των ιστορικών μαρτύρων με διαλύτη.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα κριτήρια αποδοχής, θα απορρίπτεται και θα επαναλαμβάνεται.

Συνολική δοκιμή

Περιλαμβάνει τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής προσδιορισμού εύρους ανταγωνιστών και τα ακόλουθα κριτήρια:

- Αποτελέσματα προτύπων αναφοράς: Η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης προτύπων αναφοράς Ral/E2 θα πρέπει να είναι σιγμοειδούς σχήματος και να περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις τιμές εντός του γραμμικού τμήματός της.

- Αποτελέσματα θετικού μάρτυρα: Οι τιμές RLU του μάρτυρα ταμοξιφαίνης/E2 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τη μέση τιμή μάρτυρα E2 μείον τρεις φορές την τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή μάρτυρα E2.

- Σε περίπτωση που ένα πείραμα δεν πληροί οποιοδήποτε από τα κριτήρια αποδοχής, θα απορρίπτεται και θα επαναλαμβάνεται.

Πρότυπα αναφοράς, θετικοί μάρτυρες και μάρτυρες με φορέα

Μάρτυρας με φορέα (δοκιμασίες αγωνιστών και ανταγωνιστών)

12. Ο φορέας που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να ελέγχεται ως μάρτυρας με φορέα. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε κατά την επικύρωση της δοκιμασίας ER TA VM7Luc ήταν 1 % κ.ό. διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, CASRN 67-68-5) (βλ. παράγραφο 24). Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας διαφορετικός από το DMSO, όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται στον ίδιο φορέα, ανάλογα με την περίπτωση.

Πρότυπο αναφοράς (προσδιορισμός εύρους αγωνιστών)

13. Το πρότυπο αναφοράς είναι η E2 (CASRN 50-28-2). Για δοκιμές προσδιορισμού του εύρους, το πρότυπο αναφοράς περιλαμβάνει τέσσερις συγκεντρώσεις E2 από διαδοχικές αραιώσεις (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} και 2,87 x 10^{-12} M), με κάθε συγκέντρωση να ελέγχεται σε διπλές κοιλότητες.

Πρότυπο αναφοράς (ολοκληρωμένη δοκιμή αγωνιστών)

14. Η E2 για ολοκληρωμένες δοκιμές περιλαμβάνει 11 συγκεντρώσεις E2 από διαδοχικές αραιώσεις 1:2 (από 3,67 x 10^{-10} έως 3,59 x 10^{-13} M) σε διπλές κοιλότητες.

Πρότυπο αναφοράς (προσδιορισμός εύρους ανταγωνιστών)

15. Το πρότυπο αναφοράς αποτελεί συνδυασμό Ral (CASRN 84 449-90-1) και E2 (CASRN 50-28-2). Τα πρότυπα Ral/E2 για δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν τρεις συγκεντρώσεις Ral από διαδοχικές αραιώσεις (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} και 1,92 x 10^{-10} M) συν καθορισμένη συγκέντρωση (9,18 × 10^{-11} M) E2 σε διπλές κοιλότητες.

Πρότυπο αναφοράς (ολοκληρωμένη δοκιμή ανταγωνιστών)

16. Τα πρότυπα Ral/E2 για ολοκληρωμένες δοκιμές περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις Ral 1:2 (από 2,45 x 10^{-8} έως 9,57 x 10^{-11}M) συν καθορισμένη συγκέντρωση (9,18 × 10^{-11} M) E2 που περιλαμβάνει εννέα συγκεντρώσεις Ral/E2 σε διπλές κοιλότητες.

Ασθενής θετικός μάρτυρας (αγωνιστών)

17. Ο ασθενής θετικός μάρτυρας είναι 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor, CASRN 72-43-5) σε EFM.

Ασθενής θετικός μάρτυρας (ανταγωνιστών)

18. Ο ασθενής θετικός μάρτυρας είναι ταμοξιφαίνη (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M με 9,18 × 10^{-11} M E2 σε EFM.

Μάρτυρας E2 (μόνο για δοκιμασία ανταγωνιστών)

19. Ο μάρτυρας E2 είναι 9,18 × 10^{-11} M E2 σε EFM και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας γραμμής βάσης.

Πολλαπλάσια επαγωγή (αγωνιστές)

20. Η επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης του προτύπου αναφοράς (E2) μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής RLU του προτύπου αναφοράς E2 διά της μέσης τιμής RLU του μάρτυρα DMSO, και το αποτέλεσμα θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από τετραπλάσιο.

Πολλαπλάσια μείωση (ανταγωνιστές)

21. Η μέση δραστικότητα λουσιφεράσης του προτύπου αναφοράς (Ral/E2) μετράται με διαίρεση της μέσης ανώτατης τιμής RLU του προτύπου αναφοράς Ral/E2 διά της μέσης τιμής RLU του μάρτυρα DMSO, και το αποτέλεσμα θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από τριπλάσιο.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (βλ. παράγραφο 14 και πίνακες 3 και 4 στην ενότητα «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA» της παρούσας μεθόδου δοκιμών)

Φορέας

22. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε διαλύτη που διαλύει την υπό δοκιμή χημική ουσία και που αναμειγνύεται με το θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Κατάλληλοι φορείς είναι το νερό, η αιθανόλη (καθαρότητας 95 % έως 100 %) και το DMSO. Εάν χρησιμοποιηθεί το DMSO, το επίπεδο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 % κ.ό. Για οποιονδήποτε φορέα, θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι ο μέγιστος όγκος που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν επηρεάζει τις επιδόσεις της δοκιμασίας. Τα πρότυπα αναφοράς και οι μάρτυρες διαλύονται σε 100 % διαλύτη και κατόπιν αραιώνονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις με EFM.

Προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

23. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε 100 % DMSO και κατόπιν αραιώνονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις με EFM. Πριν από τη διάλυση και την αραίωσή τους, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες να ισορροπούν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα θα πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα. Τα διαλύματα δεν θα πρέπει να εμφανίζουν εμφανές ίζημα ή θολερότητα. Τα αποθέματα προτύπων αναφοράς και μαρτύρων μπορούν να παρασκευάζονται μαζικά, ωστόσο το τελικό πρότυπο αναφοράς, οι αραιώσεις των μαρτύρων και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα θα πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα και να χρησιμοποιούνται εντός 24 ωρών από την παρασκευή τους.

Διαλυτότητα και κυτταροτοξικότητα: ζητήματα σχετικά με τον προσδιορισμό εύρους

24. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 επτά σημείων που εκτελούνται εις διπλούν. Αρχικά, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες ελέγχονται στη μέγιστη συγκέντρωση 1 mg/ml (~1 mM) για τις δοκιμές αγωνιστών και 20 μg/ml (~10 μM) για τις δοκιμές ανταγωνιστών. Τα πειράματα προσδιορισμού εύρους χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ακόλουθων στοιχείων:

— αρχικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα χρησιμοποιηθούν στις ολοκληρωμένες δοκιμές

— αραιώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (1:2 ή 1:5) που θα χρησιμοποιηθούν στις ολοκληρωμένες δοκιμές

25. Στα πρωτόκολλα των δοκιμασιών αγωνιστών και ανταγωνιστών περιλαμβάνεται αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων / της κυτταροτοξικότητας (7), η οποία εντάσσεται στις δοκιμές προσδιορισμού εύρους και τις ολοκληρωμένες δοκιμές. Η μέθοδος κυτταροτοξικότητας που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την επικύρωση της ER TA VM7Luc (1) ήταν διαβαθμισμένη ποιοτική μέθοδος οπτικής παρατήρησης· ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποσοτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (βλ. πρωτόκολλο (7)). Δεδομένα από συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικών ουσιών που επάγουν μείωση της βιωσιμότητας άνω του 20 % δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

Έκθεση σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες και οργάνωση τρυβλίου της δοκιμασίας

26. Τα κύτταρα καταμετρώνται και επιστρώνονται σε τρυβλία καλλιέργειας ιστών 96 κοιλοτήτων (2×10^5 κύτταρα ανά κοιλότητα) σε EFM και επωάζονται επί 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν στο τρυβλίο. Το EFM αφαιρείται και αντικαθίσταται από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τις χημικές ουσίες αναφοράς σε EFM, και επωάζεται επί 19-24 ώρες. Ειδική μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται για τις εξαιρετικά πτητικές ουσίες, καθότι από τις διπλανές κοιλότητες μάρτυρα μπορεί να προκύψουν ψευδοθετικές εκβάσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται η χρήση καλυμμάτων σφράγισης καθώς μπορεί να βοηθήσει στην αποτελεσματική απομόνωση μεμονωμένων κοιλοτήτων κατά τη διάρκεια των δοκιμών.

Δοκιμές προσδιορισμού εύρους

27. Κατά τις δοκιμές προσδιορισμού εύρους χρησιμοποιούνται όλες οι κοιλότητες του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων για τον εις διπλούν έλεγχο έως έξι υπό δοκιμή χημικών ουσιών υπό μορφή διαδοχικών αραιώσεων 1:10 επτά σημείων (βλ. σχήματα 1 και 2).

— Στο πλαίσιο των δοκιμών προσδιορισμού εύρους *αγωνιστών* χρησιμοποιούνται τέσσερις εις διπλούν συγκεντρώσεις E2 ως πρότυπο αναφοράς και τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα DMSO.

— Στο πλαίσιο των δοκιμών προσδιορισμού εύρους *ανταγωνιστών* χρησιμοποιούνται τρεις εις διπλούν συγκεντρώσεις Ral/E2 με $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 ως πρότυπο αναφοράς, και τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες για τους μάρτυρες E2 και DMSO.

Σχήμα 1

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων δοκιμής προσδιορισμού εύρους αγωνιστών

	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
Γ	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
Δ	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
ΣΤ	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
Z	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

Συντομογραφίες: E2-1 έως E2-4 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· TC1-1 έως TC1-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1 (TC1)· TC2-1 έως TC2-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2 (TC2)· TC3-1 έως TC3-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 3 (TC3)· TC4-1 έως TC4-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 4 (TC4)· TC5-1 έως TC5-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 5 (TC5)· TC6-1 έως TC6-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 6 (TC6)· VC = μάρτυρας με φορέα [DMSO (1 % κ.ό. EFM.)].

Σχήμα 2

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων δοκιμής προσδιορισμού εύρους ανταγωνιστών

	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
Γ	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
Δ	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
ΣΤ	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
Z	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

Συντομογραφίες: E2 = μάρτυρας E2· Ral-1 έως Ral-3 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς ραλοξιφαίνη/E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· TC1-1 έως TC1-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1 (TC1)· TC2-1 έως TC2-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2 (TC2)· TC3-1 έως TC3-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 3 (TC3)· TC4-1 έως TC4-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 4 (TC4)· TC5-1 έως TC5-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 5 (TC5)· TC6-1 έως TC6-7 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 6 (TC6)· VC = μάρτυρας με φορέα [DMSO (1 % κ.ό. EFM.)].

Σημείωση: Όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες ελέγχονται παρουσία $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Ο συνιστώμενος τελικός όγκος μέσου που πρέπει να υπάρχει σε κάθε κοιλότητα είναι 200 μl. Χρησιμοποιείτε μόνο τρυβλία δοκιμής στα οποία η βιωσιμότητα των κυττάρων στο σύνολο των κοιλοτήτων είναι 80 % και άνω.

29. Ο προσδιορισμός των αρχικών συγκεντρώσεων για τις ολοκληρωμένες δοκιμές ***αγωνιστών*** περιγράφεται διεξοδικά στο πρωτόκολλο αγωνιστών (7). Εν συντομία, χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμής χημικής ουσίας δεν υπάρχουν σημεία που υπερβαίνουν τη μέση τιμή συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα DMSO, οι ολοκληρωμένες δοκιμές θα διεξάγονται με χρήση διαδοχικής αραίωσης 1:211 σημείων, ξεκινώντας από τη μέγιστη διαλυτή συγκέντρωση.

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπάρχουν σημεία που υπερβαίνουν τη μέση τιμή συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα DMSO, η αρχική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί για το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων στο πλαίσιο των ολοκληρωμένων δοκιμών θα πρέπει να είναι κατά έναν λογάριθμο υψηλότερη από τη συγκέντρωση από την οποία προκύπτει η υψηλότερη προσαρμοσμένη τιμή RLU στο πλαίσιο του προσδιορισμού εύρους. Το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων θα βασίζεται σε αραιώσεις είτε 1:2 είτε 1:5, σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

  Θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδοχική αραίωση 1:211 σημείων εάν το προκύπτον εύρος συγκέντρωσης περιλαμβάνει το πλήρες εύρος των αποκρίσεων βάσει της καμπύλης απόκρισης συγκέντρωσης που προέκυψε κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους. Διαφορετικά, χρησιμοποιήστε αραίωση 1:5.

— Εάν μια υπό δοκιμή χημική ουσία εμφανίζει διφασική καμπύλη συγκέντρωσης απόκρισης κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους, θα πρέπει να εξακριβώνονται και οι δύο φάσεις στο πλαίσιο των ολοκληρωμένων δοκιμών.

30. Ο προσδιορισμός των αρχικών συγκεντρώσεων για τις ολοκληρωμένες δοκιμές ***ανταγωνιστών*** περιγράφεται διεξοδικά στο πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7). Εν συντομία, χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμής χημικής ουσίας δεν υπάρχουν σημεία που είναι μικρότερα από τη μέση τιμή μείον τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα E2, οι ολοκληρωμένες δοκιμές θα διεξάγονται με χρήση διαδοχικής αραίωσης 1:211 σημείων, ξεκινώντας από τη μέγιστη διαλυτή συγκέντρωση.

— Εάν στην καμπύλη συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπάρχουν σημεία που είναι μικρότερα από τη μέση τιμή μείον τρεις φορές την τυπική απόκλιση του μάρτυρα E2, η αρχική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί για το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων στο πλαίσιο των ολοκληρωμένων δοκιμών θα πρέπει να είναι μία από τις ακόλουθες.

• Η συγκέντρωση από την οποία προκύπτει η χαμηλότερη προσαρμοσμένη τιμή RLU στο πλαίσιο του προσδιορισμού εύρους

• Η μέγιστη διαλυτή συγκέντρωση (βλ. πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7), σχήμα 14-2)

• Η χαμηλότερη κυτταροτοξική συγκέντρωση (για σχετικό παράδειγμα, βλέπε πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7), σχήμα 14-3)

— Το πρόγραμμα αραιώσεων 11 σημείων θα βασίζεται είτε σε αραιώσεις 1:2 είτε σε αραιώσεις 1:5, σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδοχική αραίωση 1:211 σημείων εάν το προκύπτον εύρος συγκέντρωσης περιλαμβάνει το πλήρες εύρος των αποκρίσεων βάσει της καμπύλης απόκρισης συγκέντρωσης που προέκυψε κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους. Διαφορετικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται αραίωση 1:5.

Συνολικές δοκιμές

31. Οι ολοκληρωμένες δοκιμές περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις 11 σημείων (διαδοχικές αραιώσεις είτε 1:2 είτε 1:5 βάσει της αρχικής συγκέντρωσης για τα κριτήρια των ολοκληρωμένων δοκιμών), με κάθε συγκέντρωση να ελέγχεται σε τριπλές κοιλότητες του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων (βλ. σχήματα 3 και 4).

— Στις ολοκληρωμένες δοκιμές *αγωνιστών*, ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιούνται 11 συγκεντρώσεις E2 εις διπλούν. Σε κάθε τρυβλίο περιλαμβάνονται τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα DMSO και τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα methoxychlor ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Στις ολοκληρωμένες δοκιμές *ανταγωνιστών*, ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιούνται εννέα συγκεντρώσεις Ral/E2 με $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 εις διπλούν, με τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τον μάρτυρα E2 $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για τους μάρτυρες DMSO, και τέσσερις πανομοιότυπες κοιλότητες για την ταμοξιφαίνη $3{,}36 \times 10^{-6}$ M.

Σχήμα 3

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων ολοκληρωμένων δοκιμών αγωνιστών

	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
Γ	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Δ	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
ΣΤ	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
Z	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

Συντομογραφίες: TC1-1 έως TC1-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1· TC2-1 έως TC2-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2· E2-1 έως E2-11 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· Meth = ασθενής θετικός μάρτυρας *p,p'*-methoxychlor· VC = μάρτυρας με φορέα EFM DMSO (1 % κ.ό.)

Σχήμα 4

Διάταξη τρυβλίου 96 κοιλοτήτων ολοκληρωμένων δοκιμών ανταγωνιστών

	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
Γ	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
Δ	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
ΣΤ	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
Z	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

Συντομογραφίες: E2 = μάρτυρας E2· Ral-1 έως Ral-9 = συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς ραλοξιφαίνη/E2 (από τις υψηλές στις χαμηλές)· Tam = ασθενής θετικός μάρτυρας ταμοξιφαίνη/E2· TC1-1 έως TC1-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 1 (TC1)· TC2-1 έως TC2-11 = συγκεντρώσεις (από τις υψηλές στις χαμηλές) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας 2 (TC2)· VC = μάρτυρας με φορέα [DMSO (1 % κ.ό. EFM.)].

Σημείωση: Όπως επισημάνθηκε, όλες οι κοιλότητες αναφοράς και δοκιμής περιέχουν καθορισμένη συγκέντρωση E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M)

32. Προκειμένου να διασφαλίζεται η ανεξαρτησία, θα πρέπει να διεξάγονται επαναλαμβανόμενες ολοκληρωμένες δοκιμές για την ίδια χημική ουσία σε διαφορετικές ημέρες. Θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον δύο ολοκληρωμένες δοκιμές. Εάν τα αποτελέσματα των δοκιμών είναι αντιφατικά μεταξύ τους (π.χ. μία δοκιμή είναι θετική και η άλλη αρνητική), ή εάν μία από τις δοκιμές είναι ανεπαρκής, θα πρέπει να διεξάγεται τρίτη, συμπληρωματική δοκιμή.

Μέτρηση φωταύγειας

33. Η φωταύγεια μετράται στο φάσμα από 300 έως 650 nm, με χρήση λουμινόμετρου έγχυσης και λογισμικού που ελέγχει τον όγκο έγχυσης και το μεσοδιάστημα μετρήσεων (7). Η εκπομπή φωτός από κάθε κοιλότητα εκφράζεται ως RLU ανά κοιλότητα.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Προσδιορισμός της EC_{50}/IC_{50}

34. Η τιμή της EC_{50} [ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (αγωνιστές)] και η τιμή της IC_{50} [ήμισυ της μέγιστης συγκέντρωσης αναστολής υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστές)] προσδιορίζονται από τα δεδομένα συγκέντρωσης-απόκρισης. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι θετικές σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις, η συγκέντρωση που επάγει τη μισή μέγιστη απόκριση (IC_{50} ή EC_{50}) υπολογίζεται με χρήση ανάλυσης συνάρτησης Hill ή κατάλληλου εναλλακτικού τρόπου. Η συνάρτηση Hill είναι ένα λογιστικό μαθηματικό μοντέλο τεσσάρων παραμέτρων που συσχετίζει τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με την απόκριση (ακολουθώντας, τυπικά, σιγμοειδή καμπύλη) με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$Y = \text{ελάχιστη} + \frac{(\text{μέγιστη} - \text{ελάχιστη})}{1 + 10(lgEC_{50} - X)\text{κλίση Hill}}$$

όπου:

Y= απόκριση (δηλ. RLU),

X= ο λογάριθμος συγκέντρωσης,

ελάχιστη= η ελάχιστη απόκριση,

μέγιστη= η μέγιστη απόκριση,

lg EC_{50} (ή lg IC_{50})= ο λογάριθμος του X ως η ενδιάμεση απόκριση μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης,

κλίση Hill= η κλίση της καμπύλης.

Με το μοντέλο υπολογίζονται οι βέλτιστες αρμόζουσες τιμές στις παραμέτρους μέγιστης απόκρισης, ελάχιστης απόκρισης, κλίσης Hill, και IC_{50} και EC_{50}. Για τον υπολογισμό των τιμών EC_{50} και IC_{50} θα πρέπει να χρησιμοποιείται το κατάλληλο λογισμικό στατιστικής ανάλυσης (π.χ. το λογισμικό Graphpad Prism^{R}).

Προσδιορισμός έκτοπων τιμών

35. Για την εξαγωγή ορθού στατιστικού συμπεράσματος μπορεί να είναι χρήσιμη η συμπερίληψη (ενδεικτικά) του ελέγχου Q-test [βλ. πρωτόκολλα αγωνιστών και ανταγωνιστών (7)] για τον προσδιορισμό των «μη χρησιμοποιήσιμων» κοιλοτήτων που θα αποκλειστούν από την ανάλυση των δεδομένων.

36. Όσον αφορά τα πανομοιότυπα δείγματα προτύπου αναφοράς E2 (μέγεθος δείγματος: δύο), κάθε προσαρμοσμένη τιμή RLU για δείγμα με καθορισμένη συγκέντρωση E2 θεωρείται έκτοπη εάν υπερβαίνει ή υπολείπεται κατά 20 % της προσαρμοσμένης τιμής RLU για τη συγκεκριμένη συγκέντρωση στη βάση ιστορικών δεδομένων.

Συλλογή και προσαρμογή των δεδομένων λουμινόμετρου για δοκιμές προσδιορισμού εύρους

37. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα του λουμινόμετρου θα πρέπει να καταχωρίζονται σε υπόδειγμα υπολογιστικού φύλλου ειδικά σχεδιασμένου για τη δοκιμασία. Θα πρέπει να προσδιορίζεται κατά πόσον υπάρχουν σημεία δεδομένων έκτοπων τιμών που πρέπει να αφαιρεθούν. (Για τις παραμέτρους που προσδιορίζονται στις αναλύσεις, βλέπε κριτήρια αποδοχής δοκιμής). Θα πρέπει να εκτελούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

Αγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας επαγωγής για το πρότυπο αναφοράς (E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής EC_{50} για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Ανταγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας μείωσης για το πρότυπο αναφοράς (Ral/E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής για το πρότυπο αναφοράς E2.

Στάδιο 5 Υπολογισμός της μέσης τιμής IC50 για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Συλλογή και προσαρμογή των δεδομένων λουμινόμετρου για ολοκληρωμένες δοκιμές

38. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα του λουμινόμετρου θα πρέπει να καταχωρίζονται σε υπόδειγμα υπολογιστικού φύλλου ειδικά σχεδιασμένου για τη δοκιμασία. Θα πρέπει να προσδιορίζεται κατά πόσον υπάρχουν σημεία δεδομένων έκτοπων τιμών που πρέπει να αφαιρεθούν. (Για τις παραμέτρους που προσδιορίζονται στις αναλύσεις, βλέπε κριτήρια αποδοχής δοκιμής). Εκτελούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

Αγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας επαγωγής για το πρότυπο αναφοράς (E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής EC_{50} για το E2 και τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Στάδιο 5 Υπολογισμός της μέσης προσαρμοσμένης τιμής RLU για το methoxychlor.

Ανταγωνιστής

Στάδιο 1 Υπολογισμός της μέσης τιμής για τον μάρτυρα με φορέα (VC) DMSO.

Στάδιο 2 Αφαίρεση της μέσης τιμής του μάρτυρα με φορέα DMSO από κάθε κοιλότητα με σκοπό την κανονικοποίηση των δεδομένων.

Στάδιο 3 Υπολογισμός της μέσης πολλαπλάσιας επαγωγής για το πρότυπο αναφοράς (Ral/E2).

Στάδιο 4 Υπολογισμός της μέσης τιμής IC_{50} για το Ral/E2 και τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Στάδιο 5 Υπολογισμός της μέσης προσαρμοσμένης τιμής RLU για την ταμοξιφαίνη.

Στάδιο 6 Υπολογισμός της μέσης τιμής για το πρότυπο αναφοράς E2.

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

39. Η ER TA VM7Luc προορίζεται για χρήση στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης με σκοπό τη διευκόλυνση της κατά προτεραιότητα ιεράρχησης των ουσιών για τη διεξαγωγή *in vivo* δοκιμών ED. Μέρος της εν λόγω διαδικασίας ιεράρχησης προτεραιοτήτων θα είναι η ταξινόμηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως θετικής ή αρνητικής όσον αφορά τη δραστικότητα είτε αγωνιστή είτε ανταγωνιστή για τον ER. Στον πίνακα 1 περιγράφονται τα κριτήρια λήψης απόφασης περί θετικής ή αρνητικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης ER TA VM7Luc.

Πίνακας 1

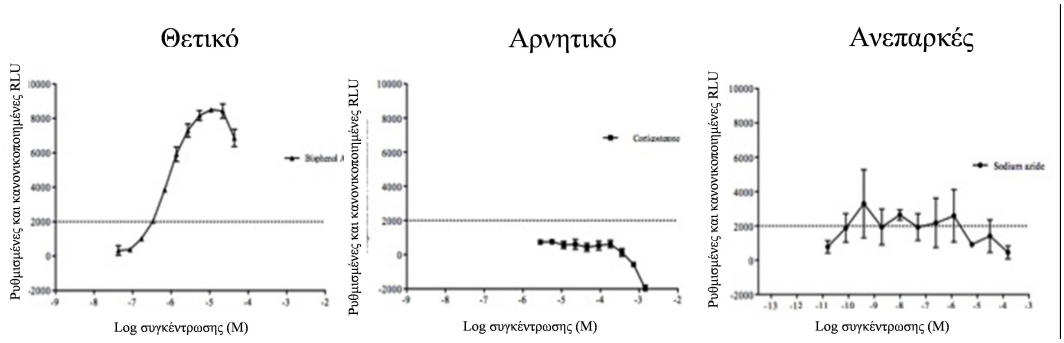
Κριτήρια λήψης απόφασης περί θετικής ή αρνητικής ουσίας

ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΓΩΝΙΣΤΗ	
Θετικά	— Όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως θετικές ως προς τη δραστικότητα αγωνιστή για τον ER θα πρέπει να έχουν καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης που περιλαμβάνει μια γραμμή βάσης, ακολουθούμενη από θετική κλίση, και η οποία καταλήγει σε πλατώ ή σε κορυφή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να προσδιορίζονται μόνο δύο από τα εν λόγω χαρακτηριστικά (γραμμή βάσης–κλίση ή κλίση–κορυφή). — Η γραμμή που καθορίζει τη θετική κλίση θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον τρία σημεία με μη επικαλυπτόμενες ράβδους σφάλματος (μέση τιμή ± SD). Τα σημεία που σχηματίζουν τη γραμμή βάσης αποκλείονται, αλλά το γραμμικό τμήμα της καμπύλης μπορεί να περιλαμβάνει την κορυφή ή το πρώτο σημείο του πλατώ της καμπύλης. — Για την ταξινόμηση μιας ουσίας ως θετικής απαιτείται πλάτος απόκρισης, δηλ. της διαφοράς μεταξύ γραμμής βάσης και κορυφής, που αντιστοιχεί στο 20 % τουλάχιστον της μέγιστης τιμής για το πρότυπο αναφοράς E2 [δηλ. 2 000 RLU ή περισσότερο, όταν η μέγιστη τιμή απόκρισης των προτύπων αναφοράς (E2) είναι προσαρμοσμένη στις 10 000 RLU]. — Ει δυνατόν, θα πρέπει να υπολογίζεται μια τιμή EC_{50} για κάθε θετική υπό δοκιμή χημική ουσία.
Αρνητικά	Η μέση προσαρμοσμένη RLU για καθορισμένη συγκέντρωση ισούται ή είναι μικρότερη της μέσης τιμής RLU μάρτυρα DMSO συν τρεις φορές την τυπική απόκλιση της RLU DMSO.
Ανεπαρκή	Δεδομένα που δεν μπορούν να θεωρηθούν έγκυρα για την κατάδειξη είτε της παρουσίας είτε της απουσίας δραστικότητας, λόγω σημαντικών ποιοτικών ή ποσοτικών περιορισμών, θεωρούνται ανεπαρκή και δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί κατά πόσον η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική ή αρνητική. Οι χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται εκ νέου σε δοκιμή.
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ	
Θετικά	— Από τα δεδομένα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προκύπτει καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης που περιλαμβάνει μια γραμμή βάσης, ακολουθούμενη από αρνητική κλίση. — Η γραμμή που καθορίζει την αρνητική κλίση θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον τρία σημεία με μη επικαλυπτόμενες ράβδους σφάλματος. Τα σημεία που σχηματίζουν τη γραμμή βάσης αποκλείονται, αλλά το γραμμικό τμήμα της καμπύλης μπορεί να περιλαμβάνει το πρώτο σημείο του πλατώ της καμπύλης. — Θα πρέπει να διαπιστώνεται τουλάχιστον 20 % μείωση της δραστικότητας σε σχέση με τη μέγιστη τιμή για το πρότυπο αναφοράς Ral/E2 (δηλ. 8 000 RLU ή λιγότερες όταν η μέγιστη τιμή απόκρισης του προτύπου αναφοράς [Ral/E2] προσαρμόζεται στις 10 000 RLU). — Οι υψηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι μικρότερες ή ίσες προς $1x10^{-5}$ M. — Ει δυνατόν, θα πρέπει να υπολογίζεται μια τιμή IC_{50} για κάθε θετική υπό δοκιμή χημική ουσία.
Αρνητικά	Όλα τα σημεία δεδομένων υπερβαίνουν την τιμή EC_{80} (80 % της απόκρισης E2, ή 8 000 RLU), σε συγκεντρώσεις μικρότερες από $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Ανεπαρκή	Δεδομένα που δεν μπορούν να θεωρηθούν έγκυρα για την κατάδειξη είτε της παρουσίας είτε της απουσίας δραστικότητας, λόγω σημαντικών ποιοτικών ή ποσοτικών περιορισμών, θεωρούνται ανεπαρκή και δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί κατά πόσον η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική ή αρνητική. Η χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται εκ νέου σε δοκιμή.

40. Ει δυνατόν, για τα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρεται τόσο το μέγεθος της επίδρασης όσο και η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η επίδραση. Στα σχήματα 5 και 6 φαίνονται παραδείγματα θετικών, αρνητικών και ανεπαρκών δεδομένων.

Σχήμα 5

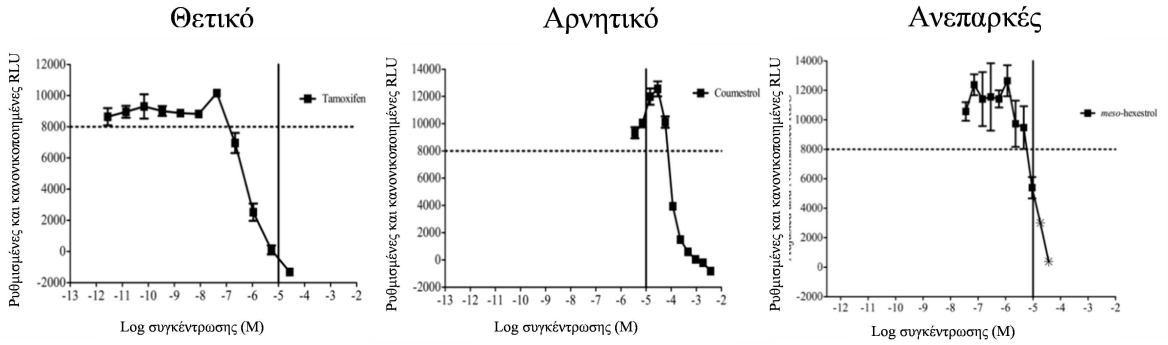
Παραδείγματα αγωνιστών: θετικά, αρνητικά και ανεπαρκή δεδομένα



Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το 20 % της απόκρισης E2, 2000 προσαρμοσμένες και κανονικοποιημένες RLU.

Σχήμα 6

Παραδείγματα ανταγωνιστών: θετικά, αρνητικά και ανεπαρκή δεδομένα



Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το 80 % της απόκρισης Ral/E2, 8 000 προσαρμοσμένες και κανονικοποιημένες RLU.

Η συνεχής γραμμή υποδεικνύει 1,00 x 10^{-5} M. Για να θεωρηθεί μια απόκριση θετική, θα πρέπει να είναι κάτω από τη γραμμή 8 000 RLU, και σε συγκεντρώσεις κάτω του 1,00 x 10^{-5} M.

Οι συγκεντρώσεις που επισημαίνονται με αστερίσκους στο διάγραμμα της meso-εξεστρόλης υποδεικνύουν βαθμολογίες βιωσιμότητας 2 ή μεγαλύτερες.

Τα αποτελέσματα δοκιμών για τη meso-εξεστρόλη θεωρούνται ανεπαρκή δεδομένα διότι η μόνη απόκριση που είναι κάτω από 8 000 RLU εμφανίζεται στα 1,00 x 10^{-5} M.

41. Οι τιμές των EC_{50} και IC_{50} μπορούν να υπολογίζονται με χρήση συνάρτησης Hill τεσσάρων παραμέτρων [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε πρωτόκολλο αγωνιστών και πρωτόκολλο ανταγωνιστών (7)]. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής υποδεικνύει ότι το σύστημα λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη σειρά δοκιμών θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων της πρώτης σειράς δοκιμών αποτελεί τον βέλτιστο τρόπο να επιβεβαιώνεται ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα (βλ. παράγραφο 19 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ»).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

42. Βλ. παράγραφο 20 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(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): 5 367-5 373.

(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): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al*. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al*. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al*. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Προσάρτημα 4

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑΘΕΡΩΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΘΕΝΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Α ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΩΣ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ERA CALUX

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛΕΠΕ ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Στη δοκιμασία διενεργοποίησης ERα CALUX χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά U2OS για την ανίχνευση της δραστικότητας αγωνιστή ή ανταγωνιστή οιστρογόνων που μεσολαβείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα οιστρογόνων α (hERα). Η μελέτη επικύρωσης της βιοδοκιμασίας σταθερώς διαμολυνθέντων ανθρώπινων κυττάρων ERα CALUX της BioDetection Systems BV (Άμστερνταμ, Κάτω Χώρες) κατέδειξε την καταλληλότητα και την αξιοπιστία της δοκιμασίας για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (1). Η κυτταρική σειρά ERα CALUX εκφράζει μόνο τον ανθρώπινο ERα (2) (3).

2. Η παρούσα δοκιμασία έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση της μεσολαβούμενης από τον hERα διενεργοποίησης μέσω μέτρησης της βιοφωταύγειας ως παραμέτρου. Η χρήση βιοφωταύγειας είναι ευρέως διαδεδομένη στις βιοδοκιμασίες λόγω του υψηλού λόγου σήματος προς θόρυβο (4).

3. Έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων υψηλότερες του 1 μM υπερενεργοποιούν το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης, με αποτέλεσμα φωταύγεια που δεν μεσολαβείται από υποδοχέα (5) (6) (7). Ως εκ τούτου, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή άλλων ανάλογων ενώσεων που μπορούν να υπερενεργοποιούν την έκφραση λουσιφεράσης πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά στο πλαίσιο των δοκιμασιών διενεργοποίησης ER σταθερώς διαμολυνθέντων κυττάρων (βλ. προσάρτημα 2).

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ» και «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER ΤΑ». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η βιοδοκιμασία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της δέσμευσης προσδεμάτων στον ER, την οποία ακολουθεί η μετατόπιση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέματος στον πυρήνα. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέματος δεσμεύει ειδικά στοιχεία απόκρισης του DNA και διενεργοποιεί ένα γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής έκφρασης του ενζύμου λουσιφεράση. Μετά την προσθήκη λουσιφερίνης, του υποστρώματος της λουσιφεράσης, η λουσιφερίνη μετασχηματίζεται σε βιοφωταυγές προϊόν. Το φως που προκύπτει μπορεί να ανιχνευτεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά εύκολα με χρήση λουμινόμετρου.

6. Το σύστημα δοκιμής χρησιμοποιεί σταθερώς διαμολυνθέντα κύτταρα ERα CALUX. Τα κύτταρα ERα CALUX προήλθαν από την κυτταρική σειρά U2OS οστεοβλαστικού οστεοσαρκώματος του ανθρώπου. Τα ανθρώπινα κύτταρα U2OS διαμολύνθηκαν σταθερά με 3xHRE-TATA-Luc και pSG5-neo-hERα, με χρήση της μεθόδου συγκατακρήμνισης με φωσφορικό ασβέστιο. Η κυτταρική σειρά U2OS προτιμήθηκε ως η βέλτιστη επιλογή για χρήση ως κυτταρική σειρά γονιδίου αναφοράς που αποκρίνεται στα οιστρογόνα (και σε άλλες στεροειδείς ορμόνες), καθώς παρατηρήθηκε ότι εμφανίζει περιορισμένη ή καθόλου ενδογενή δραστικότητα υποδοχέων. Η απουσία ενδογενών υποδοχέων αξιολογήθηκε με χρήση μόνο πλασμιδίων γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης, ενώ δεν παρατηρείται καθόλου δραστικότητα μετά την προσθήκη προσδεμάτων υποδοχέων. Επιπλέον, η εν λόγω κυτταρική σειρά υποστήριζε ισχυρές μεσολαβούμενες από ορμόνες αποκρίσεις όταν εισάγονταν παροδικά σύστοιχοι υποδοχείς (2) (3) (8).

7. Οι δοκιμές χημικών ουσιών για οιστρογόνο ή αντιοιστρογόνο δραστικότητα με χρήση της κυτταρικής σειράς ERα CALUX περιλαμβάνουν μια σειρά δοκιμών προδιαλογής και σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, προσδιορίζεται η διαλυτότητα, η κυτταροτοξικότητα και ένα επεξεργασμένο φάσμα συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για ολοκληρωμένες δοκιμές. Στη διάρκεια των σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών, τα επεξεργασμένα φάσματα συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ελέγχονται στο πλαίσιο των βιοδοκιμασιών ERα CALUX, ενώ, στη συνέχεια, ακολουθεί η ταξινόμηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως προς την αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση.

8. Τα κριτήρια για την ερμηνεία των δεδομένων περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 59. Εν συντομία, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται θετική ως προς την αγωνιστική δράση εφόσον τουλάχιστον δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις της εμφανίζουν απόκριση ίση ή υψηλότερη από το 10 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς 17β-οιστραδιόλη (PC_{10}). Μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται θετική ως προς την ανταγωνιστική δράση εφόσον τουλάχιστον δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις της εμφανίζουν απόκριση ίση ή χαμηλότερη από το 80 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς ταμοξιφαίνη (PC_{80}).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυτταρικές σειρές

9. Για τη δοκιμασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η σταθερώς διαμολυνθείσα κυτταρική σειρά ERα CALUX U2OS. Η κυτταρική σειρά μπορεί να ληφθεί από την BioDetection Systems BV (Άμστερνταμ, Κάτω Χώρες), μέσω σύναψης συμφωνίας αδείας τεχνικής συνδρομής.

10. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κυτταρικές σειρές που είναι ελεύθερες μυκοπλάσματος. Οι χρησιμοποιούμενες παρτίδες κυττάρων θα πρέπει είτε να είναι πιστοποιημένα αρνητικές ως προς τη μόλυνση από μυκόπλασμα είτε να εξετάζονται για παρουσία μυκοπλάσματος πριν τη χρήση. Για την ευαίσθητη ανίχνευση μόλυνσης από μυκόπλασμα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) (9).

Σταθερότητα της κυτταρικής σειράς

11. Για τη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητάς τους, τα κύτταρα CALUX θα πρέπει να φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (-80°C). Μετά την απόψυξη των κυττάρων για την έναρξη νέας καλλιέργειας, τα κύτταρα θα πρέπει να ανακαλλιεργούνται τουλάχιστον δύο φορές προτού χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της δραστικότητας αγωνιστή και ανταγωνιστή οιστρογόνου. Τα κύτταρα δεν θα πρέπει να ανακαλλιεργούνται περισσότερες από 30 φορές.

12. Προκειμένου να διασφαλίζεται η παρακολούθηση της σταθερότητας της κυτταρικής σειράς με την πάροδο του χρόνου, θα πρέπει να επαληθεύεται η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής αγωνιστικής και ανταγωνιστικής δράσης, μέσω της αξιολόγησης της EC_{50} ή της IC_{50} του προτύπου αναφοράς. Επιπλέον, θα πρέπει να παρακολουθείται η σχετική επαγωγή του δείγματος θετικού μάρτυρα (PC) και του δείγματος αρνητικού μάρτυρα (NC). Τα αποτελέσματα θα πρέπει να συμμορφώνονται με τα κριτήρια αποδοχής για την αγωνιστική (πίνακας 3Γ) ή την ανταγωνιστική (πίνακας 4Γ) βιοδοκιμασία ERα CALUX. Τα πρότυπα αναφοράς, οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες παρατίθενται στους πίνακες 1 και 2 για την αγωνιστική και την ανταγωνιστική δράση αντίστοιχα.

Συνθήκες καλλιέργειας και επίστρωσης κυττάρων

13. Τα κύτταρα U2OS θα πρέπει να καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο [θρεπτικό μέσο DMEM/F12 (1:1) με ερυθρό φαινόλης ως δείκτη pH, συμπληρούμενο με βόειο εμβρυϊκό ορό (7,5 %), μη απαραίτητα αμινοξέα (1 %), 10 μονάδες/ml πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης και γενετισίνης (G-418) ως δείκτη επιλογής]. Τα κύτταρα θα πρέπει να τοποθετούνται σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2) σε θερμοκρασία 37°C και υγρασία 100 %. Όταν επιτευχθεί συρροή κυττάρων 85-95 %, τα κύτταρα θα πρέπει είτε να ανακαλλιεργούνται είτε να προετοιμάζονται για εμβολιασμό σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων. Στην τελευταία περίπτωση, τα κύτταρα θα πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου με πυκνότητα $1x10^5$ κύτταρα/ml σε θρεπτικό μέσο δοκιμασίας ελεύθερο οιστρογόνων (DMEM/F12 (1:1) χωρίς ερυθρό φαινόλης, συμπληρωμένο με βόειο εμβρυϊκό ορό που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με επιχρισμένο με δεξτράνη ενεργό άνθρακα (5 % κ.ό.), μη απαραίτητα αμινοξέα (1 % κ.ό.), 10 μονάδες/ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης), και να επιστρώνονται στις κοιλότητες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (100 μl ομογενοποιημένου κυτταρικού εναιωρήματος). Τα κύτταρα θα πρέπει να προεπωάζονται σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2, 37°C, 100 % υγρασία) επί 24 ώρες πριν από την έκθεση. Ο πλαστικός εξοπλισμός θα πρέπει να ελεύθερος οιστρογόνων.

Κριτήρια αποδοχής

14. Η αγωνιστική και ανταγωνιστική δράση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ελέγχεται σε σειρές δοκιμών. Μια σειρά δοκιμών περιλαμβάνει έως 6 τρυβλία μικροτιτλοδότησης. Κάθε σειρά δοκιμών περιλαμβάνει τουλάχιστον 1 πλήρη σειρά αραιώσεων ενός προτύπου αναφοράς, ενός δείγματος θετικού μάρτυρα, ενός δείγματος αρνητικού μάρτυρα και μαρτύρων με διαλύτη. Στα σχήματα 1 και 2 παρατίθεται η διάταξη τρυβλίου για τις σειρές δοκιμών αγωνιστικής και ανταγωνιστικής δράσης.

15. Κάθε αραίωση των προτύπων αναφοράς, των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, όλων των μαρτύρων με διαλύτη, και των θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να αναλύεται εις τριπλούν. Καθεμιά από τις τριπλές αναλύσεις θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Α και στον πίνακα 4Α.

16. Στο πρώτο τρυβλίο κάθε σειράς δοκιμών μετράται μια πλήρης σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς (17β-οιστραδιόλη για την αγωνιστική δράση, ταμοξιφαίνη για την ανταγωνιστική δράση). Για να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των υπόλοιπων 5 τρυβλίων μικροτιτλοδότησης με το πρώτο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης που περιέχει την πλήρη καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης του προτύπου αναφοράς, όλα τα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν 3 δείγματα μάρτυρες: τον μάρτυρα με διαλύτη, τη μέγιστη συγκέντρωση του ελεγχθέντος προτύπου αναφοράς, και την κατά προσέγγιση συγκέντρωση EC_{50} (αγωνιστική δράση) ή IC_{50} (ανταγωνιστική δράση) του προτύπου αναφοράς. Ο λόγος των μέσων δειγμάτων μαρτύρων στο πρώτο τρυβλίο και των υπόλοιπων 5 τρυβλίων θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

17. Για καθένα από τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης μιας σειράς δοκιμών, υπολογίζεται ο συντελεστής z (10). Ο συντελεστής z θα πρέπει να υπολογίζεται με χρήση των αποκρίσεων στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς. Ένα τρυβλίο μικροτιτλοδότησης θεωρείται έγκυρο εφόσον συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις που αναφέρονται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

18. Το πρότυπο αναφοράς θα πρέπει να εμφανίζει σιγμοειδή καμπύλη δόσης-απόκρισης. Η EC_{50} ή η IC_{50} που προκύπτει από την απόκριση της σειράς αραιώσεων του προτύπου αναφοράς θα πρέπει να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

19. Κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα δείγμα θετικού μάρτυρα και ένα δείγμα αρνητικού μάρτυρα. Η υπολογισθείσα σχετική επαγωγή αμφότερων των δειγμάτων θετικού και αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) και τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

20. Στη διάρκεια όλων των μετρήσεων, ο συντελεστής επαγωγής της υψηλότερης συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς θα πρέπει να μετράται μέσω διαίρεσης της μέσης απόκρισης σε σχετικές μονάδες φωτός (RLU) του υψηλότερου προτύπου αναφοράς 17β-οιστραδιόλης διά της μέσης απόκρισης RLU μάρτυρα με διαλύτη αναφοράς. Ο συντελεστής επαγωγής θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις ελάχιστες απαιτήσεις για την πολλαπλάσια επαγωγή που παρατίθενται στον πίνακα 3Γ (αγωνιστική δράση) ή τον πίνακα 4Γ (ανταγωνιστική δράση).

21. Μόνο τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης που πληρούν όλα τα προαναφερθέντα κριτήρια αποδοχής θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

22. Τα κριτήρια αποδοχής εφαρμόζονται σε αμφότερες τις σειρές δοκιμών προδιαλογής και τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών.

Πίνακας 1

Συγκεντρώσεις προτύπου αναφοράς, θετικού μάρτυρα (PC) και αρνητικού μάρτυρα (NC) για τη βιοδοκιμασία CALUX αγωνιστικής δράσης

	Ουσία	Αριθμός CAS	Εύρος δοκιμής (M)
Πρότυπο αναφοράς	17β-οιστραδιόλη	50-28-2	$1*10^{-13} – 1*10^{-10}$
Θετικός μάρτυρας (PC)	17α-μεθυλοτεστοστερόνη	58-18-4	$3*10^{-6}$
Αρνητικός μάρτυρας (NC):	κορτικοστερόνη	50-22-6	$1*10^{-8}$

Πίνακας 2

Συγκεντρώσεις προτύπου αναφοράς, θετικού μάρτυρα (PC) και αρνητικού μάρτυρα (NC) για τη βιοδοκιμασία CALUX ανταγωνιστικής δράσης

	Ουσία	Αριθμός CAS	Εύρος δοκιμής (M)
Πρότυπο αναφοράς	ταμοξιφαίνη	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-5}$
Θετικός μάρτυρας (PC)	4-υδροξυταμοξιφαίνη	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Αρνητικός μάρτυρας (NC):	ρεσβερατρόλη	501-36-0	$1*10^{-5}$

Πίνακας 3

Κριτήρια αποδοχής για τη βιοδοκιμασία ERα CALUX αγωνιστικής δράσης

	Α - μεμονωμένα δείγματα σε τρυβλίο	**Κριτήριο**
1	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων (για NC, PC, κάθε αραίωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και το πρότυπο αναφοράς, εκτός του C0)	< 15 %
2	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων [για τους μάρτυρες με διαλύτη προτύπου αναφοράς και τους μάρτυρες με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (C0, SC)]	< 30 %
3	Μέγιστη διαρροή LDH, ως μέτρο κυτταροτοξικότητας	< 120 %
	Β - εντός μεμονωμένου τρυβλίου μικροτιτλοδότησης	
4	Λόγος του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς (C0, τρυβλίο 1) και του μάρτυρα με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (SC, τρυβλία 2 έως x)	0,5 έως 2,0
5	Λόγος της κατά προσέγγιση EC50 και των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στο τρυβλίο 1 και της κατά προσέγγιση EC50 και των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στα τρυβλία 2 έως x (C4, C8)	0,70 έως 1,30
6	Συντελεστής z για κάθε τρυβλίο	>0,6
	Γ - σε μεμονωμένη σειρά αναλύσεων (όλα τα τρυβλία σε μεμονωμένη σειρά)	
7	Σιγμοειδής καμπύλη προτύπου αναφοράς	Ναι (17β-οιστραδιόλη)
8	Πρότυπο αναφοράς εύρους EC50 17β-οιστραδιόλη	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Ελάχιστη πολλαπλάσια επαγωγή της υψηλότερης συγκέντρωσης 17β-οιστραδιόλης, σε σχέση με τον μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς	5
10	Σχετική επαγωγή (%) θετικού μάρτυρα	> 30 %
11	Σχετική επαγωγή (%) αρνητικού μάρτυρα	< 10 %

PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, SC: μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας, C0: μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς, SD: τυπική απόκλιση, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση

Πίνακας 4

Κριτήρια αποδοχής για τη βιοδοκιμασία ERα CALUX αγωνιστικής δράσης

	Α - μεμονωμένα δείγματα σε τρυβλίο	**Κριτήριο**
1	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων [για NC, PC, κάθε αραίωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και το πρότυπο αναφοράς, μάρτυρα με διαλύτη (C0)]	< 15 %
2	Μέγιστο %SD τριπλών κοιλοτήτων [για μάρτυρα με φορέα (VC) και υψηλότερη συγκέντρωση προτύπου αναφοράς (C8)]	< 30 %
3	Μέγιστη διαρροή LDH, ως μέτρο κυτταροτοξικότητας	< 120 %
	Β - εντός μεμονωμένου τρυβλίου μικροτιτλοδότησης	
4	Λόγος του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς (C0, τρυβλίο 1) και του μάρτυρα με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (SC, τρυβλία 2 έως x)	0,70 έως 1,30
5	Λόγος των κατά προσέγγιση συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς IC50 τρυβλίο 1 και των κατά προσέγγιση συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς IC50 στα τρυβλία 2 έως x (C4)	0,70 έως 1,30
6	Λόγος των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στο τρυβλίο 1 και των υψηλότερων συγκεντρώσεων προτύπου αναφοράς στα τρυβλία 2 έως x (C8)	0,50 έως 2,0
7	Συντελεστής z για κάθε τρυβλίο	>0,6
	Γ - σε μεμονωμένη σειρά αναλύσεων (όλα τα τρυβλία σε μεμονωμένη σειρά)	
8	Σιγμοειδής καμπύλη προτύπου αναφοράς	Ναι (ταμοξιφαίνη)
9	Πρότυπο αναφοράς εύρους IC50 (ταμοξιφαίνη)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Ελάχιστη πολλαπλάσια επαγωγή του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς, σε σχέση με την υψηλότερη συγκέντρωση ταμοξιφαίνης	2.5
11	Σχετική επαγωγή (%) θετικού μάρτυρα	< 70 %
12	Σχετική επαγωγή (%) αρνητικού μάρτυρα	>85 %

PC: θετικός μάρτυρας, NC: αρνητικός μάρτυρας, VC: μάρτυρας με φορέα (μάρτυρας με διαλύτη χωρίς καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών), SC: μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας, C0: μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς, SD: τυπική απόκλιση, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα, πρότυπα αναφοράς, θετικοί μάρτυρες, αρνητικοί μάρτυρες

23. Τόσο για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής όσο και για τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο ίδιος μάρτυρας με διαλύτη/φορέα, πρότυπα αναφοράς, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια συγκέντρωση προτύπων αναφοράς, θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Μάρτυρας με διαλύτη

24. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να ελέγχεται ως μάρτυρας με διαλύτη. Ως φορέας κατά την επικύρωση της βιοδοκιμασίας ERα CALUX χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, 1 % κ.ό., CASRN 67-68-5). Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης άλλος από το DMSO, όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται στον ίδιο φορέα. Επισημαίνεται ότι ο μάρτυρας με διαλύτη για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης περιέχει καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη (κατά προσέγγιση συγκέντρωση EC_{50}). Για τον έλεγχο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης, θα πρέπει να παρασκευάζεται και να ελέγχεται μάρτυρας με φορέα.

Μάρτυρας με φορέα (ανταγωνιστική δράση)

25. Για τις δοκιμές ανταγωνιστικής δράσης, το θρεπτικό μέσο της δοκιμασίας συμπληρώνεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη (κατά προσέγγιση συγκέντρωση EC_{50}). Για τον έλεγχο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που θα ελεγχθούν ως προς την ανταγωνιστική δράση, θα πρέπει να παρασκευάζεται καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη. Το εν λόγω δείγμα μάρτυρα υποδεικνύεται ως ο μάρτυρας με φορέα. Ως φορέας κατά την επικύρωση της βιοδοκιμασίας ERα CALUX χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, 1 % κ.ό., CASRN 67-68-5). Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης άλλος από το DMSO, όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται στον ίδιο φορέα.

Πρότυπα αναφοράς

26. Το πρότυπο αναφοράς αγωνιστικής δράσης είναι η 17β-οιστραδιόλη (πίνακας 1). Τα πρότυπα αναφοράς φέρονται σε σειρά αραιώσεων οκτώ συγκεντρώσεων 17β-οιστραδιόλης ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Το πρότυπο αναφοράς αγωνιστικής δράσης είναι η ταμοξιφαίνη (πίνακας 2). Τα πρότυπα αναφοράς φέρονται σε σειρά αραιώσεων οκτώ συγκεντρώσεων ταμοξιφαίνης ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Καθεμία εκ των συγκεντρώσεων του προτύπου αναφοράς ανταγωνιστικής δράσης συνεπωάζεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M).

Θετικός μάρτυρας

28. Ο θετικός μάρτυρας για τις μελέτες αγωνιστικής δράσης είναι η 17α-μεθυλοτεστοστερόνη (πίνακας 1).

29. Ο θετικός μάρτυρας για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης είναι η 4-υδροξυταμοξιφαίνη (πίνακας 2). Ο θετικός μάρτυρας ανταγωνιστικής δράσης συνεπωάζεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M).

Αρνητικός μάρτυρας

30. Ο αρνητικός μάρτυρας για τις μελέτες αγωνιστικής δράσης είναι η κορτικοστερόνη (πίνακας 1).

31. Ο αρνητικός μάρτυρας για τις μελέτες ανταγωνιστικής δράσης είναι η ρεσβερατρόλη (πίνακας 2). Ο αρνητικός μάρτυρας ανταγωνιστικής δράσης συνεπωάζεται με καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M).

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (βλ. παράγραφο 14 και πίνακες 3 και 4 στην ενότητα «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA» της παρούσας μεθόδου δοκιμών)

Φορέας

32. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να διαλύει πλήρως την υπό δοκιμή χημική ουσία και θα πρέπει να αναμειγνύεται με το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας. Κατάλληλοι διαλύτες είναι το DMSO, το νερό και η αιθανόλη (καθαρότητας 95 % έως 100 %). Σε περίπτωση που ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMSO, η μέγιστη συγκέντρωση του DMSO κατά την επώαση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 % κ.ό. Πριν από τη χρήση, ο διαλύτης θα πρέπει να ελέγχεται προκειμένου να διαπιστώνεται ότι δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν παρεμποδίζει τις επιδόσεις της δοκιμασίας.

Προετοιμασία των προτύπων αναφοράς, των θετικών μαρτύρων, των αρνητικών μαρτύρων και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών

33. Τα πρότυπα αναφοράς, οι θετικοί μάρτυρες, οι αρνητικοί μάρτυρες και οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε 100 % DMSO (ή σε κατάλληλο διαλύτη). Στη συνέχεια παρασκευάζονται κατάλληλες (διαδοχικές) αραιώσεις στον ίδιο διαλύτη. Πριν από τη διάλυση, όλες οι ουσίες θα πρέπει να αφήνονται να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρόσφατα παρασκευασθέντα διαλύματα αποθέματος προτύπων αναφοράς, θετικών μαρτύρων, αρνητικών μαρτύρων και υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν θα πρέπει να περιέχουν εμφανές ίζημα ή θολερότητα. Τα αποθέματα προτύπων αναφοράς και μαρτύρων μπορούν να παρασκευάζονται μαζικά. Πριν από κάθε πείραμα, θα πρέπει να εξασφαλίζεται η ύπαρξη πρόσφατα παρασκευασθέντων διαλυμάτων αποθέματος των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι τελικές αραιώσεις προτύπων αναφοράς, θετικών μαρτύρων, αρνητικών μαρτύρων και υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα θα πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα και να χρησιμοποιούνται εντός 24 ωρών από την παρασκευή τους.

Διαλυτότητα, κυτταροτοξικότητα και προσδιορισμός εύρους

34. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, προσδιορίζεται η διαλυτότητα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στον επιλεγμένο διαλύτη. Παρασκευάζεται μέγιστη συγκέντρωση αποθέματος 0,1 M. Σε περίπτωση που η συγκεκριμένη συγκέντρωση παρουσιάζει προβλήματα διαλυτότητας, θα πρέπει να παρασκευάζονται διαλύματα μικρότερης συγκέντρωσης μέχρις ότου διαλυθούν πλήρως οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, ελέγχονται διαδοχικές αραιώσεις 1:10 της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμασίας για τις δοκιμές αγωνιστών ή ανταγωνιστών είναι 1 mM. Μετά την προδιαλογή, υπολογίζεται ένα κατάλληλο επεξεργασμένο εύρος συγκεντρώσεων για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, το οποίο θα πρέπει να ελέγχεται κατά τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται για τις ολοκληρωμένες δοκιμές θα πρέπει να είναι 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x και 3000x.

35. Στο πρωτόκολλο δοκιμασίας αγωνιστών και ανταγωνιστών περιλαμβάνονται δοκιμές κυτταροτοξικότητας (11). Οι δοκιμές κυτταροτοξικότητας είναι ενσωματωμένες τόσο στη σειρά δοκιμών προδιαλογής όσο και στις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας κατά την επικύρωση της βιοδοκιμασίας ERα CALUX ήταν η δοκιμή διαρροής γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), σε συνδυασμό με την ποιοτική οπτική επιθεώρηση των κυττάρων (βλ. προσάρτημα 4.1) μετά από έκθεση στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. Ωστόσο, για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ποσοτικές μέθοδοι [π.χ. η χρωματομετρική δοκιμασία με βάση το τετραζόλιο (MTT) ή η βιοδοκιμασία κυτταροτοξικότητας CALUX]. Σε γενικές γραμμές, οι συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικών ουσιών που εμφανίζουν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μεγαλύτερη του 20 % θεωρούνται κυτταροτοξικές και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση δεδομένων. Όσον αφορά τη δοκιμασία διαρροής LDH, η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θεωρείται κυτταροτοξική όταν το ποσοστό της διαρροής LDH υπερβαίνει το 120 %.

Έκθεση σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες και οργάνωση τρυβλίου της δοκιμασίας

36. Μετά από θρυψινισμό μιας φιάλης καλλιέργειας με πλήρη συρροή κυττάρων, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε $1x10^5$ κύτταρα/ml σε ελεύθερο οιστρογόνων θρεπτικό μέσο δοκιμασίας. Στις εσωτερικές κοιλότητες τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων επιστρώνονται 100 μl επαναιωρηθέντων κυττάρων. Οι εξωτερικές κοιλότητες πληρούνται με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS) (βλ. σχήματα 1 και 2). Τα επιστρωμένα κύτταρα προεπωάζονται επί 24 ώρες σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % υγρασία).

37. Μετά την προεπώαση, τα τρυβλία επιθεωρούνται οπτικά για τυχόν κυτταροτοξικότητα (βλ. προσάρτημα 4.1) ή μόλυνση και ως προς τη συρροή. Στις δοκιμές χρησιμοποιούνται μόνο τα τρυβλία που δεν εμφανίζουν καθόλου ορατή κυτταροτοξικότητα ή μόλυνση και παρουσιάζουν συρροή σε ποσοστό τουλάχιστον 85 %. Το θρεπτικό μέσο αφαιρείται προσεκτικά από τις εσωτερικές κοιλότητες και αντικαθίσταται από 200 μl ελεύθερου οιστρογόνων θρεπτικού μέσου δοκιμασίας που περιέχει κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις των προτύπων αναφοράς, των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, των θετικών μαρτύρων,των

αρνητικών μαρτύρων και των μαρτύρων με διαλύτη (πίνακας 5: μελέτες αγωνιστών· πίνακας 6: μελέτες ανταγωνιστών). Όλα τα πρότυπα αναφοράς, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες, οι θετικοί μάρτυρες, οι αρνητικοί μάρτυρες και οι μάρτυρες με διαλύτη ελέγχονται εις τριπλούν. Στο σχήμα 1 παρέχεται η διάταξη του τρυβλίου για τις δοκιμές αγωνιστών. Στο σχήμα 2 παρέχεται η διάταξη του τρυβλίου για τις δοκιμές ανταγωνιστών. Η διάταξη του τρυβλίου για τις δοκιμές προδιαλογής είναι πανομοιότυπη με την αντίστοιχη διάταξη για τις ολοκληρωμένες δοκιμές. Όσον αφορά τις δοκιμές ανταγωνιστών, όλες οι εσωτερικές κοιλότητες, εκτός των κοιλοτήτων μάρτυρα με φορέα (VC), περιέχουν επίσης καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3*10^{-12}$ M). Επισημαίνεται ότι τα πρότυπα αναφοράς C8 και C4 θα πρέπει να προστίθενται σε κάθε τρυβλίο TC.

38. Μετά την έκθεση των κυττάρων σε όλες τις χημικές ουσίες, τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων θα πρέπει να επωάζονται για 24 ακόμη ώρες σε επωαστήρα CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % υγρασία).

Σχήμα 1

Διάταξη των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων για προδιαλογή και αξιολόγηση της αγωνιστικής δράσης

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
Γ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
Δ		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	
ΣΤ		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
Z		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Επακόλουθα τρυβλία

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Γ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Δ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
ΣΤ		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
Z		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = διαλύτης προτύπου αναφοράς.

C(1-8) = σειρά αραιώσεων (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) προτύπου αναφοράς.

PC = θετικός μάρτυρας.

NC = αρνητικός μάρτυρας.

TCx-(1-8) = αραιώσεις (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και την αξιολόγηση της αγωνιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας x.

SC = μάρτυρας με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ιδανικά ο ίδιος διαλύτης με το C0, αλλά πιθανώς από άλλη παρτίδα).

Σκιασμένα κελιά: = Εξωτερικές κοιλότητες, με έως 200 μl PBS.

Σχήμα 2

Διάταξη τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων για την προδιαλογή ανταγωνιστικής δράσης και την αξιολόγηση της ανταγωνιστικής επίδρασης

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
Γ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
Δ		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
ΣΤ		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
Z		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
H												

Επακόλουθα τρυβλία

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Γ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
Δ		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
ΣΤ		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
Z		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = διαλύτης προτύπου αναφοράς.

C(1-8) = σειρά αραιώσεων (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) προτύπου αναφοράς.

NC = αρνητικός μάρτυρας.

PC = θετικός μάρτυρας.

TCx-(1-8) = αραιώσεις (1-8, χαμηλές προς υψηλές συγκεντρώσεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και την αξιολόγηση της αγωνιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας x.

SC = μάρτυρας με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ιδανικά ο ίδιος διαλύτης με το C0, αλλά πιθανώς από άλλη παρτίδα).

VC = μάρτυρας με φορέα (μάρτυρας με διαλύτη χωρίς καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη).

Σκιασμένα κελιά: = Εξωτερικές κοιλότητες, με έως 200 μl PBS.

Σημείωση: όλες οι εσωτερικές κοιλότητες, εκτός των κοιλοτήτων μάρτυρα με φορέα (VC), περιέχουν επίσης καθορισμένη συγκέντρωση προτύπου αναφοράς αγωνιστών 17β-οιστραδιόλη ($3{,}0*10^{-12}$ M)

Μέτρηση της φωταύγειας

39. Η μέτρηση της φωταύγειας περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο δοκιμασίας αγωνιστών και ανταγωνιστών (10). Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να αφαιρείται από τις κοιλότητες και τα κύτταρα θα πρέπει να λύονται μετά από 24 ώρες επώασης προκειμένου να ανοιχτεί η κυτταρική μεμβράνη και να μετρηθεί η δραστικότητα λουσιφεράσης.

40. Για τη διαδικασία μέτρησης της φωταύγειας απαιτείται λουμινόμετρο με 2 εγχυτές. Η αντίδραση της λουσιφεράσης εκκινείται μέσω έγχυσης του υποστρώματος λουσιφερίνη. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 0,2 M NaOH. Η αντίδραση διακόπτεται για την αποτροπή της μεταφοράς φωταύγειας από μία κοιλότητα σε άλλη.

41. Το φως που εκπέμπεται από κάθε κοιλότητα εκφράζεται υπό μορφή σχετικών μονάδων φωτός (RLU) ανά κοιλότητα.

Σειρά δοκιμών προδιαλογής

42. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης προδιαλογής χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ενός επεξεργασμένου εύρους συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων δοκιμών. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανάλυσης προδιαλογής και ο προσδιορισμός του επεξεργασμένου εύρους των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων δοκιμών περιγράφονται εις βάθος στο πρωτόκολλο δοκιμασίας αγωνιστών και ανταγωνιστών (10). Εδώ δίνεται μια συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών προσδιορισμού του εύρους συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη διεξαγωγή δοκιμών αγωνιστών και ανταγωνιστών. Για καθοδήγηση σχετικά με τον σχεδιασμό των διαδοχικών αραιώσεων, βλέπε πίνακες 5 και 6.

Επιλογή συγκεντρώσεων για την αξιολόγηση των αγωνιστικών επιδράσεων

43. Κατά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται με χρήση των διαδοχικών αραιώσεων που φαίνονται στους πίνακες 5 (αγωνιστική δράση) και 6 (ανταγωνιστική δράση). Όλες οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε τριπλές κοιλότητες, σύμφωνα με τη διάταξη τρυβλίου που φαίνεται στο σχήμα 1 (αγωνιστική δράση) ή 2 (ανταγωνιστική δράση).

44. Μόνο τα αποτελέσματα ανάλυσης που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (πίνακας 3) θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Σε περίπτωση που ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης σε μια σειρά ανάλυσης δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, τα αντίστοιχα τρυβλία μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Σε περίπτωση που το πρώτο τρυβλίο που περιέχει την πλήρη σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, ολόκληρη η σειρά δοκιμών (6 τρυβλία) θα πρέπει να αναλύεται εκ νέου.

45. Τα αρχικά εύρη συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να προσαρμόζονται και η σειρά δοκιμών προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται εάν

— παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα. Η διαδικασία προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χαμηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

— κατά την προδιαλογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν εμφανίζεται πλήρης καμπύλη δόσης-απόκρισης, διότι από τις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις προκύπτει μέγιστη επαγωγή. Η σειρά δοκιμών προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

46. Όταν παρατηρείται έγκυρη απόκριση που σχετίζεται με τη δόση, θα πρέπει να επιλέγεται η (χαμηλότερη) συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται μέγιστη επαγωγή χωρίς κυτταροτοξικότητα. Η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα ελεγχθεί στις ολοκληρωμένες δοκιμές θα πρέπει να είναι τριπλάσια της εν λόγω επιλεγμένης συγκέντρωσης.

47. Θα πρέπει να προετοιμάζεται πλήρης, επεξεργασμένη σειρά αραιώσεων με τα στάδια αραίωσης που φαίνονται στον πίνακα 5, ξεκινώντας από την υψηλότερη συγκέντρωση, όπως προσδιορίστηκε ανωτέρω.

48. Υπό δοκιμή χημική ουσία που δεν επάγει αγωνιστική επίδραση θα πρέπει να ελέγχεται στο πλαίσιο των σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών, αρχής γενομένης από την υψηλότερη, μη κυτταροτοξική συγκέντρωση που προσδιορίζεται κατά την προδιαλογή.

Επιλογή συγκεντρώσεων για την αξιολόγηση των ανταγωνιστικών επιδράσεων

49. Μόνο τα αποτελέσματα ανάλυσης που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (πίνακας 4) θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Σε περίπτωση που ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης σε μια σειρά ανάλυσης δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, τα αντίστοιχα τρυβλία μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Σε περίπτωση που το πρώτο τρυβλίο που περιέχει την πλήρη σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, ολόκληρη η σειρά δοκιμών (6 τρυβλία) θα πρέπει να αναλύεται εκ νέου.

50. Τα αρχικά εύρη συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να προσαρμόζονται και η σειρά δοκιμών προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται εάν

— παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα. Η διαδικασία προδιαλογής θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χαμηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

— κατά την προδιαλογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν εμφανίζεται πλήρης καμπύλη δόσης-απόκρισης, διότι από τις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις προκύπτει μέγιστη αναστολή. Η προδιαλογή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

51. Όταν διαπιστώνεται έγκυρη απόκριση που σχετίζεται με τη δόση, θα πρέπει να επιλέγεται η (χαμηλότερη) συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται μέγιστη αναστολή χωρίς κυτταροτοξικότητα. Η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα ελεγχθεί στις ολοκληρωμένες δοκιμές θα πρέπει να είναι τριπλάσια της εν λόγω επιλεγμένης συγκέντρωσης.

52. Θα πρέπει να προετοιμάζεται πλήρης, επεξεργασμένη σειρά αραιώσεων με τα στάδια αραίωσης που φαίνονται στον πίνακα 6, ξεκινώντας από την υψηλότερη συγκέντρωση, όπως προσδιορίστηκε ανωτέρω.

53. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν επάγουν ανταγωνιστικές επιδράσεις θα πρέπει να ελέγχονται στο πλαίσιο των σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών, αρχής γενομένης από την υψηλότερη, μη κυτταροτοξική συγκέντρωση που προσδιορίζεται κατά την προδιαλογή.

Σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών

54. Μετά την επιλογή των επεξεργασμένων ευρών συγκεντρώσεων, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να ελέγχονται ολοκληρωμένα με χρήση των διαδοχικών αραιώσεων που φαίνονται στους πίνακες 5 (αγωνιστική δράση) και 6 (ανταγωνιστική δράση). Όλες οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε τριπλές κοιλότητες, σύμφωνα με τη διάταξη τρυβλίου που φαίνεται στο σχήμα 1 (αγωνιστική δράση) ή 2 (ανταγωνιστική δράση).

55. Μόνο τα αποτελέσματα ανάλυσης που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (πίνακες 3 και 4) θεωρούνται έγκυρα και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόκρισης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Σε περίπτωση που ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης σε μια σειρά ανάλυσης δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, τα αντίστοιχα τρυβλία μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Σε περίπτωση που το πρώτο τρυβλίο που περιέχει την πλήρη σειρά αραιώσεων του προτύπου αναφοράς δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, ολόκληρη η σειρά δοκιμών (6 τρυβλία) θα πρέπει να αναλύεται εκ νέου.

Πίνακας 5

Συγκέντρωση και αραιώσεις των προτύπων αναφοράς, των μαρτύρων και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές αγωνιστών

Πρότυπο αναφοράς 17β-οιστραδιόλη		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		Μάρτυρες	
συγκ. (M)		σειράς δοκιμών προδιαλογής		σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών		συγκ. (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 - υπό δοκιμή χημική ουσία x
PC - θετικός μάρτυρας (17α-μεθυλοτεστοστερόνη)
NC - αρνητικός μάρτυρας (κορτικοστερόνη)
C0 - μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς
SC - μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Πίνακας 6

Συγκέντρωση και αραιώσεις των προτύπων αναφοράς, των μαρτύρων και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ανταγωνιστών

Πρότυπο αναφοράς ταμοξιφαίνη		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		TCx - συγκέντρωση αραίωσης		Μάρτυρες	
συγκ. (M)		σειράς δοκιμών προδιαλογής		σειρών ολοκληρωμένων δοκιμών		συγκ. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Συμπλήρωμα αγωνιστών**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**συγκ. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-οιστραδιόλη	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - υπό δοκιμή χημική ουσία x
PC - θετικός μάρτυρας (4-υδροξυταμοξιφαίνη)
NC - αρνητικός μάρτυρας (ρεσβερατρόλη)
C0 - μάρτυρας με διαλύτη προτύπου αναφοράς
SC - μάρτυρας με διαλύτη υπό δοκιμή χημικής ουσίας
VC - μάρτυρας με φορέα (δεν περιέχει καθορισμένη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς αγωνιστικής δράσης 17β-οιστραδιόλη ($3,0*10^{-12}$ M)

Συλλογή και ανάλυση δεδομένων

56. Μετά τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών, οι EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} και η μέγιστη επαγωγή (TCx_{max}) θα πρέπει να προσδιορίζονται για τη διεξαγωγή δοκιμών αγωνιστικής δράσης. Όσον αφορά τις δοκιμές ανταγωνιστικής δράσης, θα πρέπει να υπολογίζονται οι IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} και η ελάχιστη επαγωγή (TCx_{min}). Στο σχήμα 3 (αγωνιστική δράση) και 4 (ανταγωνιστική δράση) παρέχεται γραφική αναπαράσταση των εν λόγω παραμέτρων. Οι απαιτούμενες παράμετροι υπολογίζονται με βάση τη σχετική επαγωγή κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας [σε σχέση με τη μέγιστη επαγωγή του προτύπου αναφοράς (=100 %)]. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μη γραμμική παλινδρόμηση (μεταβαλλόμενη κλίση, 4 παράμετροι) για την αξιολόγηση των δεδομένων σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$Y = ελάχιστη + \frac{(μέγιστη - ελάχιστη)}{1 + 10(logEC_{50} - X)κλίση\ Hill}$$

όπου:

X = λογάριθμος δόσης ή συγκέντρωσης

Y = απόκριση [σχετική επαγωγή (%)]

μέγιστη = μέγιστη επαγωγή (%)

ελάχιστη = ελάχιστη επαγωγή (%)

$logEC_{50}$ = λογάριθμος συγκέντρωσης στην οποία παρατηρείται το 50 % της μέγιστης απόκρισης

κλίση Hill = συντελεστής κλίσης ή κλίση Hill

57. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα από το λουμινόμετρο, εκφραζόμενα ως σχετικές μονάδες φωτός (RLU), θα πρέπει να μεταφέρονται στο υπολογιστικό φύλλο ανάλυσης δεδομένων που έχει σχεδιαστεί ειδικά για τη σειρά δοκιμών προδιαλογής και τις σειρές ολοκληρωμένων δοκιμών. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής που εμφαίνονται στους πίνακες 3Α και 3Β (αγωνιστική δράση) ή 4Α και 4Β (ανταγωνιστική δράση). Σε περίπτωση που τα ανεπεξέργαστα δεδομένα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής, εκτελούνται τα ακόλουθα στάδια υπολογισμού προκειμένου να προσδιοριστούν οι απαιτούμενες παράμετροι:

Αγωνιστική δράση

— Αφαίρεση της μέσης RLU του μάρτυρα με διαλύτη προτύπου αναφοράς από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των προτύπων αναφοράς.

— Αφαίρεση της μέσης RLU για τον μάρτυρα με διαλύτη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς. Ορισμός της επαγωγής της υψηλότερης συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς σε 100 %.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με την υψηλότερη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς ως 100 %.

— Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση (μεταβαλλόμενη κλίση, 4 παράμετροι).

— Προσδιορισμός των EC_{50} και EC_{10} του προτύπου αναφοράς.

— Προσδιορισμός των EC_{50} και EC_{10} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Προσδιορισμός της μέγιστης σχετικής επαγωγής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC_{max}).

— Προσδιορισμός των PC_{10} και PC_{50} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να μην είναι πάντοτε εφικτή η επίτευξη πλήρους καμπύλης δόσης-απόκρισης λόγω, π.χ., προβλημάτων κυτταροτοξικότητας ή διαλυτότητας. Συνεπώς, οι EC_{50}, EC_{10} και PC_{50} δεν μπορούν να προσδιοριστούν. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να προσδιορίζονται μόνο οι PC_{10} και TC_{max}.

Ανταγωνιστική δράση

— Αφαίρεση της μέσης RLU της υψηλότερης συγκέντρωσης προτύπου αναφοράς από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των προτύπων αναφοράς.

— Αφαίρεση της μέσης RLU της υψηλότερης συγκέντρωσης προτύπου αναφοράς από καθένα από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα ανάλυσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς. Ορισμός της επαγωγής της χαμηλότερης συγκέντρωσης του προτύπου αναφοράς σε 100 %.

— Υπολογισμός της σχετικής επαγωγής κάθε συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση του προτύπου αναφοράς ως 100 %.

— Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση (μεταβαλλόμενη κλίση, 4 παράμετροι).

— Προσδιορισμός των IC_{50} και IC_{20} του προτύπου αναφοράς.

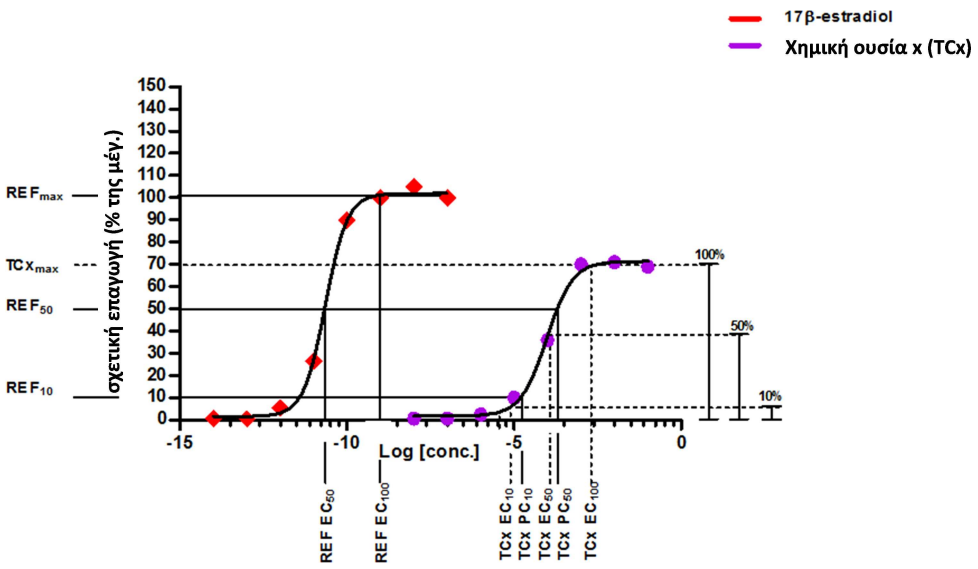
— Προσδιορισμός των IC_{50} και IC_{20} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

— Προσδιορισμός της ελάχιστης σχετικής επαγωγής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC_{min}).

— Προσδιορισμός των PC_{80} και PC_{50} των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Σχήμα 3

Επισκόπηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στη δοκιμασία αγωνιστών



EC_{10} = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 10 % της μέγιστης απόκρισής της.

EC_{50} = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 50 % της μέγιστης απόκρισής της.

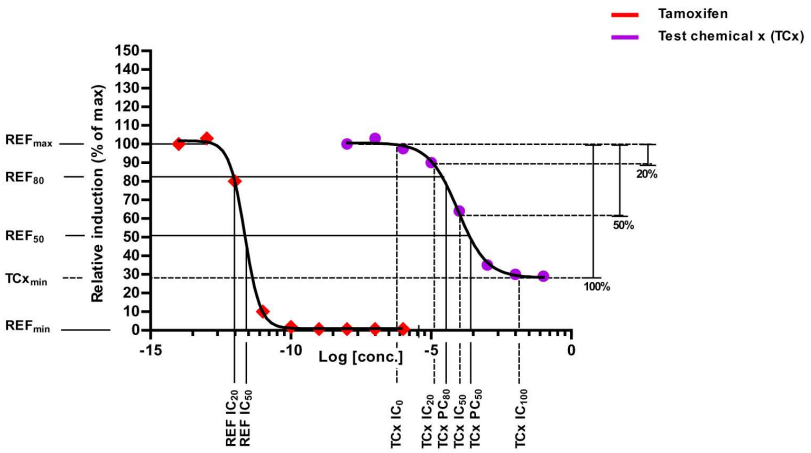
PC_{10} =συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την EC_{10} του προτύπου αναφοράς.

PC_{50} =συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την EC_{50} του προτύπου αναφοράς.

TCx_{max} = μέγιστη σχετική επαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σχήμα 4

Επισκόπηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στη δοκιμασία ανταγωνιστών



IC20 = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 80 % της μέγιστης απόκρισής της (20 % αναστολή).

IC50 = συγκέντρωση ουσίας στην οποία παρατηρείται το 50 % της μέγιστης απόκρισής της (50 % αναστολή).

PC80 = συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την IC20 του προτύπου αναφοράς.

PC50 = συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία η απόκρισή της είναι ίση με την IC50 του προτύπου αναφοράς.

TCxmin = ελάχιστη σχετική επαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να μην είναι πάντοτε εφικτή η επίτευξη πλήρους καμπύλης δόσης-απόκρισης λόγω, π.χ., προβλημάτων κυτταροτοξικότητας ή διαλυτότητας. Συνεπώς, οι IC_{50}, IC_{20} και PC_{50} δεν μπορούν να προσδιοριστούν. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να προσδιορίζονται μόνο οι PC_{20} και TC_{min}.

58. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να βασίζονται σε δύο (ή τρεις) ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που από δύο σειρές δοκιμών προκύπτουν συγκρίσιμα και, ως εκ τούτου, αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Για να είναι αποδεκτά, τα αποτελέσματα θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

— να πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (βλ. κριτήρια αποδοχής, παράγραφοι 14-22),

— να είναι αναπαραγώγιμα.

Κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

59. Για την ερμηνεία των δεδομένων και τη λήψη απόφασης σχετικά με το κατά πόσον μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται θετική ή αρνητική, πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

Αγωνιστική δράση

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **θετική** εφόσον:

1 Η TC_{max} είναι ίση ή υπερβαίνει το 10 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{10}).

2 Τουλάχιστον 2 διαδοχικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή υπερβαίνουν το REF_{10}.

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **αρνητική** εφόσον:

1 Η TC_{max} δεν υπερβαίνει το 10 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{10}).

2 Λιγότερες από 2 συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή υπερβαίνουν το REF_{10}.

Ανταγωνιστική δράση

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **θετική** εφόσον:

1 Η TC_{min} είναι ίση ή χαμηλότερη από το 80 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{80} = 20 % αναστολή).

2 Τουλάχιστον 2 διαδοχικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή χαμηλότερες από το REF_{80}.

Για κάθε σειρά ολοκληρωμένων δοκιμών, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται **αρνητική** εφόσον:

1 Η TC_{min} υπερβαίνει το 80 % της μέγιστης απόκρισης του προτύπου αναφοράς (REF_{80} = 20 % αναστολή).

2 Λιγότερες από 2 συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι ίσες ή χαμηλότερες από το REF_{80}.

60. Για την εκτίμηση του δυναμικού θετικής απόκρισης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να αναφέρεται το μέγεθος της επίδρασης (αγωνιστική δράση: TC_{max}, ανταγωνιστική δράση: TC_{min}) και η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η επίδραση (αγωνιστική δράση: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}, ανταγωνιστική δράση: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

61. Βλ. παράγραφο 20 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ER TA»

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

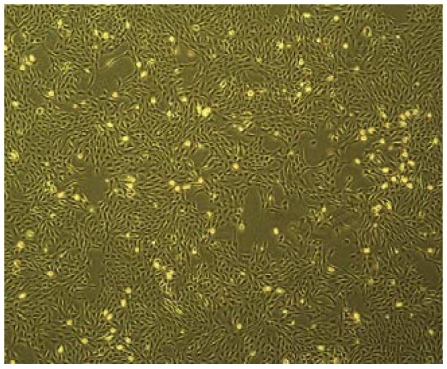
(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Προσάρτημα 4.1

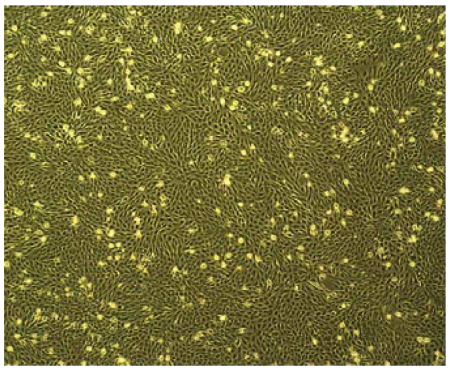
ΟΠΤΙΚΗ ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ



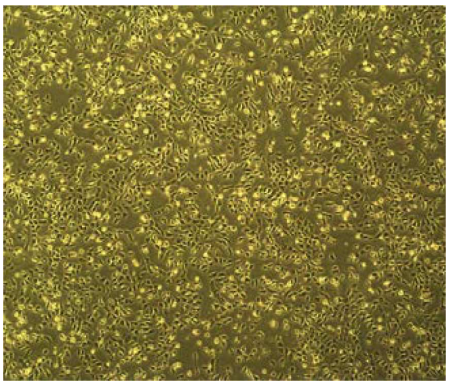
<5 % συρροή. Τα κύτταρα έχουν μόλις εμβολιαστεί. 100 % κυτταρική βιωσιμότητα. Ταξινόμηση: «καμία κυτταροτοξικότητα»



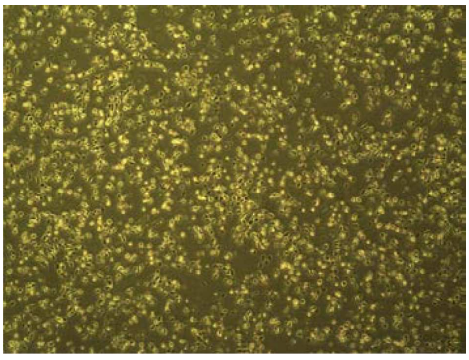
> 85 % συρροή. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα εκτίθενται στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες. > 95 % κυτταρική βιωσιμότητα.
Ταξινόμηση: «καμία κυτταροτοξικότητα»



> 95 % συρροή. Τα κύτταρα είναι πυκνά συμπιεσμένα και αρχίζουν να αναπτύσσονται υπερβολικά. > 95 % κυτταρική βιωσιμότητα.
Ταξινόμηση: «καμία κυτταροτοξικότητα»



< 25 % κυτταρική βιωσιμότητα. Τα κύτταρα αποκολλώνται και η μεταξύ τους επαφή μειώνεται. Τα κύτταρα λαμβάνουν στρογγυλό σχήμα. Ταξινόμηση: «κυτταροτοξικότητα»



< 5 % κυτταρική βιωσιμότητα. Τα κύτταρα αποκολλώνται πλήρως και δεν εφάπτονται καθόλου μεταξύ τους. Τα κύτταρα λαμβάνουν στρογγυλό σχήμα. Ταξινόμηση: «κυτταροτοξικότητα»

Β.67 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΘΥΜΙΔΙΝΟΚΙΝΑΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 490 του ΟΟΣΑ (2016). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται και αναθεωρούνται κατά περιόδους υπό το φως των επιστημονικών εξελίξεων, των μεταβαλλόμενων κανονιστικών αναγκών και της καλής μεταχείρισης των ζώων. Η δοκιμασία λεμφώματος ποντικών (MLA) και η δοκιμή TK6 με χρήση του γενετικού τόπου της θυμιδινοκινάσης (TK) περιλαμβάνονταν αρχικά στη μέθοδο δοκιμών Β.17. Αργότερα, η διεθνής ομάδα εργασίας εμπειρογνωμόνων MLA της διεθνούς ημερίδας για τις δοκιμές γονιδιοτοξικότητας (IWGT) ανέπτυξε διεθνώς εναρμονισμένες συστάσεις για κριτήρια αποδοχής δοκιμασιών και την ερμηνεία δεδομένων για την MLA (1)(2)(3)(4)(5), οι οποίες ενσωματώθηκαν στην παρούσα νέα μέθοδο δοκιμών Β.67. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει συνταχθεί για την MLA και, λόγω του ότι χρησιμοποιεί επίσης τον γενετικό τόπο TK, τη δοκιμή TK6. Ενώ η MLA χρησιμοποιείται ευρέως για κανονιστικούς σκοπούς, η χρήση της TK6 είναι πολύ πιο σπάνια. Πρέπει να επισημανθεί ότι παρά την ομοιότητα μεταξύ των παραμέτρων, οι δύο κυτταρικές σειρές δεν μπορούν να υποκαταστήσουν η μία την άλλη και, ως εκ τούτου, στο πλαίσιο κανονιστικών προγραμμάτων μπορεί ευλόγως να προτιμάται η μία εκ των δύο για συγκεκριμένη κανονιστική χρήση. Για παράδειγμα, η επικύρωση της MLA κατέδειξε την καταλληλότητά της για την ανίχνευση όχι μόνο γονιδιακών μεταλλάξεων αλλά και της ικανότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει δομικές χρωμοσωμικές βλάβες. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποτελεί μέρος μιας σειράς μεθόδων δοκιμών γενετικής τοξικολογίας. Ο ΟΟΣΑ έχει συντάξει ένα έγγραφο με συνοπτικές πληροφορίες για τις δοκιμές γενετικής τοξικολογίας και μια επισκόπηση των πρόσφατων αλλαγών που έγιναν στις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών γενετικής τοξικότητας του ΟΟΣΑ (6).

2. Ο σκοπός των *in vitro* δοκιμών γονιδιακής μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών είναι η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στις εν λόγω δοκιμές μετρούν τις εξελικτικές μεταλλάξεις σε γονίδια αναφοράς, συγκεκριμένα στο ενδογενές γονίδιο της θυμιδινοκινάσης (*TK* για τα ανθρώπινα κύτταρα και *Tk* για τα κύτταρα τρωκτικών, καλούμενα αμφότερα *TK* στην παρούσα μέθοδο δοκιμών). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται για χρήση με δύο κυτταρικές σειρές: την κυτταρική σειρά λεμφώματος ποντικού $TK^{+/-}$-3.7.2C L5178Y (γενικά καλούμενη L5178Y) και την ανθρώπινη λεμφοβλαστοειδή κυτταρική σειρά TK6 (γενικά καλούμενη TK6). Παρότι οι δύο κυτταρικές σειρές διαφέρουν λόγω της προέλευσής τους, της κυτταρικής ανάπτυξης, της κατάστασης ως προς το p53 και άλλα σημεία, οι δοκιμές γονιδιακών μεταλλάξεων *TK* μπορούν να διεξάγονται με ανάλογο τρόπο και στους δύο τύπους κυττάρων, όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

3. Η αυτοσωμική και ετερόζυγη φύση του γονιδίου της θυμιδινοκινάσης επιτρέπει την ανίχνευση βιώσιμων αποικιών από κύτταρα που δεν διαθέτουν θυμιδινοκινάση λόγω μετάλλαξης της $TK^{+/-}$ σε $TK^{-/-}$. Η έλλειψη αυτή μπορεί να είναι το αποτέλεσμα γενετικών συμβάντων που επηρεάζουν το γονίδιο *TK*, περιλαμβανομένων των γονιδιακών μεταλλάξεων (σημειακές μεταλλάξεις, μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, μικρές απαλείψεις κ.λπ.) και των χρωμοσωμικών συμβάντων (μεγάλες απαλείψεις, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και μιτωτικός ανασυνδυασμός). Τα τελευταία συμβάντα εκφράζονται ως απώλεια ετεροζυγωτικότητας, η οποία αποτελεί συνήθη γενετική αλλοίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην ανθρώπινη ογκογένεση. Θεωρητικά, η απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος που φέρει το γονίδιο *TK* λόγω εξασθένησης της ατράκτου και/ή μιτωτικού μη διαχωρισμού μπορεί να ανιχνευθεί με την MLA. Πράγματι, ένας συνδυασμός κυτταρογενετικής και μοριακής ανάλυσης καταδεικνύει με σαφήνεια ότι ορισμένα προϊόντα μετάλλαξης TK MLA είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού. Ωστόσο, η προσέγγιση βάρους της απόδειξης δείχνει ότι οι δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης *TK* δεν μπορούν να ανιχνεύσουν αξιόπιστα τις ανευπλοειδογόνες ουσίες όταν εφαρμόζονται τα τυποποιημένα κριτήρια κυτταροτοξικότητας (όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών) και, ως εκ τούτου, είναι ακατάλληλες για την ανίχνευση ανευπλοειδογόνων ουσιών (7)(8)(9).

4. Στις δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης *TK* παράγονται δύο διακριτές φαινοτυπικές κατηγορίες προϊόντων μετάλλαξης *TK*· τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης που αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό με τα ετερόζυγα κύτταρα TK, και τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης που αναπτύσσονται με παρατεταμένους χρόνους διπλασιασμού. Τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα και τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης αναγνωρίζονται ως προϊόντα μετάλλαξης μεγάλων και μικρών αποικιών στην MLA και ως προϊόντα μετάλλαξης πρώιμα και όψιμα εμφανιζόμενων αποικιών στην TK6. Η μοριακή και κυτταρογενετική φύση των προϊόντων μετάλλαξης μικρών και μεγάλων αποικιών MLA έχει μελετηθεί λεπτομερώς (8)(10)(11)(12)(13). Η μοριακή και κυτταρογενετική φύση των πρώιμα εμφανιζόμενων και των όψιμα εμφανιζόμενων προϊόντων μετάλλαξης TK6 έχει επίσης μελετηθεί λεπτομερώς (14)(15)(16)(17). Τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης έχουν υποστεί γενετικές βλάβες που προϋποθέτουν τη θεωρητική ύπαρξη γονιδίου/-ων ρύθμισης της ανάπτυξης εγγύς του γενετικού τόπου *TK*, με αποτέλεσμα παρατεταμένους χρόνους διπλασιασμού και τον σχηματισμό όψιμα εμφανιζόμενων ή μικρών αποικιών (18). Η επαγωγή βραδέως αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης έχει συνδεθεί με χημικές ουσίες που επάγουν μακροσκοπικές δομικές αλλαγές στο χρωμοσωμικό επίπεδο. Τα κύτταρα των οποίων οι βλάβες δεν προϋποθέτουν τα θεωρητικά ρυθμιστικά γονίδια κοντά στον γενετικό τόπο TK αναπτύσσονται με ρυθμούς παρόμοιους με τα γονικά κύτταρα και εξελίσσονται σε φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης. Η επαγωγή κυρίως φυσιολογικώς αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης συνδέεται με χημικές ουσίες που δρουν κυρίως ως μεταλλαξιγόνα σημειακών μεταλλάξεων. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητη η καταμέτρηση και των βραδέως αναπτυσσόμενων και των φυσιολογικώς αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης προκειμένου να ανακτώνται όλα τα προϊόντα μετάλλαξης και να διαπιστώνεται, σε έναν βαθμό, ο τύπος βλαβών (μεταλλαξιγόνα έναντι κλαστογόνων) που επάγει η υπό δοκιμή χημική ουσία (10)(12)(18)(19).

5. Η μέθοδος δοκιμών έχει οργανωθεί κατά τρόπον ώστε να παρέχει γενικές πληροφορίες που εφαρμόζονται τόσο στην MLA όσο και στην TK6, καθώς και εξειδικευμένη καθοδήγηση για τις μεμονωμένες δοκιμές.

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

7. Στις δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτείται εν γένει η χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμείται απόλυτα τις συνθήκες που επικρατούν *in vivo*.

8. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα (δηλ. πιθανή αλληλεπίδραση με το σύστημα δοκιμής) που δεν προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του γενετικού υλικού του κυττάρου· τέτοιες συνθήκες είναι οι μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας, η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (20)(21) και τα υπέρμετρα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (22)(23)(24). Η κυτταροτοξικότητα που υπερβαίνει τα συνιστώμενα μέγιστα επίπεδα κυτταροτοξικότητας, όπως ορίζονται στην παράγραφο 28, θεωρείται υπέρμετρη για την MLA και την TK6. Επιπλέον, θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι ανάλογα θυμιδίνης ή συμπεριφέρονται σαν ανάλογα θυμιδίνης μπορούν να αυξήσουν τη συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης μέσω επιλεκτικής ανάπτυξης των αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης υποβάθρου κατά την αγωγή των κυττάρων και απαιτούν πρόσθετες μεθόδους δοκιμών για την επαρκή αξιολόγησή τους (25).

9. Για τα βιομηχανικά νανοϋλικά, ενδέχεται να χρειάζονται ειδικές προσαρμογές της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι οποίες όμως δεν περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

10. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για τη διεξαγωγή δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει επαρκή αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

11. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη δραστικότητας του ενζύμου θυμιδινοκινάση λόγω μετάλλαξης του *TK*$^{+/-}$ σε *TK*$^{-/-}$ παρουσιάζουν αντοχή στην κυτταροστατική δράση του πυριμιδινικού αναλόγου τριφθοροθυμιδίνη (TFT). Τα κύτταρα με *TK* είναι ευαίσθητα στην TFT, η οποία εμποδίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό και σταματά την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία TFT και να σχηματίζουν ορατές αποικίες, ενώ τα κύτταρα που περιέχουν το ένζυμο TK δεν μπορούν.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Τα εναιωρημένα κύτταρα εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης (βλ. παράγραφο 19), για κατάλληλο χρονικό διάστημα (βλ. παράγραφο 33), και κατόπιν ανακαλλιεργούνται για να προσδιοριστεί η κυτταροτοξικότητα και για να επιτραπεί η φαινοτυπική έκφραση πριν από την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης. Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται βάσει της σχετικής συνολικής ανάπτυξης (RTG, βλ. παράγραφο 25) για την MLA και βάσει της σχετικής επιβίωσης (RS, βλ. παράγραφο 26) για την TK6. Οι καλλιέργειες υπό αγωγή διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο για ικανό χρονικό διάστημα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε κυτταρικό τύπο (βλ. παράγραφο 37), ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των προκληθεισών μεταλλάξεων. Μετά τη φαινοτυπική έκφραση, προσδιορίζεται η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης με ανακαλλιέργεια γνωστού αριθμού κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής για την ανίχνευση αποικιών μεταλλαγμένων κυττάρων και σε θρεπτικό μέσο χωρίς παράγοντα επιλογής για τον προσδιορισμό της απόδοσης κλωνοποίησης (βιωσιμότητα). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επώασης, μετρούνται οι αποικίες. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης υπολογίζεται βάσει του αριθμού μεταλλαγμένων αποικιών, διορθωμένου ως προς την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασίες

Κύτταρα

13. Για την MLA: Λόγω του ότι η MLA αναπτύχθηκε και χαρακτηρίστηκε με χρήση της υποσειράς *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C των κυττάρων L5178Y, για την MLA θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη υποσειρά. Η κυτταρική σειρά L5178Y προήλθε από προκληθέν από μεθυλοχολανθρένιο θυμικό λέμφωμα από ποντικό DBA-2 (26). Οι Clive και συνεργάτες υπέβαλαν σε αγωγή κύτταρα L5178Y (καλούμενα από τον Clive TK$^{+/+}$ -3) με μεθανοσουλφονικό αιθύλιο και απομόνωσαν έναν κλώνο TK$^{-/-}$ (καλούμενο TK$^{-/-}$ -3.7) με χρήση βρωμοδεσοξυουριδίνης ως παράγοντα επιλογής. Από τον κλώνο TK$^{-/-}$ απομονώθηκε ένας αυθόρμητος κλώνος TK$^{+/-}$ (καλούμενος TK$^{+/-}$ -3.7.2.) και ένας υποκλώνος (καλούμενος TK$^{+/-}$-3.7.2C), οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν για χρήση στην MLA (27). Ο καρυότυπος της κυτταρικής σειράς έχει δημοσιευτεί (28)(29)(30)(31). Ο χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων είναι 40. Υπάρχει ένα μετακεντρικό χρωμόσωμα (t12,13) που πρέπει να μετράται ωςένα

χρωμόσωμα. Ο γενετικός τόπος της *TK* βρίσκεται στο περιφερικό άκρο του χρωμοσώματος 11. Η κυτταρική σειρά L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C έχει μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα p53 και παράγει μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 (32) (33). Η ικανότητα της δοκιμής να ανιχνεύει μεγάλης κλίμακας βλάβες πιθανότατα οφείλεται στην κατάσταση του p53 της κυτταρικής σειράς $TK^{+/-}$-3.7.2C (17).

14. Για την TK6: Η TK6 είναι μια ανθρώπινη λεμφοβλαστοειδής κυτταρική σειρά. Η γονική κυτταρική σειρά είναι μια κυτταρική σειρά μετασχηματισμένη από τον ιό Epstein-Barr, η WI-L2, η οποία προήλθε αρχικά από ένα αγόρι ηλικίας 5 ετών με κληρονομική σφαιροκυττάρωση. Ο πρώτος κλώνος που απονώθηκε, ο HH4, υπέστη μεταλλαξιγένεση με ICR191 και παρήχθη μια ετερόζυγη κυτταρική σειρά *TK*, η TK6 (34). Τα κύτταρα TK6 είναι σχεδόν διπλοειδή και ο αντιπροσωπευτικός καρυότυπος είναι 47, XY, 13+, t(14, 20), t(3, 21) (35). Ο γενετικός τόπος *TK* στον άνθρωπο βρίσκεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17. Η TK6 είναι μια κυτταρική σειρά με λειτουργικό p53, διότι διαθέτει αλληλουχία p53 αγρίου τύπου και στα δύο αλληλόμορφα και εκφράζει μόνο την πρωτεΐνη p53 αγρίου τύπου (36).

15. Για αμφότερες τις MLA και TK6, την πρώτη φορά που δημιουργείται ή ανανεώνεται μια κύρια αποθεματική καλλιέργεια, συνιστάται το εργαστήριο δοκιμών να βεβαιώνεται για την απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα, να προσδιορίζει τον καρυότυπο των κυττάρων ή να χρωματίζει τα χρωμοσώματα που φέρουν τον γενετικό τόπο*TK* και να ελέγχει τους χρόνους διπλασιασμού των πληθυσμών. Η φυσιολογική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζεται και να συμφωνεί με τα δημοσιευμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων (16)(19)(37). Η κύρια αποθεματική καλλιέργεια θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία -150° C ή χαμηλότερη και να χρησιμοποιείται για την παρασκευή όλων των κυτταρικών αποθεμάτων εργασίας.

16. Είτε πριν από τη δημιουργία μεγάλου αριθμού κρυοσυντηρούμενων αποθεμάτων εργασίας είτε ακριβώς πριν από τη χρήση σε πείραμα, η καλλιέργεια ενδέχεται να χρειάζεται να καθαριστεί από προϋπάρχοντα μεταλλαγμένα κύτταρα [εκτός εάν η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF) του μάρτυρα με διαλύτη εμπίπτει ήδη εντός του αποδεκτού εύρους – βλ. πίνακα 2 για την MLA)]. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση μεθοτρεξάτης (αμινοπτερίνη) για την αρνητική επιλογή ενάντια στα κύτταρα με έλλειψη TK, και την προσθήκη θυμιδίνης, υποξανθίνης και γλυκίνης (L5178Y) ή 2'-δεοξυκυτιδίνης (TK6) στην καλλιέργεια προκειμένου να διασφαλίζεται η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων με λειτουργική TK (19)(38)(39), και (40) για την TK6. Γενικές συμβουλές σχετικά με την ορθή πρακτική για τη συντήρηση των κυτταροκαλλιεργειών καθώς και ειδικές συμβουλές για τα κύτταρα L5178Y και TK6 παρέχονται στις παραπομπές (19)(31)(37)(39)(41). Για τα εργαστήρια που χρειάζονται κύριες αποθεματικές κυτταροκαλλιέργειες για να ξεκινήσουν την MLA ή την TK6, και για την προμήθεια νέων κύριων αποθεματικών κυτταροκαλλιεργειών, διατίθεται αποθετήριο καλά χαρακτηρισμένων κυττάρων (37).

Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

17. Για τη διατήρηση των καλλιεργειών στο πλαίσιο αμφότερων των δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό μέσο και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2, θερμοκρασία επώασης 37 °C). Οι κυτταρικές καλλιέργειες θα πρέπει πάντοτε να διατηρούνται υπό συνθήκες που διασφαλίζουν ότι αναπτύσσονται κατά τη λογαριθμική φάση. Παίζει σημαντικό ρόλο το θρεπτικό μέσο και οι συνθήκες καλλιέργειας να επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται η άριστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου έκφρασης και η κλωνοποίηση μεταλλαγμένων και μη κυττάρων. Όσον αφορά τόσο την MLA όσο και την TK6, είναι εξίσου σημαντικό οι συνθήκες καλλιέργειας να διασφαλίζουν την άριστη ανάπτυξη τόσο των προϊόντων μετάλλαξης TK μεγάλων αποικιών/πρώιμης εμφάνισης όσο και των προϊόντων μετάλλαξης μικρών αποικιών/όψιμης εμφάνισης Περισσότερες λεπτομέρειες για τις καλλιέργειες, περιλαμβανομένης της ανάγκης κατάλληλης θερμικής αδρανοποίησης ορού αλόγου, σε περίπτωση που κατά την επιλογή προϊόντων μετάλλαξης χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο RPMI, παρέχονται στις παραπομπές (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Παρασκευή των καλλιεργειών

18. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από αποθεματικές καλλιέργειες, εμβολιαζόμενα σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι εναιωρημένες καλλιέργειες να εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκθετικά κατά τις περιόδους αγωγής και έκφρασης.

Μεταβολική ενεργοποίηση

19. Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα L5178Y και TK6, που έχουν ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και εξωγενή συστήματα μεταβολισμού. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα, που συνιστάται εκτός αν ειδικοί λόγοι υπαγορεύουν διαφορετικά, είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών (κατά κανόνα επιμύων) και το οποίο έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (43)(44)(45) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτάλης και β-ναφθοφλαβόνης (46)(47)(48)(49)(50)(51). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (52) και έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασώνμεικτής

λειτουργίας (45)(46)(47)(48)(49). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 2 %, αλλά οι οποίες επιτρέπεται να αυξηθούν σε 10 % κ.ό. στο τελικό θρεπτικό μέσο της δοκιμής. Η επιλογή του τύπου και της συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης ή μεταβολικού επαγωγέα μπορεί να επηρεαστεί από την κατηγορία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

Σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

20. Οι στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν από την αγωγή των κυττάρων (βλ. παράγραφο 21). Οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιτρέπεται να προστίθενται κατευθείαν στο σύστημα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την αγωγή του συστήματος δοκιμής. Οι αέριες ή πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυποποιημένων πρωτοκόλλων, π.χ. αγωγή σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (53) (54) (55). Τα σκευάσματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να ετοιμάζονται ακριβώς πριν από την αγωγή, εκτός αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας αποδεικνύουν ότι είναι αποδεκτή η φύλαξη.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Διαλύτες

21. Θα πρέπει να επιλέγεται διαλύτης που να προσφέρει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς τη διεξαγωγή της δοκιμής, π.χ. μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλοιώνοντας την υπό δοκιμή χημική ουσία, αντιδρώντας με τα δοχεία καλλιέργειας ή αποδυναμώνοντας το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης (ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας). Καθιερωμένοι διαλύτες είναι το νερό και το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει γενικά το 1 % κ.ό., προκειμένου για οργανικούς διαλύτες, ή το 10 % κ.ό. στην περίπτωση των υδατικών διαλυτών (αλατούχο διάλυμα ή νερό). Εάν χρησιμοποιούνται άλλοι πλην των καθιερωμένων διαλυτών (π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη), η χρήση τους θα πρέπει να τεκμηριώνεται με στοιχεία που αποδεικνύουν τη συμβατότητά τους με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και με το σύστημα δοκιμής, καθώς και την απουσία γενετικής τοξικότητας στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Εάν δεν υπάρχουν αυτά τα στοιχεία, είναι σημαντικό να προστίθενται μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή (βλ. προσάρτημα 1, Ορισμοί) για να αποδεικνύεται ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν επάγει επιβλαβείς ή μεταλλαξιγόνες επιδράσεις.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΓΩΓΗΣ

22. Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα (βλ. παράγραφο 28), καθίζηση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 29) ή έντονες μεταβολές του pH ή της ωσμωμοριακότητας (βλ. παράγραφο 8). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία προκαλεί έντονη μεταβολή του pH του θρεπτικού μέσου κατά την προσθήκη της, το pH μπορεί να ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο τελικό θρεπτικό μέσο αγωγής, με σκοπό να αποφεύγονται τα τεχνητά θετικά αποτελέσματα και να διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

23. Η επιλογή συγκεντρώσεων βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και άλλες παραμέτρους (βλ. παραγράφους 27-30). Μολονότι η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας σε αρχική δοκιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ακριβέστερο καθορισμό των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στο κύριο πείραμα, δεν είναι υποχρεωτική η διεξαγωγή αρχικής δοκιμής. Ακόμη και εάν διενεργηθεί αρχική αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας, εξακολουθεί να απαιτείται η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας για κάθε καλλιέργεια στο κύριο πείραμα. Σε περίπτωση διεξαγωγής πειράματος προσδιορισμού εύρους, αυτό θα πρέπει να καλύπτει ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων και μπορεί είτε να τερματίζεται την 1η ημέρα μετά την αγωγή είτε να συνεχίζεται για χρονικό διάστημα έκφρασης 2 ημερών έως την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης (εφόσον φαίνεται ότι οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι οι κατάλληλες).

24. Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται για κάθε επιμέρους καλλιέργεια δοκιμής και καλλιέργεια μάρτυρα: οι μέθοδοι για την MLA (2) και την TK6 (15) καθορίζονται βάσει της διεθνώς αποδεκτής πρακτικής.

25. Όσον αφορά τόσο την έκδοση με άγαρ όσο και την έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA: η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με χρήση της σχετικής συνολικής ανάπτυξης (RTG), η οποία ορίστηκε για πρώτη φορά από τους Clive και Spector το 1975 (2). Αυτό το μέτρο περιλαμβάνει τη σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος (RSG: καλλιέργεια δοκιμής έναντι μάρτυρα με διαλύτη) κατά την αγωγή των κυττάρων, τον χρόνο έκφρασης και τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης (RCE: καλλιέργεια δοκιμής έναντι μάρτυρα με διαλύτη) κατά τη χρονική στιγμή επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης (2). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η RSG περιλαμβάνει τυχόν απώλεια κυττάρων στην καλλιέργεια δοκιμής στη διάρκεια της αγωγής (βλ. προσάρτημα 2 για τους τύπους).

26. Για την TK6: η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με χρήση της σχετικής επιβίωσης (RS), δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένης ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, βάσει του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (στον οποίο έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %) (βλ. προσάρτημα 2 για τον τύπο).

27. Θα πρέπει να αξιολογούνται τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις δοκιμής (χωρίς τον διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες) που πληρούν τα κριτήρια αποδοχής (ενδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα, αριθμός κυττάρων κ.λπ.). Αν και συνιστάται η χρήση διπλών καλλιεργειών, μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής είτε πολλαπλές πανομοιότυπες καλλιέργειες είτε μοναδικές καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις πανομοιότυπες καλλιέργειες σε δεδομένη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρονται χωριστά αλλά μπορούν να συνενώνονται για την ανάλυση δεδομένων (55). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες με ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα, κατάλληλες είναι συνήθως οι συγκεντρώσεις που απέχουν μεταξύ τους κατά παράγοντα ίσο με 2 ή 3 περίπου. Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει να καλύπτουν το φάσμα τιμών κυτταροτοξικότητας που κυμαίνεται από τη συγκέντρωση που προκαλεί την κυτταροτοξικότητα η οποία περιγράφεται στην παράγραφο 28 μέχρι τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μέτρια και ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα. Πολλές υπό δοκιμή χημικές ουσίες παρουσιάζουν καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης με μεγάλη κλίση και, για να καλυφθεί το συνολικό φάσμα τιμών κυτταροτοξικότητας ή για να μελετηθεί λεπτομερώς η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι αναγκαία η χρήση συγκεντρώσεων με μικρότερα διαστήματα μεταξύ τους και περισσότερων από τέσσερις συγκεντρώσεις, ιδίως σε περιπτώσεις όπου απαιτείται επανάληψη του πειράματος (βλ. παράγραφο 70). Η χρήση περισσότερων από 4 συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν χρησιμοποιούνται μονές καλλιέργειες.

28. Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αποσκοπεί στην επίτευξη μεταξύ 20 και 10 % RTG για την MLA, και μεταξύ 20 και 10 % RS για την TK6 (παράγραφος 67).

29. Για δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι κυτταροτοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η αναλυόμενη μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να επιφέρει θολερότητα ή ίζημα ορατό με γυμνό οφθαλμό ή με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου στο τέλος της αγωγής με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ακόμη και αν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, συνιστάται να διεξάγεται η δοκιμή σε μία μόνο συγκέντρωση που επιφέρει θολερότητα ή ορατό ίζημα, διότι μπορεί να προκύψουν τεχνητές επιδράσεις από το ίζημα. Λόγω του ότι στις MLA και TK6 χρησιμοποιούνται καλλιέργειες σε εναιώρημα, θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερα μέριμνα ώστε να διασφαλίζεται ότι το ίζημα δεν παρεμποδίζει τη διεξαγωγή της δοκιμής. Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πριν από το πείραμα μπορεί επίσης να είναι χρήσιμος.

30. Εάν δεν παρατηρηθεί ίζημα ούτε περιοριστική κυτταροτοξικότητα, η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 10 mM, 2 mg/ml ή 2 μl/ml (57)(58). Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει καθορισμένη σύνθεση, π.χ. ουσία άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, προϊόντα πολύπλοκων αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά [δηλ. χημικές ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης (UVCB)], εκχυλίσματα από το περιβάλλον κ.λπ., η ανώτατη συγκέντρωση θα πρέπει ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (π.χ. 5 mg/ml), ελλείψει επαρκούς κυτταροτοξικότητας, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του κάθε συστατικού. Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (59).

Μάρτυρες

31. Για κάθε συνθήκη του πειράματος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 21), αποτελούμενοι μόνο από τον διαλύτη στο θρεπτικό μέσο της αγωγής και υποβαλλόμενοι στην ίδια μεταχείριση όπως και οι καλλιέργειες.

32. Απαιτούνται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται αφενός η ικανότητα του εργαστηρίου να αναγνωρίζει τα μεταλλαξιγόνα υπό τις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου δοκιμής και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα του εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (κατά περίπτωση), και να αποδεικνύεται η επαρκής ανίχνευση αμφότερων των προϊόντων μετάλλαξης *TK* μικρών αποικιών/όψιμης εμφάνισης και μεγάλων αποικιών/πρώιμης εμφάνισης. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων παρέχονται κατωτέρω στον πίνακα 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές θετικές ουσίες μάρτυρες, εφόσον η χρήση τους αιτιολογείται. Επειδή οι *in vitro* δοκιμές γενετικής τοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών είναι επαρκώς τυποποιημένες για βραχυχρόνιες αγωγές (3-4 ωρών) που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση με την ίδια διάρκεια αγωγής, η χρήση θετικών μαρτύρων μπορεί να περιορίζεται σε μια μεταλλαξιγόνο ουσία που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Στην περίπτωση αυτή, αυτή η μοναδική απόκριση στον θετικό μάρτυρα θα καταδείξει τόσο τη δραστηριότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης όσο και την αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής. Ωστόσο, σε περίπτωση μακροχρόνιας αγωγής (δηλ. 24 ωρών χωρίς S9) θα πρέπει να προβλέπεται χωριστός θετικός μάρτυρας, διότι η διάρκεια της αγωγής διαφέρει από αυτήν της δοκιμής με μεταβολική ενεργοποίηση. Κάθε θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις που αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση σε σχέση με την τιμή υποβάθρου, για να καταδεικνύεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής, και η απόκριση δεν θα πρέπει να διακυβεύεται εξαιτίας κυτταροτοξικότητας που υπερβαίνει τα όρια που προβλέπονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (βλ. παράγραφο 28).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου και την επιλογή θετικών μαρτύρων

Κατηγορία	Ουσία	CASRN
1. Μεταλλαξιγόνα που δρουν χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση		
	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3
	Μιτομυκίνη C	50-07-7
	4-Νιτροκινολιν-N-οξείδιο	56-57-5
2. Μεταλλαξιγόνα που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση		
	Βενζο(α)πυρένιο	50-32-8
	Κυκλοφωσφαμίδιο, μονοένυδρο	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Διμεθυλοβενζανθρακένιο	57-97-6
	3-Μεθυλοχολανθρένιο	56-49-5

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία

33. Πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία με και χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 3 έως 4 ώρες αρκούν). Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι οι απαιτήσεις αυτές μπορεί να διαφέρουν για τα φαρμακευτικά προϊόντα για τον άνθρωπο (59). Όσον αφορά την MLA, σε περιπτώσεις όπου η βραχυχρόνια αγωγή αποδίδει αρνητικά αποτελέσματα και υπάρχουν πληροφορίες που υποδεικνύουν την ανάγκη πιο μακροχρόνιας αγωγής [π.χ. ανάλογα νουκλεοσιδίων, δυσδιάλυτες χημικές ουσίες (5)(59)], θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής της δοκιμής με μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αγωγής, δηλαδή 24 ώρες χωρίς S9.

34. Ο ελάχιστος αριθμός χρησιμοποιούμενων κυττάρων για κάθε καλλιέργεια δοκιμής (μάρτυρα και αγωγής) σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στην αυθόρμητη συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης. Μια γενική υπόδειξη είναι η αγωγή και ανακαλλιέργεια επαρκών κυττάρων σε κάθε πειραματική καλλιέργεια ώστε να διατηρούνται τουλάχιστον 10, αλλά ιδανικά 100, αυθόρμητα προϊόντα μετάλλαξης σε όλες τις φάσεις της δοκιμής (αγωγή, φαινοτυπική έκφραση και επιλογή προϊόντων μετάλλαξης) (56).

35. Όσον αφορά την MLA, η συνιστώμενη αποδεκτή συχνότητα αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης κυμαίνεται μεταξύ 35-140 × 10^{-6} (έκδοση με άγαρ) και 50-170 × 10^{-6} (έκδοση μικροτιτλοδότησης) (βλ. πίνακα 2). Για να διατηρούνται τουλάχιστον 10, και ιδανικά 100, αυθόρμητα προϊόντα μετάλλαξης που επιβιώνουν της αγωγής για κάθε καλλιέργεια δοκιμής, πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή τουλάχιστον 6 × 10^6 κύτταρα. Με αγωγή αυτού του αριθμού κυττάρων και τη διατήρηση επαρκών κυττάρων κατά την έκφραση και την κλωνοποίηση για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης, εξασφαλίζεται επαρκής αριθμός προϊόντων μετάλλαξης (10 ή περισσότερα) σε όλες τις φάσεις του πειράματος, ακόμη και για τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή σε συγκεντρώσεις που επάγουν 90 % κυτταροτοξικότητα (όπως μετριέται βάσει RTG 10 %) (19)(38)(39).

36. Στην TK6, η συχνότητα αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης κυμαίνεται κατά κανόνα μεταξύ 2 και 10 × 10^{-6}. Για να επιβιώνουν τουλάχιστον 10 αυθόρμητα προϊόντα μετάλλαξης σε κάθε καλλιέργεια, πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή τουλάχιστον 20 × 10^6 κύτταρα. Με αγωγή αυτού του αριθμού κυττάρων εξασφαλίζεται επαρκής αριθμός αυθόρμητων προϊόντων μετάλλαξης (10 ή περισσότερα), ακόμη και για καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή σε συγκεντρώσεις που επάγουν 90 % κυτταροτοξικότητα (10 % RS). Επιπλέον, επαρκής αριθμός κυττάρων πρέπει να καλλιεργείται κατά το χρονικό διάστημα έκφρασης και να επιστρώνεται για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης (60).

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης και μέτρηση της συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης

37. Στο τέλος της περιόδου αγωγής, τα κύτταρα καλλιεργούνται για καθορισμένο χρονικό διάστημα ώστε να επιτυγχάνεται σχεδόν βέλτιστη φαινοτυπική έκφραση των πρόσφατα προκληθέντων προϊόντων μετάλλαξης για καθεμία κυτταρική σειρά χωριστά. Στην MLA, το χρονικό διάστημα φαινοτυπικής έκφρασης είναι 2 ημέρες. Στην TK6, το χρονικό διάστημα φαινοτυπικής έκφρασης είναι 3-4 ημέρες. Εάν χρησιμοποιείται αγωγή διάρκειας 24 ωρών, το χρονικό διάστημα έκφρασης ξεκινά μετά το πέρας της αγωγής.

38. Στη διάρκεια του χρονικού διαστήματος φαινοτυπικής έκφρασης, τα κύτταρα καταμετρώνται καθημερινά. Στην MLA, οι καθημερινές καταμετρήσεις κυττάρων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ημερήσιας ανάπτυξης του εναιωρήματος (SG). Μετά την περίοδο έκφρασης διάρκειας 2 ημερών, τα κύτταρα εναιωρούνται σε θρεπτικό μέσο με και χωρίς παράγοντα επιλογής με σκοπό τον προσδιορισμό των αριθμών των προϊόντων μετάλλαξης (τρυβλία επιλογής) και της απόδοσης της κλωνοποίησης (τρυβλία βιωσιμότητας) αντίστοιχα. Όσον αφορά την MLA, υπάρχουν δύο εξίσου αποδεκτές μέθοδοι κλωνοποίησης επιλογής προϊόντων μετάλλαξης· μία στην οποία χρησιμοποιείται άγαρ και μία άλλη στην οποία χρησιμοποιείται υγρό θρεπτικό μέσο σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων (19) (38) (39). Η κλωνοποίηση στην TK6 διεξάγεται με χρήση υγρού μέσου και τρυβλίων 96 κοιλοτήτων (16).

39. Η τριφθοροθυμιδίνη (TFT) είναι ο μόνος συνιστώμενος παράγοντας επιλογής για τα προϊόντα μετάλλαξης *TK* (61).

40. Στην MLA, τα τρυβλία με άγαρ και τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης καταμετρώνται μετά από επώαση διάρκειας 10-12 ημερών. Στην TK6, οι αποικίες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης βαθμολογούνται μετά από 10-14 ημέρες για τα πρώιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης. Για τη μέτρηση των βραδέως αναπτυσσόμενων (όψιμα εμφανιζόμενων) προϊόντων μετάλλαξης TK6 χρειάζεται εκ νέου τροφοδότηση των κυττάρων με θρεπτικό μέσο και TFT, μετά την καταμέτρηση των πρώιμα εμφανιζόμενων προϊόντων μετάλλαξης, και, στη συνέχεια, επώαση των τρυβλίων για επιπλέον χρονικό διάστημα 7-10 ημερών (62). Για την εξέταση του ζητήματος της καταμέτρησης των βραδέως και των φυσιολογικώς αναπτυσσόμενων προϊόντων μετάλλαξης *TK*, ανατρέξτε στις παραγράφους 42 και 44.

41. Οι κατάλληλοι υπολογισμοί για τις δύο δοκιμές, περιλαμβανομένων των δύο μεθόδων (με άγαρ και μικροτιτλοδότηση) για την MLA, περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 2. Στη μέθοδο με άγαρ της MLA, καταμετρώνται οι αποικίες και ο αριθμός των αποικιών με προϊόντα μετάλλαξης προσαρμόζεται βάσει της απόδοσης κλωνοποίησης προκειμένου να υπολογιστεί η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF). Στην έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA και την TK6, η απόδοση κλωνοποίησης προσδιορίζεται και για τα τρυβλία επιλογής και για τα τρυβλία απόδοσης κλωνοποίησης, σύμφωνα με την κατανομή Poisson (63). Η MF υπολογίζεται με βάση τις εν λόγω δύο αποδόσεις κλωνοποίησης.

Χαρακτηρισμός αποικιών προϊόντων μετάλλαξης

42. Στην MLA, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική (βλ. παραγράφους 62-63), θα πρέπει να πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των αποικιών βάσει του μεγέθους ή της ανάπτυξής τους για τουλάχιστον μία από τις καλλιέργειες δοκιμής (κατά κανόνα στην υψηλότερη αποδεκτή θετική συγκέντρωση) και για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι αρνητική (βλ. παράγραφο 64), θα πρέπει να πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των αποικιών προϊόντων μετάλλαξης για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες. Στη μέθοδο μικροτιτλοδότησης της MLA, τα προϊόντα μετάλλαξης μικρών αποικιών ορίζονται ως εκείνα που καλύπτουν λιγότερο από το 25 % της διαμέτρου της κοιλότητας, και τα προϊόντα μετάλλαξης μεγάλων αποικιών ως εκείνα που καλύπτουν περισσότερο από το 25 % της διαμέτρου της κοιλότητας. Στη μέθοδο με άγαρ χρησιμοποιείται αυτόματος μετρητής αποικιών για την καταμέτρηση των αποικιών προϊόντων μετάλλαξης και την εκτίμηση του μεγέθους τους. Οι προσεγγίσεις αναφορικά με την εκτίμηση του μεγέθους των αποικιών περιγράφονται αναλυτικά στη βιβλιογραφία (19)(38)(40). Ο χαρακτηρισμός των αποικιών του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα είναι απαραίτητος προκειμένου να αποδεικνύεται η ορθή διεξαγωγή των μελετών.

43. Η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αρνητική εάν δεν ανιχνευτούν ικανοποιητικά προϊόντα μετάλλαξης μεγάλων και μικρών αποικιών στον θετικό μάρτυρα. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών μπορεί να χρησιμοποιείται για την παροχή γενικών πληροφοριών αναφορικά με την ικανότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει σημειακές μεταλλάξεις και/ή χρωμοσωμικά συμβάντα (παράγραφος 4).

44. TK6: Τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα και τα βραδέως αναπτυσσόμενα προϊόντα μετάλλαξης διαφοροποιούνται βάσει του διαφορετικού χρόνου επώασης (βλ. παράγραφο 40). Στην TK6, γενικά, τόσο τα πρώιμα εμφανιζόμενα όσο και τα όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης βαθμολογούνται για όλες τις καλλιέργειες, περιλαμβανομένων των αρνητικών και των θετικών μαρτύρων. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα είναι απαραίτητος προκειμένου να αποδεικνύεται η ορθή διεξαγωγή των μελετών. Η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αρνητική εάν δεν ανιχνευτούν ικανοποιητικά πρώιμα εμφανιζόμενα και όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης στον θετικό μάρτυρα. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών μπορεί να χρησιμοποιείται για την παροχή γενικών πληροφοριών αναφορικά με την ικανότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να επάγει σημειακές μεταλλάξεις και/ή χρωμοσωμικά συμβάντα (παράγραφος 4).

Τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου

45. Για να αποδείξει ότι διαθέτει επαρκή εμπειρία στη διεξαγωγή της δοκιμής πριν την εντάξει στην τρέχουσα πρακτική του, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει πραγματοποιήσει σειρά πειραμάτων με θετικές χημικές ουσίες αναφοράς που δρουν μέσω διαφόρων μηχανισμών (τουλάχιστον μία που δρα με και μία που δρα χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, επιλεγμένες μεταξύ των χημικών ουσιών που απαριθμούνται στον πίνακα 1) και διάφορους αρνητικούς μάρτυρες (περιλαμβανομένων καλλιεργειών χωρίς αγωγή και διαφόρων διαλυτών/φορέων). Οι αποκρίσεις των εν λόγω θετικών και αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αυτό δεν ισχύει για τα εργαστήρια που έχουν πείρα, δηλ. διαθέτουν βάση ιστορικών δεδομένων, όπως ορίζεται στις παραγράφους 47-50. Στην MLA, οι τιμές που λαμβάνονται για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τις συστάσεις IWGT (βλ. πίνακα 2).

46. Θα πρέπει να διερευνάται ένα σύνολο επιλεγμένων ουσιών που χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες (βλ. πίνακα 1) με βραχυχρόνιες και μακροχρόνιες αγωγές (εάν χρησιμοποιούνται μακροχρόνιες αγωγές) απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, καθώς επίσης και με βραχυχρόνια αγωγή παρουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, προκειμένου να καταδεικνύεται η τεχνική ικανότητα ανίχνευσης μεταλλαξιγόνων χημικών ουσιών, να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης και να καταδεικνύεται η καταλληλότητα των συνθηκών ανάπτυξης κυττάρων στη διάρκεια της αγωγής, της φαινοτυπικής έκφρασης και της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης και των διαδικασιών καταμέτρησης. Θα πρέπει να επιλέγεται ένα φάσμα συγκεντρώσεων των επιλεγμένων χημικών ουσιών που να επιφέρουν αναπαραγώγιμες και σχετιζόμενες με τη συγκέντρωση αυξήσεις σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου, για να αποδεικνύονται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του συστήματος δοκιμής.

Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες

47. Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει:

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες,

— εύρος και κατανομή ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς αγωγή, με διαλύτη).

48. Κατά την αρχική συγκέντρωση δεδομένων για ιστορική κατανομή όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να συμφωνούν με τα δημοσιευμένα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες. Καθώς θα προστίθενται περισσότερα πειραματικά δεδομένα στην κατανομή των μαρτύρων, οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου 95 % της εν λόγω κατανομής (64)(65).

49. Η βάση ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει αρχικά να δημιουργείται με δεδομένα από τουλάχιστον 10 πειράματα, αν και είναι προτιμότερο να αποτελείται από τουλάχιστον 20 πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε συγκρίσιμες πειραματικές συνθήκες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ποιοτικού ελέγχου, όπως διαγράμματα ελέγχου [π.χ. διαγράμματα C ή X-bar (65)], για να προσδιορίζουν τη μεταβλητότητα των δεδομένων τους που αφορούν τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και να αποδεικνύουν ότι έχουν τη μεθοδολογία υπό έλεγχο (66). Περαιτέρω λεπτομέρειες και συστάσεις σχετικά με τον τρόπο δημιουργίας και χρήσης των ιστορικών δεδομένων διατίθενται στη βιβλιογραφία (64).

50. Τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να αποτελούνται από τις συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης από μονές καλλιέργειες ή, κατά προτίμηση, από πανομοιότυπες καλλιέργειες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 27. Οι παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει, στην ιδανική περίπτωση, να βρίσκονται εντός των ορίων ελέγχου 95 % της κατανομής της βάσης ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για αρνητικούς μάρτυρες. Όταν τα δεδομένα για αρνητικούς μάρτυρες δεν βρίσκονται εντός του ορίου ελέγχου 95 %, μπορεί να είναι αποδεκτή η προσθήκη τους στην ιστορική κατανομή μαρτύρων εφόσον τα εν λόγω δεδομένα δεν είναι ακραίες έκτοπες τιμές και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το σύστημα δοκιμής είναι υπό έλεγχο (βλ. παράγραφο 49) και ότι δεν πρόκειται για τεχνικό ή ανθρώπινο σφάλμα.

51. Κάθε αλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου θα πρέπει να εξετάζεται υπό το πρίσμα της συμφωνίας των δεδομένων με τις υφιστάμενες βάσεις ιστορικών δεδομένων του εργαστηρίου για μάρτυρες. Τυχόν σημαντικές ανακολουθίες θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέας βάσης ιστορικών δεδομένων για μάρτυρες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

52. Στην παρουσίαση των δεδομένων για αμφότερες τις MLA και TK6 θα πρέπει να περιλαμβάνονται, και για τις καλλιέργειες που υποβλήθηκαν σε αγωγή και για τις καλλιέργειες μαρτύρων, τα δεδομένα που απαιτούνται για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας (RTG ή RS αντίστοιχα) και τις συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης, όπως περιγράφεται κατωτέρω.

53. Για την MLA, θα πρέπει να παρέχονται για κάθε καλλιέργεια δεδομένα για την RSG, την RTG, την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης και τον αριθμό των αποικιών προϊόντων μετάλλαξης (για την έκδοση με άγαρ) ή τον αριθμό των κενών κοιλοτήτων (για την έκδοση μικροτιτλοδότησης). Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF) θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων ανά εκατομμύριο κυττάρων που επιβιώνουν. Εάν η απόκριση είναι θετική, θα πρέπει να παρέχονται οι MF (και/ή το ποσοστό της συνολικής MF) των μικρών και των μεγάλων αποικιών για τουλάχιστον μία συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (κατά κανόνα η υψηλότερη θετική συγκέντρωση) και για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Σε περίπτωση αρνητικής απόκρισης, θα πρέπει να παρέχεται η MF των μικρών και των μεγάλων αποικιών για τον αρνητικό και τον θετικό μάρτυρα.

54. Για την TK6, θα πρέπει να παρέχονται για κάθε καλλιέργεια δεδομένα για την RS, την απόδοση κλωνοποίησης κατά τη χρονική στιγμή επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης και τον αριθμό των κενών κοιλοτήτων για τα πρώιμα εμφανιζόμενα και τα όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης. Η MF θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός μεταλλαγμένων κυττάρων ανά πλήθος κυττάρων που επιβιώνουν, ενώ θα πρέπει να περιλαμβάνεται η συνολική MF καθώς και η MF (και/ή το ποσοστό της συνολικής MF) των πρώιμα εμφανιζόμενων και των όψιμα εμφανιζόμενων προϊόντων μετάλλαξης.

Κριτήρια αποδοχής

55. Για αμφότερες τις MLA και TK6, πριν από την εξαγωγή τελικών αποτελεσμάτων για συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

— να έχουν εφαρμοστεί δύο πειραματικές συνθήκες (βραχυχρόνια αγωγή με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση - βλ. παράγραφο 33), εκτός εάν από τη μία προκύψουν θετικά αποτελέσματα,

— να υπάρχει η δυνατότητα ανάλυσης επαρκούς αριθμού κυττάρων και συγκεντρώσεων (βλ. παραγράφους 27, 34-36),

— τα κριτήρια επιλογής της ανώτατης συγκέντρωσης είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφονται στις παραγράφους 28-30.

Κριτήρια αποδοχής για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες

56. Η ανάλυση που διεξήγαγε η ομάδα εργασίας εμπειρογνωμόνων MLA της IWGT σε μεγάλο πλήθος δεδομένων MLA οδήγησε σε διαμόρφωση συναίνεσης σε διεθνές επίπεδο όσον αφορά τα συγκεκριμένα κριτήρια αποδοχής για την MLA (1)(2)(3)(4)(5). Ως εκ τούτου, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει συγκεκριμένες συστάσεις για τον προσδιορισμό της δυνατότητας αποδοχής των αρνητικών και των θετικών μαρτύρων, και για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για κάθε επιμέρους ουσία στην MLA. Η βάση δεδομένων για την TK6 είναι πολύ μικρότερη και δεν έχει αξιολογηθεί από ομάδα εργασίας.

57. Για την MLA, κάθε πείραμα θα πρέπει να αξιολογείται ως προς το κατά πόσον ο μάρτυρας χωρίς αγωγή / μάρτυρας με διαλύτη πληροί τα κριτήρια αποδοχής της ομάδας εργασίας MLA της IWGT [(4) και πίνακας 2 παρακάτω] σε σχέση με τις ακόλουθες παραμέτρους: 1) την MF (επισημαίνεται ότι οι αποδεκτές βάσει της IWGT συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης είναι διαφορετικές για την έκδοση με άγαρ και την έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA), 2) την απόδοση κλωνοποίησης (CE) κατά τη χρονική στιγμή επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης, και 3) την ανάπτυξη εναιωρήματος (SG) για τον μάρτυρα με διαλύτη (βλ. προσάρτημα 2 για τους τύπους).

Πίνακας 2

Κριτήρια αποδοχής για την MLA

Παράμετρος	Μέθοδος μαλακού άγαρ	Μέθοδος μικροτιτλοδότησης
Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Απόδοση κλωνοποίησης	65 – 120 %	65 – 120 %
Ανάπτυξη εναιωρήματος	πολλαπλάσια κατά 8 – 32 φορές (αγωγή 3-4 ωρών) πολλαπλάσια κατά 32 – 180 φορές (αγωγή 24 ωρών, εφόσον διεξαχθεί)	πολλαπλάσια κατά 8 – 32 φορές (αγωγή 3-4 ωρών) πολλαπλάσια κατά 32 – 180 φορές (αγωγή 24 ωρών, εφόσον διεξαχθεί)

58. Για την MLA, κάθε δοκιμή θα πρέπει επίσης να αξιολογείται ως προς το κατά πόσον ο θετικός μάρτυρας/-ες πληροί τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα δύο κριτήρια αποδοχής που ανέπτυξε η ομάδα εργασίας της IWGT:

— ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να παρουσιάζει απόλυτη αύξηση της συνολικής συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης (MF), ήτοι αύξηση που υπερβαίνει την αυθόρμητη MF υποβάθρου [επαγόμενη MF (IMF)] τουλάχιστον 300×10^{-6}. Τουλάχιστον το 40 % της IMF θα πρέπει να αποτυπώνεται στην MF των μικρών αποικιών,

— ο θετικός μάρτυρας παρουσιάζει αύξηση στην MF μικρών αποικιών κατά τουλάχιστον 150×10^{-6} πάνω από την αύξηση που παρατηρείται στον παράλληλο μάρτυρα χωρίς αγωγή / μάρτυρα με διαλύτη (IMF μικρών αποικιών 150×10^{-6}).

59. Για την TK6, μια δοκιμή είναι αποδεκτή εάν θεωρείται αποδεκτή η προσθήκη του παράλληλου αρνητικού μάρτυρα στη βάση δεδομένων του εργαστηρίου για ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 48-49. Επιπλέον, οι παράλληλοι θετικοί μάρτυρες (βλ. παράγραφο 32) θα πρέπει να επάγουν αποκρίσεις συμβατές με εκείνες που έχουν καταχωριστεί στη βάση ιστορικών δεδομένων για θετικούς μάρτυρες και να επιφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα.

60. Σε αμφότερες τις δοκιμές, το ανώτατο όριο κυτταροτοξικότητας που παρατηρείται στην καλλιέργεια που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να είναι το ίδιο με αυτό των πειραματικών καλλιεργειών. Δηλαδή η RTG/RS δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 %. Για να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια για τον θετικό μάρτυρα, αρκεί η χρήση μιας μονής καλλιέργειας (ή μιας από τις συγκεντρώσεις των καλλιεργειών θετικού μάρτυρα, εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία συγκεντρώσεις). Επιπλέον, η MF του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός του αποδεκτού εύρους τιμών που έχει καθοριστεί για το εργαστήριο.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

61. Για την MLA, σημαντικό έργο σχετικά με τη βιολογική σημασία και τα κριτήρια για μια θετική απόκριση έχει πραγματοποιήσει η ομάδα εργασίας εμπειρογνωμόνων λεμφώματος ποντικού της IWGT (4). Ως εκ τούτου, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει συγκεκριμένες συστάσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκύπτουν από την MLA (βλ. παραγράφους 62-64). Η βάση δεδομένων για την TK6 είναι πολύ μικρότερη και δεν έχει αξιολογηθεί από ομάδα εργασίας. Συνεπώς, οι παρεχόμενες συστάσεις για την ερμηνεία των δεδομένων για την TK6 είναι γενικότερου χαρακτήρα (βλ. παραγράφους 65-66). Για τις δύο δοκιμές ισχύουν πρόσθετες απαιτήσεις (βλ. παραγράφους 67-71).

MLA

62. Για τη διασφάλιση της βιολογικής σημασίας της αυξημένης MF, συνιστάται η υιοθέτηση μιας προσέγγισης στην οποία ορίζονται οι θετικές και οι αρνητικές αποκρίσεις. Αντί της στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται συνήθως για άλλες δοκιμές, αυτή η προσέγγιση βασίζεται στη χρήση προκαθορισμένης επαγόμενης συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης (δηλ. αύξηση της MF πάνω από τον παράλληλο μάρτυρα), η οποία καλείται Global Evaluation Factor (καθολικός παράγοντας αξιολόγησης - GEF) και η οποία βασίζεται στην ανάλυση της κατανομής των δεδομένων MF αρνητικού μάρτυρα από συμμετέχοντα εργαστήρια (4). Για την έκδοση με άγαρ της MLA ο GEF είναι 90×10^{-6}, ενώ για την έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA ο GEF είναι 126×10^{-6}.

63. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούται το σύνολο των κριτηρίων αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33), η αύξηση της MF πάνω από το παράλληλο υπόβαθρο υπερβαίνει τον GEF και η αύξηση συνδέεται με τη συγκέντρωση (π.χ. με χρήση ελέγχου τάσης). Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

64. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούται το σύνολο των κριτηρίων αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33), δεν προκύπτει απόκριση που να συνδέεται με τη συγκέντρωση ή, εάν υπάρχει αύξηση της MF, αυτή δεν υπερβαίνει τον GEF. Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

TK6

65. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς θετική εάν, σε οποιαδήποτε από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33):

— τουλάχιστον σε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα

— η αύξηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης (βλ. παράγραφο 33)

— κάποιο από τα αποτελέσματα βρίσκεται εκτός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 48).

Όταν πληρούνται όλα αυτά τα κριτήρια, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής. Συστάσεις για τις πλέον κατάλληλες στατιστικές μεθόδους έχουν διατυπωθεί στη βιβλιογραφία (66)(67).

66. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται σαφώς αρνητική εάν, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν (βλ. παράγραφο 33):

— σε καμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα

— δεν παρατηρείται σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση αύξηση, όταν αξιολογείται με κατάλληλο έλεγχο τάσης

— όλα τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός της κατανομής των ιστορικών δεδομένων για αρνητικούς μάρτυρες (π.χ. όριο ελέγχου σε επίπεδο 95 % με βάση την κατανομή Poisson· βλ. παράγραφο 48).

Θεωρείται τότε ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ικανή να επάγει μεταλλάξεις σε αυτό το σύστημα δοκιμής.

Για αμφότερες τις δοκιμές MLA και TK6:

67. Εάν η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, θα πρέπει να επιδιώκεται η επίτευξη ανώτατης συγκέντρωσης μεταξύ 20 και 10 % RTG/RS. Είναι κοινά αποδεκτό ότι τα θετικά αποτελέσματα που βρίσκονται μόνο μεταξύ 20 και 10 % RTG/RS θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, καθώς και ότι ένα αποτέλεσμα δεν θα θεωρείται θετικό σε περίπτωση που παρατηρήθηκε αύξηση της MF μόνο στο 10 % ή σε μικρότερο ποσοστό RTG/RS (εφόσον αξιολογήθηκε) (2)(59).

68. Υπάρχουν ορισμένες καταστάσεις στις οποίες η συλλογή πρόσθετων πληροφοριών ενδέχεται να συμβάλει στο να χαρακτηριστεί μια υπό δοκιμή χημική ουσία μη μεταλλαξιγόνος, όταν δεν υπάρχει καλλιέργεια που να παρουσιάζει τιμή RTG μεταξύ 10-20 % RTG/RS. Οι καταστάσεις αυτές περιγράφονται συνοπτικά ακολούθως: 1) δεν υπάρχουν ενδείξεις μεταλλαξιγένεσης (π.χ. δεν υπάρχει απόκριση δόσης, ούτε συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης που να υπερβαίνουν εκείνες που παρατηρούνται στον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα ή στα ιστορικά εύρη υποβάθρου κ.λπ.) σε σειρά σημείων δεδομένων εντός της κλίμακας 100 % έως 20 % RTG/RS, και υπάρχει τουλάχιστον ένα σημείο δεδομένων εντός της κλίμακας 20 και 25 % RTG/RS, 2) δεν υπάρχουν ενδείξεις μεταλλαξιγένεσης (π.χ. δεν υπάρχει απόκριση δόσης, ούτε συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης που να υπερβαίνουν όσες παρατηρούνται στον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα ή στα ιστορικά εύρη υποβάθρου κ.λπ.) σε σειρά σημείων δεδομένων εντός της κλίμακας 100 % έως 25 % RTG/RS, και υπάρχει επίσης ένα αρνητικό σημείο δεδομένων ελαφρώς κάτω του 10 % RTG/RS. Και στις δύο αυτές καταστάσεις, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να θεωρηθεί οριστικά αρνητική.

69. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφώς θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων.

70. Όταν η απόκριση δεν είναι ούτε σαφώς αρνητική ούτε σαφώς θετική, όπως περιγράφεται ανωτέρω, και/ή για να διαπιστωθεί η βιολογική σημασία ενός αποτελέσματος, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση των ειδικών και/ή περαιτέρω διερεύνηση. Η επανάληψη του πειράματος, ενδεχομένως με χρήση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [π.χ. διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων για την αύξηση της πιθανότητας επίτευξης σημείων δεδομένων εντός της κλίμακας 10-20 % RTG/RS, χρήση άλλων συνθηκών μεταβολικής ενεργοποίησης (δηλ. συγκέντρωση S9 ή προέλευση S9) και διάρκεια αγωγής] μπορεί να είναι χρήσιμη.

71. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμη και μετά από περαιτέρω διερεύνηση, το σύνολο δεδομένων δεν επιτρέπει να συναχθούν θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, η απόκριση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να κρίνεται αμφίβολη (να ερμηνεύεται ως εξίσου δυνάμενη να είναι είτε θετική είτε αρνητική).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

72. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη,

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Κύτταρα:

Για κύριες εργαστηριακές καλλιέργειες:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων, και ιστορικό στο εργαστήριο δοκιμών,

— χαρακτηριστικά καρυότυπου και/ή χαρακτηριστικός αριθμός χρωμοσωμάτων,

— μέθοδοι διατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών,

— απουσία μυκοπλάσματος,

— χρόνοι διπλασιασμού των κυττάρων.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων και του αριθμού των κυτταρικών καλλιεργειών, περιλαμβανομένων π.χ. των δεδομένων κυτταροτοξικότητας και των περιορισμών διαλυτότητας,

— σύνθεση των θρεπτικών μέσων, συγκέντρωση CO_2, επίπεδο υγρασίας,

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εκφραζόμενη ως τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (π.χ. μg ή mg/mL ή mM θρεπτικού μέσου καλλιέργειας),

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του διαλύτη και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας,

— θερμοκρασία επώασης,

— χρόνος επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την αγωγή,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης (προέλευση του S9, μέθοδος παρασκευής του μείγματος S9, συγκέντρωση ή όγκος του μείγματος S9 και του S9 στο τελικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ποιοτικοί έλεγχοι του S9),

— χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, τελικές συγκεντρώσεις για κάθε συνθήκη αγωγής,

— διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιεργηθέντων κυττάρων και των χρονοδιαγραμμάτων ανακαλλιέργειας και τροφοδοσίας, κατά περίπτωση),

— ταυτότητα του παράγοντα επιλογής και συγκέντρωσή του,

— για την MLA, θα πρέπει να αναφέρεται η χρησιμοποιηθείσα έκδοση (άγαρ ή μικροτιτλοδότηση),

— κριτήρια αποδοχής των δοκιμών,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας,

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε,

— διάρκεια των χρόνων επώασης μετά την επίστρωση,

— ορισμός των αποικιών σχετικά με το μέγεθος και τον τύπο τους (συμπεριλαμβανομένων των κριτηρίων κατάταξης σε «μικρές» και «μεγάλες» αποικίες, όπου απαιτείται),

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του pH, της ωσμωμοριακότητας, εφόσον προσδιορίζεται, και της καθίζησης, εάν χρειάζεται.

Αποτελέσματα:

— αριθμός κυττάρων που υποβλήθηκαν σε αγωγή και αριθμός κυττάρων ανακαλλιέργειας για κάθε καλλιέργεια,

— παράμετροι τοξικότητας (RTG για την MLA και RS για την TK6),

— σημεία καθίζησης και χρόνος προσδιορισμού,

— αριθμός κυττάρων που επιστρώθηκαν σε επιλεκτικό και μη επιλεκτικό μέσο,

— αριθμός αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο και αριθμός ανθεκτικών αποικιών σε επιλεκτικό μέσο, και αντίστοιχες συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης,

— μέγεθος αποικιών για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες και, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι θετική, τουλάχιστον μία συγκέντρωση, και σχετικές συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— δεδομένα για παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες),

— δεδομένα για τους ιστορικούς αρνητικούς (με διαλύτη) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες), με εύρη τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις· αριθμός δοκιμών στις οποίες βασίζονται οι ιστορικοί μάρτυρες,

— στατιστικές αναλύσεις (για μεμονωμένες καλλιέργειες και συγκεντρωτικές πανομοιότυπες καλλιέργειες, ανάλογα με την περίπτωση), και τιμές p, εάν υπάρχουν· και για την MLA, η αξιολόγηση GEF.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

(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. (Χειρόγραφο υπό επεξεργασία).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Στο: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW· Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Στο: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Στο: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Στο: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ανευπλοειδογόνος ουσία: κάθε χημική ουσία ή διεργασία που προκαλεί ανευπλοειδία σε κύτταρα ή οργανισμούς, μέσω της αντίδρασής της με τα συστατικά του κυτταρικού κύκλου μιτωτικής και μειωτικής διαίρεσης.

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων κατά ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως κατά πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Μεταλλαξιγόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων: χημικές ουσίες που προκαλούν υποκατάσταση ζευγών βάσεων στο DNA.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Απόδοση κλωνοποίησης: το ποσοστό των κυττάρων που επιστρώνονται σε χαμηλή πυκνότητα και μπορούν να αναπτυχθούν σε καταμετρήσιμη αποικία.

Κλαστογόνο: κάθε χημική ουσία ή διεργασία που προκαλεί δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε πληθυσμούς κυττάρων ή οργανισμούς.

Κυτταροτοξικότητα: για τις δοκιμασίες που καλύπτονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, η κυτταροτοξικότητα ορίζεται ως μείωση της σχετικής συνολικής ανάπτυξης (RTG) ή της σχετικής επιβίωσης (RS) για τις δοκιμές MLA και TK6 αντίστοιχα.

Εξελικτική μετάλλαξη: γονιδιακή μετάλλαξη από τον γονικό τύπο προς το προϊόν μετάλλαξης, που προκαλεί τροποποίηση ή απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας ή της λειτουργίας της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης.

Μεταλλαξιγόνα μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου: χημικές ουσίες που προκαλούν προσθήκη ή απάλειψη ενός ή πολλών ζευγών βάσεων στο μόριο DNA.

Γονιδιοτοξικός: γενικός όρος που καλύπτει όλα τα είδη βλαβών του DNA ή των χρωμοσωμάτων, μεταξύ των οποίων τις ρήξεις, τις προσθήκες, τις αναδιατάξεις, τις μεταλλάξεις, τις χρωμοσωμικές εκτροπές και την ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλα τα είδη γονιδιοτοξικών επιδράσεων μεταλλάξεις ή μόνιμη χρωμοσωμική βλάβη.

Μιτωτικός ανασυνδυασμός: στη διάρκεια της μίτωσης, ο ανασυνδυασμός μεταξύ ομόλογων χρωματίδων που μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή δίκλωνων ρήξεων του DNA ή απώλεια ετεροζυγωτικότητας.

Μεταλλαξιγόνο: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή μίας ή περισσότερων αλληλουχιών ζευγών βάσεων του DNA σε γονίδια ή της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωμικές εκτροπές).

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (mutant frequency, MF): ο αριθμός των παρατηρουμένων μεταλλαγμένων κυττάρων διά του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης: περίοδος μετά την αγωγή κατά την οποία η γενετική αλλοίωση εγκαθίσταται στο γονιδίωμα και τυχόν προϋπάρχοντα γονιδιακά προϊόντα μειώνονται σε βαθμό τέτοιο ώστε να αλλοιώνεται το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό.

Σχετική επιβίωση (relative survival, RS): η RS χρησιμοποιείται ως το μέτρο της σχετιζόμενης με την αγωγή κυτταροτοξικότητας στην ΤΚ6. Είναι η σχετική απόδοση κλωνοποίησης (CE) των κυττάρων που επιστρώνονται αμέσως μετά την αγωγή, διορθωμένη ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά την αγωγή, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης του αρνητικού μάρτυρα.

Σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος (relative suspension growth, RSG): στην MLA, η σχετική συνολική ανάπτυξη εναιωρήματος δύο ημερών της καλλιέργειας δοκιμής σε σύγκριση με τη συνολική ανάπτυξη εναιωρήματος δύο ημερών του αρνητικού μάρτυρα/μάρτυρα με διαλύτη (Clive and Spector, 1975). Η RSG θα πρέπει να περιλαμβάνει τη σχετική ανάπτυξη της καλλιέργειας δοκιμής σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα/μάρτυρα με διαλύτη κατά τη διάρκεια της περιόδου αγωγής.

Σχετική συνολική ανάπτυξη (relative total growth, RTG): η RTG χρησιμοποιείται ως το μέτρο της σχετιζόμενης με την αγωγή κυτταροτοξικότητας στην MLA. Αποτελεί μέτρο της σχετικής (ως προς τον μάρτυρα με φορέα) ανάπτυξης των καλλιεργειών δοκιμής κατά τη φάση της αγωγής, της έκφρασης δύο ημερών και της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης της δοκιμής. Η RSG κάθε καλλιέργειας δοκιμής πολλαπλασιάζεται με τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης της καλλιέργειας δοκιμής κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης και εκφράζεται σε σχέση με την απόδοση κλωνοποίησης του αρνητικού μάρτυρα/μάρτυρα με διαλύτη (Clive and Spector, 1975).

Ηπατικά κλάσματα S9: υπερκείμενο υγρό ομογενοποιήματος ήπατος μετά από φυγοκέντρηση σε 9 000 g, δηλ. ανεπεξέργαστο εκχύλισμα ήπατος.

Μείγμα S9: μείγμα του ηπατικού κλάσματος S9 με συμπαράγοντες αναγκαίους για τη δράση των μεταβολικών ενζύμων.

Ανάπτυξη εναιωρήματος (suspension growth, SG): ο συντελεστής αύξησης του αριθμού των κυττάρων στη διάρκεια των φάσεων αγωγής και έκφρασης της MLA. Η SG υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον συντελεστή αύξησης την ημέρα 1 επί τον συντελεστή αύξησης την ημέρα 2 για τη βραχυχρόνια αγωγή (3 ή 4 ωρών). Σε περίπτωση που εφαρμόζεται αγωγή 24 ωρών, η SG είναι ο συντελεστής αύξησης στη διάρκεια της αγωγής 24 ωρών επί τους συντελεστές αύξησης τις ημέρες έκφρασης 1 και 2.

Μάρτυρας με διαλύτη: γενικός όρος για τον προσδιορισμό των καλλιεργειών-μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο τον διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή: καλλιέργειες που δεν υφίστανται καμία αγωγή (δηλ. ούτε με την υπό δοκιμή χημική ουσία ούτε με διαλύτη), αλλά ετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο με τις καλλιέργειες που λαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Προσάρτημα 2

ΤΥΠΟΙ

Κυτταροτοξικότητα

Για αμφότερες τις εκδόσεις (άγαρ και μικροτιτλοδότησης) της MLA

Η κυτταροτοξικότητα ορίζεται ως η σχετική συνολική ανάπτυξη (RTG) που περιλαμβάνει τη σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος (RSG) κατά τη διάρκεια της περιόδου έκφρασης διάρκειας δύο ημερών και τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης (RCE) που μετράται κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής των προϊόντων μετάλλαξης. Οι RTG, RSG και RCE εκφράζονται όλες ως ποσοστά.

Υπολογισμός της RSG: Η ανάπτυξη εναιωρήματος 1 (SG_1) είναι ο ρυθμός ανάπτυξης μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 1 (συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 1 / συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 0) και η ανάπτυξη εναιωρήματος 2 (SG_2) είναι ο ρυθμός ανάπτυξης μεταξύ της ημέρας 1 και της ημέρας 2 (συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 2 / συγκέντρωση κυττάρων την ημέρα 1). Η RSG είναι η συνολική SG (SG_1 x SG_2) για την υποβληθείσα σε αγωγή καλλιέργεια σε σύγκριση με τον μάρτυρα χωρίς αγωγή / μάρτυρα με διαλύτη. Δηλαδή: RSG = $[SG_{1(\text{δοκιμή})}$ x $SG_{2(\text{δοκιμή})}]$ / $[SG_{1(\text{μάρτυρας})}$ x $SG_{2(\text{μάρτυρας})}]$ Η SG_1 θα πρέπει να υπολογίζεται από την αρχική συγκέντρωση κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή της αγωγής των κυττάρων. Κατ' αυτόν τον τρόπο αποτυπώνεται τυχόν διαφορετική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζεται στην ή στις καλλιέργειες δοκιμής κατά τη διάρκεια της αγωγής των κυττάρων.

Η RCE είναι η σχετική απόδοση κλωνοποίησης της καλλιέργειας δοκιμής σε σύγκριση με τη σχετική απόδοση κλωνοποίησης του μάρτυρα χωρίς αγωγή / μάρτυρα με διαλύτη που μετράται κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης.

Σχετική συνολική ανάπτυξη (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Σχετική επιβίωση (RS):

Η κυτταροτοξικότητα αξιολογείται βάσει της σχετικής επιβίωσης, δηλαδή της απόδοσης κλωνοποίησης (CE) κυττάρων επιστρωμένων αμέσως μετά την αγωγή, προσαρμοσμένη ως προς τυχόν απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, σε σύγκριση με την απόδοση κλωνοποίησης στους αρνητικούς μάρτυρες (στους οποίους έχει αποδοθεί επιβίωση 100 %). Η προσαρμογή ως προς την απώλεια κυττάρων κατά την αγωγή μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{προσαρμοσμένη CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{αριθμός κυττάρων στο τέλος της αγωγής}}{\textit{αριθμός κυττάρων στην αρχή της αγωγής}}$$

Η RS για καλλιέργεια που υποβάλλεται σε αγωγή υπολογίζεται ως εξής:

$$RS = \frac{\textit{προσαρμοσμένη CE στην καλλιέργεια αγωγής}}{\textit{προσαρμοσμένη CE στον μάρτυρα με διαλύτη}} \times 100$$

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης για αμφότερες τις δοκιμές MLA και TK6

Η συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης (MF) είναι η απόδοση κλωνοποίησης μεταλλαγμένων αποικιών σε επιλεκτικό μέσο (CE_M), προσαρμοσμένη ως προς την απόδοση κλωνοποίησης σε μη επιλεκτικό μέσο κατά τη χρονική στιγμή της επιλογής προϊόντων μετάλλαξης (CE_V). Δηλαδή $MF=CE_M/CE_V$. Ο υπολογισμός αυτών των δύο τιμών απόδοσης κλωνοποίησης περιγράφεται παρακάτω για τις μεθόδους κλωνοποίησης με άγαρ και μικροτιτλοδότηση.

'Έκδοση MLA με άγαρ': Στην έκδοση της MLA με μαλακό άγαρ, ο αριθμός των αποικιών στο τρυβλίο επιλογής προϊόντων μετάλλαξης (C_M) και ο αριθμός αποικιών στο μη επιλεκτικό τρυβλίο ή τρυβλίο απόδοσης κλωνοποίησης (καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων) (C_V) υπολογίζονται μέσω απευθείας καταμέτρησης των κλώνων. Όταν επιστρώνονται 600 κύτταρα για την απόδοση κλωνοποίησης (CE) για τα τρυβλία επιλογής προϊόντων μετάλλαξης (CE_M) και τα μη επιλεκτικά τρυβλία ή τρυβλία απόδοσης κλωνοποίησης (καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων) (CE_V) και 3×10^6 κύτταρα χρησιμοποιούνται για επιλογή προϊόντων μετάλλαξης,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

'Έκδοση μικροτιτλοδότησης MLA και TK6: Στην έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA, οι C_M και C_V προσδιορίζονται ως το γινόμενο του συνολικού αριθμού κοιλοτήτων (TW) επί του πιθανού αριθμού αποικιών ανά κοιλότητα (P) στα τρυβλία μικροτιτλοδότησης.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$CV = P_V \times TW_V$$

Από τον μηδενικό όρο της κατανομής Poisson (Furth et al., 1981), το P προκύπτει από τον τύπο

$$P = - \ln (EW / TW)$$

όπου EW είναι οι κενές κοιλότητες και TW είναι οι συνολικές κοιλότητες. Ως εκ τούτου:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Στην έκδοση μικροτιτλοδότησης της MLA, οι συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης μικρών και μεγάλων αποικιών υπολογίζονται με πανομοιότυπο τρόπο, με χρήση του σχετικού αριθμού κενών κοιλοτήτων για τις μικρές και τις μεγάλες αποικίες.

Στην TK6, οι συχνότητες προϊόντων μετάλλαξης μικρών και μεγάλων αποικιών βασίζονται στα πρώιμα εμφανιζόμενα και τα όψιμα εμφανιζόμενα προϊόντα μετάλλαξης.

B.68 **IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΑΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ i) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ii) ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Η ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 491 του ΟΟΣΑ (2017). Η μέθοδος βραχυχρόνιας έκθεσης (STE) είναι *in vitro* μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιείται σε ορισμένες περιστάσεις και με συγκεκριμένους περιορισμούς για την ταξινόμηση και την επισήμανση της επικινδυνότητας των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη, καθώς και εκείνων που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως ουσίες που προκαλούν είτε σοβαρή οφθαλμική βλάβη είτε οφθαλμικό ερεθισμό, όπως ορίζονται στο Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών (GHS) των Ηνωμένων Εθνών (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1]).

2. Εδώ και πολλά χρόνια, το δυναμικό επικινδυνότητας των χημικών προϊόντων για τους οφθαλμούς αξιολογείται με χρήση κυρίως μιας *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια [μέθοδος δοκιμών B.5 (8), ισοδύναμη με την TG 405 του ΟΟΣΑ]. Είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο εγγύς μέλλον, καμία μεμονωμένη εναλλακτική δοκιμή *in vitro* δεν θα μπορέσει να αντικαταστήσει πλήρως την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια από την άποψη της πρόβλεψης του πλήρους φάσματος αποκρίσεων σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού για τις διάφορες χημικές κατηγορίες. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτής) στρατηγικής δοκιμών θα μπορούσαν κάλλιστα να αντικαταστήσουν πλήρως την οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια (2). Η καθοδική προσέγγιση έχει σχεδιαστεί για τη διεξαγωγή δοκιμών χημικών ουσιών για τις οποίες μπορεί να αναμένεται, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, ότι παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό ερεθιστικότητας ή προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Αντιθέτως, η ανοδική προσέγγιση έχει σχεδιαστεί για τη διεξαγωγή δοκιμών χημικών ουσιών για τις οποίες μπορεί να αναμένεται, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, ότι δεν προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό σε βαθμό που να απαιτείται η ταξινόμησή τους. Παρότι η μέθοδος δοκιμών STE δεν θεωρείται ότι αντικαθιστά πλήρως την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια, εντούτοις είναι κατάλληλη για χρήση στο πλαίσιο κλιμακωτής στρατηγικής δοκιμών για λόγους κανονιστικής ταξινόμησης και επισήμανσης, όπως η καθοδική/ανοδική προσέγγιση, για τον προσδιορισμό, χωρίς περαιτέρω δοκιμές, i) των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και ii) των χημικών ουσιών (με εξαίρεση τις ουσίες υψηλής πτητικότητας και όλες τις στερεές χημικές ουσίες, εκτός των επιφανειοδραστικών) που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό ή σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (1)(2). Ωστόσο, για την οριστική ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας για την οποία η μέθοδος δοκιμών STE δεν προβλέπει ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) ούτε την κατατάσσει σε κατηγορία GHS του ΟΗΕ / κανονισμού CLP (δεν προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη ούτε οφθαλμικό ερεθισμό) θα χρειαστούν συμπληρωματικές δοκιμές. Επιπλέον, θα πρέπει να ζητείται η γνώμη των αρμόδιων ρυθμιστικών αρχών πριν από τη χρήση της μεθόδου STE στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης βάσει συστημάτων ταξινόμησης εκτός από το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών και η χρήση αυτής είναι ζητήματα που θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο των πληροφοριών που παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση για τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη και τον οφθαλμικό ερεθισμό» του ΟΟΣΑ (14).

3. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικής επικινδυνότητας που ενέχει η υπό δοκιμή ουσία, με βάση την ικανότητά της να προκαλεί κυτταροτοξικότητα στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών βραχυχρόνιας έκθεσης. Η κυτταροτοξική επίδραση των χημικών ουσιών στα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς αποτελεί σημαντικό τρόπο δράσης που οδηγεί στην πρόκληση βλάβης στο επιθήλιο του κερατοειδούς και οφθαλμικό ερεθισμό. Η κυτταρική βιωσιμότητα στη μέθοδο δοκιμών STE αξιολογείται διά του ποσοτικού προσδιορισμού, μετά την εκχύλισή του από τα κύτταρα, του κυανού άλατος φορμαζάνης που παράγεται από τα ζώντα κύτταρα μέσω ενζυμικής μετατροπής της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT (βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο), γνωστής και ως βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου (3). Η επιτευχθείσα κυτταρική βιωσιμότητα συγκρίνεται με τον μάρτυρα με διαλύτη (σχετική βιωσιμότητα) και χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η δυνητική οφθαλμική επικινδυνότητα που ενέχει η υπό δοκιμή χημική ουσία. Μια υπό δοκιμή χημική ουσία ταξινομείται ως κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP όταν αμφότερες οι συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 % δίνουν κυτταρική βιωσιμότητα μικρότερη ή ίση με (≤) 70 %. Αντιθέτως, μια χημική ουσία προβλέπεται ότι αποτελεί ουσία καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP όταν αμφότερες οι συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 % δίνουν κυτταρική βιωσιμότητα υψηλότερη από (>) 70 %.

4. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών STE στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε πρωτόκολλο που ανέπτυξε η Kao Corporation (4), το οποίο αποτέλεσε αντικείμενο δύο διαφορετικών μελετών επικύρωσης: μίας μελέτης της επιτροπής επικύρωσης της ΙαπωνικήςΕταιρείας

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

Εναλλακτικών Μεθόδων προς τα Πειράματα σε Ζώα (JSAAE) (5) και μίας δεύτερης μελέτης του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM) (6). Τα NICEATM/ICCVAM πραγματοποίησαν αξιολόγηση από ομοτίμους με βάση τις εκθέσεις των μελετών επικύρωσης και τα έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τη μέθοδο δοκιμών (7).

6. Όταν η μέθοδος δοκιμών STE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη [κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (1)], τα δεδομένα που ελήφθησαν για 125 χημικά προϊόντα (περιλαμβανομένων ουσιών και μειγμάτων), παρουσίαζαν συνολική ορθότητα 83 % (104/125), ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων 1 % (1/86) και ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων 51 % (20/39) σε σύγκριση με την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια (7). Το ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων δεν είναι κρίσιμης σημασίας στο παρόν πλαίσιο, δεδομένου ότι όλες οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που επάγουν κυτταρική βιωσιμότητα ≤ 70 % σε συγκέντρωση 5 % και > 70 % σε συγκέντρωση 0,05 % ελέγχονται στη συνέχεια με επαρκώς επικυρωμένες μεθόδους δοκιμών *in vitro* ή, ως έσχατη επιλογή, με την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις και σύμφωνα με τη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών και τις επί του παρόντος συνιστώμενες προσεγγίσεις βάρους της απόδειξης (1) (8). Υποβλήθηκαν σε δοκιμή κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αν και υπάρχουν επίσης περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων. Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Ωστόσο, πριν από τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Η μέθοδος δοκιμών STE δεν παρουσίασε άλλα ειδικά μειονεκτήματα όταν χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως ουσιών κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP. Οι ερευνητές μπορούν να εξετάζουν το ενδεχόμενο να χρησιμοποιούν την παρούσα μέθοδο δοκιμών, οπότε και η κυτταρική βιωσιμότητα ≤ 70 % σε συγκέντρωση 5 % και 0,05 % θα πρέπει να γίνεται δεκτή ως ενδεικτική απόκρισης που προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη που θα πρέπει να ταξινομηθεί ως κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP χωρίς τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

7. Όταν η μέθοδος δοκιμών STE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που δεν χρειάζονται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό και τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία 1 GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP), τα δεδομένα που ελήφθησαν για 130 χημικά προϊόντα (περιλαμβανομένων ουσιών και μειγμάτων), παρουσίαζαν συνολική ορθότητα 85 % (110/130), ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων 12 % (9/73) και ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων 19 % (11/57) σε σύγκριση με την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή σε κουνέλια (7). Όταν από το σύνολο δεδομένων αποκλείονται οι ουσίες υψηλής πτητικότητας και οι στερεές ουσίες, εκτός των επιφανειοδραστικών, η συνολική ορθότητα βελτιώνεται σε 90 % (92/102), το ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων σε 2 % (1/54), και το ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων σε 19 % (9/48) (7). Ως εκ τούτου, τα πιθανά μειονεκτήματα της μεθόδου δοκιμών STE, όταν χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν χρειάζονται ταξινόμηση ως ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό και σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP), είναι το υψηλό ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων με i) ουσίες υψηλής πτητικότητας με τάση ατμών πάνω από 6 kPa και ii) στερεά χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα) εκτός των επιφανειοδραστικών και των μειγμάτων που αποτελούνται μόνο από επιφανειοδραστικά. Αυτά τα χημικά προϊόντα αποκλείονται από το πεδίο εφαρμοσιμότητας της μεθόδου δοκιμών STE (7).

8. Εκτός των χημικών προϊόντων που αναφέρονται στις παραγράφους 6 και 7, στο σύνολο δεδομένων που παρήχθη με τη μέθοδο δοκιμών STE περιλαμβάνονται επίσης εσωτερικά δεδομένα της επιχείρησης για 40 μείγματα, τα οποία, όταν συγκρίθηκαν με τα δεδομένα της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής Draize, εμφάνισαν ορθότητα 88 % (35/40), ποσοστό ψευδοθετικών εκβάσεων 50 % (5/10) και ποσοστό ψευδοαρνητικών εκβάσεων 0 % (0/30) όσον αφορά την πρόβλεψη για μείγματα που δεν χρειάζονται ταξινόμηση βάσει των συστημάτων ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ / κανονισμού CLP (9). Ως εκ τούτου, η μέθοδος δοκιμών STE μπορεί να εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό μειγμάτων ως μειγμάτων «καμίας κατηγορίας» κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης, με εξαίρεση τα στερεά μείγματα, εκτός εκείνων που αποτελούνται μόνο από επιφανειοδραστικά, κατά προέκταση του περιορισμού της στις στερεές χημικές ουσίες. Επιπλέον, τα μείγματα που περιέχουν ουσίες με τάση ατμών υψηλότερη από 6kPa θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή, προκειμένου να αποφεύγονται ενδεχόμενες υποπροβλέψεις, και η αξιολόγησή τους θα πρέπει να αιτιολογείται κατά περίπτωση.

9. Η μέθοδος δοκιμών STE δεν μπορεί να χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως «κατηγορίας 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP» ή «κατηγορίας 2A (οφθαλμικός ερεθισμός) ή 2B (ήπιος οφθαλμικός ερεθισμός) κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP», λόγω του σημαντικού αριθμού χημικών ουσιών κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP που υποπροβλέπονται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B και των χημικών ουσιών καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP που υπερπροβλέπονται ως κατηγορίας 2, 2A ή 2B (7). Για τον σκοπό αυτό, ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές με άλλη κατάλληλη μέθοδο.

10. Η μέθοδος δοκιμών STE είναι κατάλληλη για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή εναιωρούνται ομοιόμορφα για τουλάχιστον 5 λεπτά σε φυσιολογικό ορό, σε 5 % διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε αλατούχο διάλυμα, ή σε ορυκτέλαιο. Η μέθοδος δοκιμών STE δεν είναι κατάλληλη για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι μη διαλυτές ή δεν μπορούν να εναιωρηθούν ομοιόμορφα για τουλάχιστον 5 λεπτά σε φυσιολογικό ορό, σε 5 % διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε αλατούχο διάλυμα, ή σε ορυκτέλαιο. Η χρήση ορυκτελαίου στη μέθοδο δοκιμών STE είναι εφικτή λόγω της βραχυχρόνιας έκθεσης. Ως εκ τούτου, η μέθοδος δοκιμών STE είναι κατάλληλη για την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικής επικινδυνότητας μη υδατοδιαλυτών χημικών ουσιών (π.χ. λιπαρές αλκοόλες ή κετόνες μακράς αλυσίδας άνθρακα) εφόσον μπορούν να αναμειχθούν με τουλάχιστον έναν από τους ανωτέρω προτεινόμενους διαλύτες (4).

11. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή ([1]) και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών STE στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Η μέθοδος δοκιμών STE είναι μια *in vitro* δοκιμασία που βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα και που διεξάγεται σε συνεχή μονοστιβάδα κυττάρων Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC), η οποία φέρεται σε τρυβλίο μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων από πολυκαρβονικό εστέρα (4). Μετά από έκθεση διάρκειας πέντε λεπτών σε υπό δοκιμή χημική ουσία, η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται ποσοτικά ως η σχετική βιωσιμότητα των κυττάρων SIRC με χρήση της δοκιμασίας MTT (4). Η μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη των δυνητικών δυσμενών επιδράσεων που προκαλούν οφθαλμική βλάβη.

13. Έχει αναφερθεί ότι το 80 % διαλύματος που ενσταλάζεται στον οφθαλμό κουνελιού απεκκρίνεται μέσω του σάκου του επιπεφυκότα εντός τριών έως τεσσάρων λεπτών, ενώ ποσότητα άνω του 80 % διαλύματος που ενσταλάζεται στον ανθρώπινο οφθαλμό απεκκρίνεται εντός ενός ή δύο λεπτών (10). Με τη μέθοδο δοκιμών STE επιχειρείται η προσέγγιση αυτών των χρόνων έκθεσης και χρησιμοποιείται η κυτταροτοξικότητα ως παράμετρος για την αξιολόγηση της έκτασης της βλάβης που προκαλείται στα κύτταρα SIRC μετά από έκθεση διάρκειας πέντε λεπτών στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

14. Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη μέθοδο δοκιμών STE που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα ταξινομώντας σωστά τις έντεκα συνιστώμενες ουσίες του πίνακα 1. Οι εν λόγω ουσίες επιλέχτηκαν ως αντιπροσωπευτικές του πλήρους φάσματος αποκρίσεων όσον αφορά τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή τον οφθαλμικό ερεθισμό με βάση τα αποτελέσματα *in vivo* οφθαλμικών δοκιμών σε κουνέλια (TG 405) και το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (1). Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν: οι ουσίες θα πρέπει να διατίθενται στο εμπόριο και θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας από τη μέθοδο δοκιμών STE (3). Σε περιπτώσεις όπου μια απαριθμούμενη ουσία δεν είναι διαθέσιμη, ή εφόσον αιτιολογείται, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη ουσία για την οποία υπάρχουν επαρκή δεδομένα αναφοράς *in vivo* και *in vitro*, υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται τα ίδια κριτήρια επιλογής που περιγράφονται στο παρόν σημείο.

Πίνακας 1

Κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας

Ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία in vivo κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP ([2])	Διαλύτης στη δοκιμή STE	Κατηγορία STE κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (10 %, υδατικό)	8001-54-5	Ένωση κατιόντων υδριδίων	Υγρό	Κατηγορία 1	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1

([1]) Τον Ιούνιο του 2013 η κοινή συνεδρίαση συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλέον με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες μεθόδους δοκιμών.

Ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία in vivo κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (2)	Διαλύτης στη δοκιμή STE	Κατηγορία STE κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Αιθέρας	Υγρό	Κατηγορία 1	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1
Acid Red 92	18472-87-2	Ετεροκυκλική ένωση, βρωμιούχος ένωση, χλωριούχος ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1
Υδροξείδιο του νατρίου	1310-73-2	Άλκαλι Ανόργανο χημικό προϊόν	Στερεό	Κατηγορία 1 (3)	Αλατούχο διάλυμα	Κατηγορία 1
Βουτυρολακτόνη	96-48-0	Λακτόνη, ετεροκυκλική ένωση	Υγρό	Κατηγορία 2A (κατηγορία 2 στον κανονισμό CLP)	Αλατούχο διάλυμα	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
1-Οκτανόλη	111-87-5	Αλκοόλη	Υγρό	Κατηγορία 2A/B (4)(κατηγορία 2 στον κανονισμό CLP)	Ορυκτέλαιο	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
Κυκλοπεντανόλη	96-41-3	Αλκοόλη, υδρογονάνθρακας, κυκλικός	Υγρό	Κατηγορία 2A/B (5) (κατηγορία 2 στον κανονισμό CLP)	Αλατούχο διάλυμα	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
Οξικός 2-αιθοξυαιθυλεστέρας	111-15-9	Αλκοόλη, αιθέρας	Υγρό	Καμία κατηγορία	Αλατούχο διάλυμα	Καμία κατηγορία
Δωδεκάνιο	112-40-3	Υδρογονάνθρακας, άκυκλος	Υγρό	Καμία κατηγορία	Ορυκτέλαιο	Καμία κατηγορία
Μεθυλοϊσοβουτυλοκετόνη	108-10-1	Κετόνη	Υγρό	Καμία κατηγορία	Ορυκτέλαιο	Καμία κατηγορία

Ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία in vivo κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (2)	Διαλύτης στη δοκιμή STE	Κατηγορία STE κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP
Θειική 1,1-διμεθυλογουανιδίνη	598-65-2	Αμιδίνη, ένωση θείου	Στερεό	Καμία κατηγορία	Αλατούχο διάλυμα	Καμία κατηγορία

(1) Οι χημικές κατηγορίες αποδόθηκαν βάσει πληροφοριών που ελήφθησαν από προηγούμενες δημοσιεύσεις του NICEATM και, όπου δεν υπήρχαν, με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH®) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (μέσω του ChemIDplus®, στη διεύθυνση http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) και βάσει των δομών που προσδιορίστηκαν από το NICEATM.

(2) Βάσει των αποτελεσμάτων της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (TG 405 του ΟΟΣΑ) και σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (1).

(3) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 1 βασίζεται στο δυναμικό διαβρωτικότητας στο δέρμα υδροξειδίου του νατρίου 100 % (που απαριθμείται στην TG 435 του ΟΟΣΑ ως χημική ουσία ελέγχου ικανότητας με δυναμικό διαβρωτικότητας στο δέρμα) και το κριτήριο για την κατηγορία 1 του GHS του ΟΗΕ / του κανονισμού CLP (1).

(4) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 2A ή 2B εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS του ΟΗΕ για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2A είναι απαραίτητο να εμφανίζουν επιδράσεις την 7η ημέρα 2 από τα 6 ζώα έναντι 4 από τα 6 ζώα. Το *in vivo* σύνολο δεδομένων περιλάμβανε 2 μελέτες με 3 ζώα η καθεμία. Σε μία μελέτη δύο από τα τρία ζώα εμφάνισαν επιδράσεις την 7η ημέρα, γεγονός που δικαιολογεί την ταξινόμηση στην κατηγορία 2A (11), ενώ στη δεύτερη μελέτη όλες οι παράμετροι και στα τρία ζώα επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την 7η ημέρα, γεγονός που δικαιολογεί ταξινόμηση στην κατηγορία 2B (12).

(5) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 2A ή 2B εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS του ΟΗΕ για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2A είναι απαραίτητο να εμφανίζουν επιδράσεις την 7η ημέρα 1 από τα 3 ζώα έναντι 2 από τα 3 ζώα. Η *in vivo* μελέτη περιελάμβανε 3 ζώα. Όλες οι παράμετροι, εκτός από τη θολερότητα του κερατοειδούς και το ερύθημα του επιπεφυκότος σε ένα ζώο, επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την ημέρα 7 ή νωρίτερα. Το ένα ζώο που δεν είχε αναρρώσει πλήρως την ημέρα 7 παρουσίαζε θολερότητα του κερατοειδούς βαθμού 1 και ερύθημα επιπεφυκότος βαθμού 1 (την ημέρα 7), τα οποία είχαν υποχωρήσει πλήρως την ημέρα 14 (11).

Συντομογραφίες: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή της κυτταρικής μονοστιβάδας

15. Για τη διεξαγωγή της μεθόδου δοκιμών STE θα πρέπει να χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά κερατοειδούς κουνελιού SIRC. Συνιστάται τα κύτταρα SIRC να λαμβάνονται από καλώς πιστοποιημένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection CCL60.

16. Τα κύτταρα SIRC καλλιεργούνται στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2 εντός φιάλης καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο που αποτελείται από θρεπτικό μέσο ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (MEM), συμπληρωμένο με 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), 2 mM L-γλουταμίνης, 50–100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 50–100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα που έχουν συρρεύσει στη φιάλη καλλιέργειας θα πρέπει να διαχωρίζονται με χρήση διαλύματος θρυψίνης-αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος, με ή χωρίς χρήση ξέστρου κυττάρων. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (π.χ. 2 έως 3 ανακαλλιέργειες) σε φιάλη καλλιέργειας προτού χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές στην καθημερινή πρακτική, και δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερες από 25 ανακαλλιέργειες μετά την απόψυξη.

17. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που είναι έτοιμα για χρήση στη δοκιμή STE φέρονται στην κατάλληλη πυκνότητα και εμβολιάζονται στα τρυβλία 96 κοιλοτήτων. Η συνιστώμενη πυκνότητα εμβολιασμού κυττάρων είναι $6{,}0 \times 10^3$ κύτταρα ανά κοιλότητα, όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούνται τέσσερις ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ή $3{,}0 \times 10^3$ κύτταρα ανά κοιλότητα, όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούνται πέντε ημέρες μετά τον εμβολιασμό, σε όγκο καλλιέργειας 200 μl. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή STE και τα οποία εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο στην κατάλληλη πυκνότητα φτάνουν σε συρροή άνω του 80 % κατά τη χρονική στιγμή της δοκιμής, δηλαδή τέσσερις ή πέντε ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

18. Ο διαλύτης πρώτης επιλογής για τη διάλυση ή την εναιώρηση υπό δοκιμή χημικών ουσιών είναι ο φυσιολογικός ορός. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα ή δεν μπορεί να διαλυθεί ή να εναιωρηθεί ομοιόμορφα για τουλάχιστον πέντε λεπτά σε αλατούχο διάλυμα, ως διαλύτης δεύτερης επιλογής χρησιμοποιείται 5 % DMSO (CAS#67-68-5) σε αλατούχο διάλυμα. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν μπορούν να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν ομοιόμορφα για τουλάχιστον πέντε λεπτά σε αλατούχο διάλυμα ή σε 5 % DMSO σε αλατούχο διάλυμα, ως διαλύτης τρίτης επιλογής χρησιμοποιείται ορυκτέλαιο (CAS#8042-47-5).

19. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή εναιωρούνται ομοιόμορφα στον επιλεγμένο διαλύτη σε συγκέντρωση 5 % κ.β. και αραιώνονται περαιτέρω σε διαδοχικές αραιώσεις κατά 10 φορές μέχρι συγκέντρωσης 0,5 % και 0,05 %. Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 %. Τα κύτταρα που καλλιεργούνται στο τρυβλίο 96 κοιλοτήτων εκτίθενται σε 200 μl/κοιλότητα του διαλύματος (ή εναιωρήματος) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε συγκέντρωση είτε 5 % είτε 0,05 % για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες (μονοσυστατικές ή πολυσυστατικές ουσίες ή μείγματα) θεωρούνται αμιγείς ουσίες και αραιώνονται ή εναιωρούνται σύμφωνα με τη μέθοδο, ανεξάρτητα από την καθαρότητά τους.

20. Σε κάθε τρυβλίο της κάθε επανάληψης, ως μάρτυρας θρεπτικού μέσου χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο που περιγράφεται στην παράγραφο 16. Επιπλέον, τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται και σε δείγματα μάρτυρα με διαλύτη σε κάθε τρυβλίο κάθε επανάληψης. Οι διαλύτες που απαριθμούνται στην παράγραφο 18 είναι αποδεδειγμένο ότι δεν προκαλούν δυσμενείς επιδράσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων SIRC.

21. Στη μέθοδο δοκιμών STE, ως θετικός μάρτυρας σε κάθε τρυβλίο κάθε επανάληψης πρέπει να χρησιμοποιείται 0,01 % λαυρυλοθειικού νατρίου (SLS) σε αλατούχο διάλυμα. Για τον υπολογισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας του θετικού μάρτυρα, θα πρέπει σε κάθε τρυβλίο κάθε επανάληψης να περιλαμβάνεται μάρτυρας με αλατούχο διάλυμα.

22. Ένα τυφλό δείγμα είναι απαραίτητο για τον προσδιορισμό της αντιστάθμισης οπτικής πυκνότητας και θα πρέπει να λαμβάνεται από κοιλότητες που περιέχουν μόνο αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, αλλά όχι ασβέστιο και μαγνήσιο (PBS-) ή κύτταρα.

23. Κάθε δείγμα (υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε συγκέντρωση 5 % και 0,05 %, μάρτυρα θρεπτικού μέσου, μάρτυρα με διαλύτη και θετικού μάρτυρα) θα πρέπει να ελέγχεται εις τριπλούν σε κάθε επανάληψη, μέσω έκθεσης των κυττάρων σε 200 μl κατάλληλης υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή χημικής ουσίας μάρτυρα για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

24. Οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού ερεθιστικού δυναμικού ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου φάσματος αποκρίσεων ερεθισμού.

Μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας

25. Μετά την έκθεση, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με 200 μl PBS και προστίθενται 200 μl διαλύματος MTT (0,5 mg MTT/ml θρεπτικού μέσου). Μετά από την πάροδο χρόνου αντίδρασης δύο ωρών σε επωαστήρα (37 °C, 5 % CO_2), μεταγγίζεται το διάλυμα MTT, εκχυλίζεται η φορμαζάνη MTT με προσθήκη 200 μl 0,04 N υδροχλωρικού οξέος–ισοπροπανόλης για 60 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, και μετράται η απορρόφηση του διαλύματος φορμαζάνης MTT στα 570 nm με συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες (έγχρωμες ουσίες ή άμεσα αναγωγικά της MTT) παρεμποδίζουν τη δοκιμασία MTT μόνο εάν στο σύστημα δοκιμής διατηρηθεί σημαντική ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας κατόπιν έκπλυσης μετά την έκθεση, όπως συμβαίνει με τους ιστούς τρισδιάστατου ανασυσταθέντος ανθρώπινου κερατοειδούς ή ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας, χωρίς, ωστόσο, να ισχύει το ίδιο για τις δισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για τη μέθοδο δοκιμών STE.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

26. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) που προκύπτουν για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τον υπολογισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τον μάρτυρα με διαλύτη, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως ποσοστό και υπολογίζεται με διαίρεση της οπτικής πυκνότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διά της οπτικής πυκνότητας του μάρτυρα με διαλύτη αφού αφαιρεθεί η οπτική πυκνότητα του τυφλού δείγματος και από τις δύο τιμές.

$$\textit{βιωσιμότητα}(\%) = \frac{(OD_{570}\ \textit{ουσίας υπό δοκιμή}) - (OD_{570}\ \textit{τυφλού})}{(OD_{570}\ \textit{μάρτυρα με διαλύτη}) - (OD_{570}\ \textit{τυφλού})} \times 100$$

Αντίστοιχα, η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα κάθε μάρτυρα με διαλύτη εκφράζεται ως ποσοστό και υπολογίζεται με διαίρεση της οπτικής πυκνότητας κάθε μάρτυρα με διαλύτη διά της οπτικής πυκνότητας του μάρτυρα θρεπτικού μέσου αφού αφαιρεθεί η οπτική πυκνότητα του τυφλού δείγματος και από τις δύο τιμές.

27. Θα πρέπει να εκτελούνται τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις, καθεμία εκ των οποίων περιλαμβάνει τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες (n=9). Για τον υπολογισμό του αριθμητικού μέσου όρου της σχετικής κυτταρικής βιωσιμότητας χρησιμοποιείται ο αριθμητικός μέσος όρος των τριών κοιλοτήτων για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα με διαλύτη σε κάθε ανεξάρτητη επανάληψη. Ο τελικός αριθμητικός μέσος όρος της κυτταρικής βιωσιμότητας προκύπτει από τις τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις.

28. Παρακάτω δίνονται οι τιμές αποκοπής για την κυτταρική βιωσιμότητα για τον χαρακτηρισμό των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τις οποίες δεν απαιτείται ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP).

Πίνακας 2

Μοντέλο πρόβλεψης της μεθόδου δοκιμών STE

Κυτταρική βιωσιμότητα		Ταξινόμηση κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP	Εφαρμοσιμότητα
Σε 5 %	Σε 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Καμία κατηγορία	Ουσίες και μείγματα, με εξαίρεση τα ακόλουθα: i) ουσίες υψηλής πτητικότητας με τάση ατμών πάνω από 6 kPa [1] και ii) στερεά χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα), με εξαίρεση τα επιφανειοδραστικά και τα μείγματα που αποτελούνται μόνο από επιφανειοδραστικά
≤ 70 %	> 70 %	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Άνευ αντικειμένου
≤ 70 %	≤ 70 %	Κατηγορία 1	Ουσίες και μείγματα [2]

[1] Τα μείγματα που περιέχουν ουσίες με τάση ατμών υψηλότερη από 6 kPa θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή, προκειμένου να αποφεύγονται ενδεχόμενες υποπροβλέψεις, και η αξιολόγησή τους θα πρέπει να αιτιολογείται κατά περίπτωση.

[2] Βάσει των αποτελεσμάτων που προκύπτουν κυρίως με μονοσυστατικές ουσίες, αν και υπάρχει περιορισμένος αριθμός δεδομένων και σχετικά με τις δοκιμές μειγμάτων. Η μέθοδος δοκιμών είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμη στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

Κριτήρια αποδοχής

29. Τα αποτελέσματα των δοκιμών κρίνονται αποδεκτά εφόσον πληρούνται όλα τα ακόλουθα κριτήρια:

α) η οπτική πυκνότητα του μάρτυρα θρεπτικού μέσου (που εκτίθεται σε θρεπτικό μέσο) θα πρέπει να είναι 0,3 ή υψηλότερη, μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας του τυφλού δείγματος.

β) η βιωσιμότητα του μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να είναι 80 % ή υψηλότερη σε σχέση με τον μάρτυρα θρεπτικού μέσου. Σε περίπτωση που σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιούνται πολλοί μάρτυρες με διαλύτη, η κυτταρική βιωσιμότητα για καθένα από τους εν λόγω μάρτυρες θα πρέπει να είναι υψηλότερη από 80 % προκειμένου να πληρούν τα κριτήρια οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που ελέγχονται με τους εν λόγω διαλύτες.

γ) η κυτταρική βιωσιμότητα που προκύπτει με τον θετικό μάρτυρα (0,01 % SLS) θα πρέπει να εμπίπτει εντός δύο τυπικών αποκλίσεων του ιστορικού μέσου όρου. Το ανώτατο και το κατώτατο όριο αποδοχής για τον θετικό μάρτυρα θα πρέπει να επικαιροποιείται συχνά, δηλ. κάθε τρεις μήνες, ή κάθε φορά που διεξάγεται αποδεκτή δοκιμή σε εργαστήρια όπου δεν διεξάγονται συχνά δοκιμές (δηλ. λιγότερο από μια φορά τον μήνα). Σε περίπτωση που ένα εργαστήριο δεν ολοκληρώσει επαρκή αριθμό πειραμάτων ώστε να καθορίσει στατιστικά αξιόπιστη κατανομή θετικών μαρτύρων, επιτρέπεται να χρησιμοποιεί το ανώτατο και το κατώτατο όριο αποδοχής που έχουν καθοριστεί από τον φορέα ανάπτυξης της μεθόδου, δηλ. μεταξύ 21,1 % και 62,3 %, σύμφωνα με τα εργαστηριακά ιστορικά δεδομένα του, ενώ διαμορφώνει εσωτερική κατανομή στη διάρκεια των πρώτων δοκιμών στο πλαίσιο της καθημερινής πρακτικής.

δ) Η τυπική απόκλιση της τελικής κυτταρικής βιωσιμότητας που προκύπτει από τις τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 15 % για αμφότερες τις συγκεντρώσεις 5 % και 0,05 % της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σε περίπτωση που δεν πληρούται ένα ή περισσότερα από τα εν λόγω κριτήρια, τα αποτελέσματα θα πρέπει να απορρίπτονται και θα πρέπει να διεξάγονται τρεις επιπλέον ανεξάρτητες επαναλήψεις.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

30. Τα δεδομένα για κάθε επιμέρους κοιλότητα (π.χ. οι τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας) κάθε επανάληψης καθώς και ο συνολικός μέσος όρος, η SD και η ταξινόμηση πρέπει να αναφέρονται.

Έκθεση δοκιμής

31. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρες

— Μονοσυστατική ουσία: ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα: χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική κατάσταση, πτητικότητα, pH, LogP, μοριακό βάρος, χημική κατηγορία, και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Συνθήκες και διαδικασίες μεθόδου δοκιμών

— Όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— Περιγραφή της χρησιμοποιούμενης μεθόδου δοκιμών,

— Χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά, προέλευσή αυτής, αριθμός ανακαλλιεργειών και συρροή των κυττάρων που χρησιμοποιούνται για τις δοκιμές,

— Λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής,

— Αριθμός επαναλήψεων και πανομοιότυπων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν,

— Συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν (εφόσον διαφέρουν από τις συνιστώμενες),

— Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία,

— Διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία (εφόσον διαφέρει από τη συνιστώμενη),

— Περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής,

— Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— Παραπομπή στον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση ιστορικών θετικών μαρτύρων,

— Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή απόδειξη της διαχρονικής αναπαραγωγιμότητας των επιδόσεων της μεθόδου.

Αποτελέσματα

— Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα, και για κάθε ελεγχθείσα συγκέντρωση, θα πρέπει να παρέχονται υπό μορφή πίνακα οι επιμέρους τιμές οπτικής πυκνότητας ανά πανομοιότυπη κοιλότητα, ο αριθμητικός μέσος όρος των τιμών οπτικής πυκνότητας για κάθε ανεξάρτητη επανάληψη, το ποσοστό (%) κυτταρικής βιωσιμότητας για κάθε ανεξάρτητη επανάληψη, και ο αριθμητικός μέσος όρος (%) τελικής κυτταρικής βιωσιμότητας και η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων,

— Τα αποτελέσματα για το θρεπτικό μέσο, τον διαλύτη και τον θετικό μάρτυρα, που καταδεικνύουν ότι πληρούνται τα κατάλληλα κριτήρια αποδοχής της μελέτης,

— Περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν,

— Η συνολική ταξινόμηση στην οποία κατέληξε η δοκιμή, με αναφορά του μοντέλου πρόβλεψης / των κριτηρίων λήψης απόφασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος, Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών.

(9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (13).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με μια υπό δοκιμή χημική ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή και αξιόπιστη πηγή προμήθειας, ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς την κατηγορία των υπό δοκιμή ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) υποστηρικτικά στοιχεία σχετικά με τις γνωστές επιδράσεις, και v) γνωστή ισχύς στο φάσμα της επιθυμητής απόκρισης.

Ανοδική (bottom-up) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν (αρνητική έκβαση) με βάση άλλες χημικές ουσίες (θετική έκβαση).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Οφθαλμικός ερεθισμός: πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των θετικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται αρνητικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών χημικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται θετικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

Μάρτυρας θρεπτικού μέσου: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

OD: (Optical Density) οπτική πυκνότητα.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (10).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (13).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (10).

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (13).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι χημική ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά· είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά βαθμίδες, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε υπό δοκιμή χημική ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών δοκιμών σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Καθοδική (top-down) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημική ουσία για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (θετική έκβαση) σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες (αρνητική έκβαση).

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

Κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

Κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

Καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: χημικά προϊόντα που δεν ταξινομούνται ως κατηγορίας 1 ή 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (ή κατηγορίας 2A ή 2B κατά GHS του ΟΗΕ).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

B.69 **ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΟΜΟΙΟ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ (RhCE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΚΑΙ ΝΑ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Η ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 492 του ΟΟΣΑ (2017). Η *σοβαρή οφθαλμική βλάβη* αναφέρεται στην πρόκληση βλάβης στους ιστούς των οφθαλμών ή τη σοβαρή μείωση της όρασης, η οποία εμφανίζεται μετά την εφαρμογή υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας, όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Ουσιών (GHS) των Ηνωμένων Εθνών (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) της Ευρωπαϊκής Ένωσης ([1]). Επίσης, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP, *οφθαλμικός ερεθισμός* είναι η πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Οι χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ταξινομούνται στην κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP, ενώ οι χημικές ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό ταξινομούνται στην κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη ορίζονται ως εκείνες που δεν πληρούν τις απαιτήσεις για να ταξινομηθούν στην κατηγορία 1 ή 2 (2A ή 2B) κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP, και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται «καμίας κατηγορίας κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP».

2. Η εκτίμηση της σοβαρής οφθαλμικής βλάβης και του οφθαλμικού ερεθισμού πραγματοποιείται κατά κανόνα με τη χρήση πειραματόζωων [μέθοδος δοκιμών B.5 (2)]. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών και η χρήση αυτής είναι ζητήματα που θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο των πληροφοριών που παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης «Ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση για τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη και τον οφθαλμικό ερεθισμό» του ΟΟΣΑ (39).

3. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια *in vitro* διαδικασία που επιτρέπει τον χαρακτηρισμό χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) για τα οποία δεν απαιτείται ταξινόμηση και επισήμανση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται ανασυσταθέν επιθήλιο όμοιο με ανθρώπινο κερατοειδή (reconstructed human cornea-like epithelium, RhCE), το οποίο μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις ιστολογικές, μορφολογικές, βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες του επιθηλίου του ανθρώπινου κερατοειδούς. Άλλες τέσσερις επιστημονικά έγκυρες *in vitro* μέθοδοι δοκιμών έχουν επικυρωθεί και εγκριθεί ως μέθοδοι δοκιμών B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) και B.68 (6) με σκοπό την κάλυψη της παραμέτρου «σοβαρή οφθαλμική βλάβη / οφθαλμικός ερεθισμός» της ανθρώπινης υγείας.

4. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνονται δύο επικυρωμένες δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιούνται μοντέλα RhCE του εμπορίου. Έχουν διενεργηθεί μελέτες επικύρωσης για την αξιολόγηση του οφθαλμικού ερεθισμού / της σοβαρής οφθαλμικής βλάβης (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) με χρήση της δοκιμής οφθαλμικού ερεθισμού (EIT) EpiOcular™ και της δοκιμής οφθαλμικού ερεθισμού (EIT) του επιθηλίου του ανθρώπινου κερατοειδούς (HCE) SkinEthic™. Στις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα ιστικά μορφώματα RhCE, τα οποία αναφέρονται στο κείμενο που ακολουθεί ως «επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς» VRM 1 και VRM2 αντίστοιχα. Με βάση τις εν λόγω μελέτες επικύρωσης και τη σχετική ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους (9)(12) εξήχθη το συμπέρασμα ότι οι EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT μπορούν να χαρακτηρίζουν ορθά τα χημικά προϊόντα (ουσίες και μείγματα) για τα οποία δεν απαιτείται ταξινόμηση και επισήμανση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό / τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ, και συνιστώνται ως επιστημονικά έγκυρες για τον συγκεκριμένο σκοπό (13).

5. Είναι γενικά αποδεκτό ότι, στο εγγύς μέλλον, καμία μεμονωμένη μέθοδος δοκιμών *in vitro* δεν θα μπορέσει να αντικαταστήσει πλήρως την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή Draize (2)(14) από την άποψη της πρόβλεψης του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού για τις διάφορες χημικές κατηγορίες. Εντούτοις, στοχευμένοι συνδυασμοί διαφόρων εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών στο πλαίσιο (κλιμακωτών) στρατηγικών δοκιμών, όπως η ανοδική/καθοδική προσέγγιση, θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντικαταστήσουν πλήρως την οφθαλμική δοκιμή Draize (15). Η ανοδική προσέγγιση (15) έχει σχεδιαστεί για χρήση σε περίπτωση που, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, μια χημική ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει οφθαλμικό ερεθισμό σε βαθμό που να απαιτείται η ταξινόμησή της, ενώ η καθοδική προσέγγιση (15) έχει σχεδιαστεί για χρήση σε περίπτωση που, με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες, μια χημική ουσία αναμένεται να προκαλέσει σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Οι δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EITσυνιστώνται

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

για τον χαρακτηρισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν επιβάλλεται η ταξινόμηση ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (καμία κατηγορία) χωρίς τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, στο πλαίσιο στρατηγικής δοκιμών όπως η ανοδική/καθοδική προσέγγιση που προτείνουν οι Scott *et al.*, π.χ. ως αρχικό στάδιο στο πλαίσιο ανοδικής προσέγγισης ή ως ένα από τα τελευταία στάδια μιας καθοδικής προσέγγισης (15). Ωστόσο, οι δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT δεν προορίζονται για τη διαφοροποίηση μεταξύ της κατηγορίας 1 (σοβαρή οφθαλμική βλάβη) και της κατηγορίας 2 (οφθαλμικός ερεθισμός) κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP. Η διαφοροποίηση αυτή θα πρέπει να γίνεται σε άλλη βαθμίδα της στρατηγικής δοκιμών (15). Ως εκ τούτου, σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας που χαρακτηρίζεται ουσία για την οποία απαιτείται ταξινόμηση ως προς οφθαλμικό ερεθισμό / σοβαρή οφθαλμική βλάβη με τις δοκιμές EpiOcular™ EIT ή SkinEthic™ HCE EIT, θα απαιτηθεί η διεξαγωγή συμπληρωματικών δοκιμών (*in vitro* και/ή *in vivo*) για την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος (καμία κατηγορία, κατηγορία 2 ή κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP), με χρήση, για παράδειγμα, της μεθόδου δοκιμών B.47, B.48, B.61 ή B.68.

6. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή της διαδικασίας που εφαρμόζεται για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού κινδύνου που ενέχει η υπό δοκιμή ουσία, με βάση την ικανότητά της να προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε ιστικό μόρφωμα RhCE, όπως μετράται από τη δοκιμή MTT (16) (βλ. παράγραφο 21). Η βιωσιμότητα του ιστού RhCE μετά από έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία προσδιορίζεται βάσει σύγκρισης με ιστούς που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα [ποσοστό (%) βιωσιμότητας], και, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικού κινδύνου που ενέχει η υπό δοκιμή χημική ουσία.

7. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (17) που διευκολύνουν την επικύρωση νέων ή τροποποιημένων *in vitro* δοκιμών που βασίζονται σε RhCE, ανάλογων με τις δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT, σύμφωνα με τις αρχές του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 34 του ΟΟΣΑ (18), και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της TG 492 του ΟΟΣΑ ούτως ώστε να συμπεριληφθούν σε αυτήν. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων (Mutual Acceptance of Data/MAD) βάσει της συμφωνίας του ΟΟΣΑ είναι διασφαλισμένη μόνο για δοκιμές που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων, εφόσον αυτές έχουν κριθεί από τον ΟΟΣΑ και έχουν περιληφθεί στην αντίστοιχη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών.

ΟΡΙΣΜΟΙ

8. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε τρισδιάστατα ιστικά μορφώματα RhCE του εμπορίου, που παράγονται είτε με χρήση πρωτογενών κερατινοκυττάρων ανθρώπινης επιδερμίδας (EpiOcular™ OCL-200) είτε ανθρώπινων αθανατοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς (SkinEthic™ HCE/S). Τα ιστικά μορφώματα των EpiOcular™ OCL-200 και SkinEthic™ HCE/S RhCE είναι παρόμοια με την *in vivo* τρισδιάστατη δομή του επιθηλίου του κερατοειδούς και παράγονται με χρήση κυττάρων από τα υπό μελέτη είδη (19)(20). Επιπλέον, οι δοκιμές μετρούν απευθείας την κυτταροτοξικότητα που προκύπτει από τη διείσδυση της χημικής ουσίας μέσω του κερατοειδούς και την πρόκληση βλαβών στα κύτταρα και τους ιστούς· στη συνέχεια, το συνολικό αποτέλεσμα της *in vivo* σοβαρής οφθαλμικής βλάβης/οφθαλμικού ερεθισμού προσδιορίζεται βάσει της κυτταροτοξικής απόκρισης. Βλάβες στα κύτταρα μπορούν να προκληθούν με διάφορους τρόπους δράσης (βλ. παράγραφο 20), αλλά η κυτταροτοξικότητα διαδραματίζει σημαντικό, εάν όχι τον κύριο, μηχανιστικό ρόλο όσον αφορά τον χαρακτήρα της απόκρισης συνολικής σοβαρής οφθαλμικής βλάβης/οφθαλμικού ερεθισμού σε μια χημική ουσία, η οποία εκδηλώνεται *in vivo* κυρίως μέσω θολερότητας του κερατοειδούς, ιρίτιδας, ερυθήματος του επιπεφυκότος και/ή οιδήματος του επιπεφυκότος, ανεξαρτήτως των χημικών διεργασιών που οδηγούν στην ιστική βλάβη.

10. Στη μελέτη επικύρωσης της παρούσας μεθόδου δοκιμών ελέγχθηκε ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, οι οποίες κάλυπταν μεγάλη ποικιλία τύπων χημικών ουσιών, χημικών κατηγοριών, μοριακών βαρών, logP, χημικών δομών κ.λπ. Η βάση δεδομένων επικύρωσης της EpiOcular™ EIT περιελάμβανε συνολικά 113 χημικές ουσίες, καλύπτοντας 95 διαφορετικές οργανικές λειτουργικές ομάδες, σύμφωνα με την ανάλυση εργαλειοθήκης QSAR του ΟΟΣΑ (8). Αυτές ήταν κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αλλά στη μελέτη περιελήφθησαν επίσης αρκετές πολυσυστατικές ουσίες (περιλαμβανομένων 3 ομοπολυμερών, 5 συμπολυμερών και 10 οιονεί πολυμερών). Σε ό,τι αφορά τη φυσική κατάσταση και τις κατηγορίες GHS του ΟΗΕ/κανονισμού CLP, η κατανομή των 113 χημικών ουσιών που ελέγχθηκαν ήταν η ακόλουθη: 13 υγρά κατηγορίας 1, 15 στερεά κατηγορίας 1, 6 υγρά κατηγορίας 2A, 10 στερεά κατηγορίας 2A, 7 υγρά κατηγορίας 2B, 7 στερεά κατηγορίας 2B, 27 υγρά καμίας κατηγορίας και 28 στερεά καμίας κατηγορίας (8). Η βάση δεδομένων επικύρωσης της SkinEthic™ HCE EIT περιελάμβανε συνολικά 200 χημικές ουσίες, καλύπτοντας 165 διαφορετικές οργανικές λειτουργικές ομάδες (8)(10)(11). Αυτές ήταν κυρίως μονοσυστατικές ουσίες, αλλά στη μελέτη περιελήφθησαν επίσης αρκετές πολυσυστατικές ουσίες (περιλαμβανομένων 10 πολυμερών). Σε ό,τι αφορά τη φυσική κατάσταση και τις κατηγορίες GHS του ΟΗΕ/κανονισμού CLP, η κατανομή των 200 χημικών ουσιών που ελέγχθηκαν ήταν η ακόλουθη: 27 υγρά κατηγορίας 1, 24 στερεά κατηγορίας 1, 19 υγρά κατηγορίας 2A, 10 στερεά κατηγορίας 2A, 9 υγρά κατηγορίας 2B, 8 στερεά κατηγορίας 2B, 50 υγρά καμίας κατηγορίας και 53 στερεά καμίας κατηγορίας (10)(11).

11. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε ουσίες και μείγματα, καθώς και σε στερεά, υγρά, ημιστερεά και κηρούς. Τα υγρά μπορεί να είναι υδατικά ή μη· και τα στερεά μπορεί να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Αέρια και αερολύματα δεν έχουν αξιολογηθεί ακόμη με μελέτη επικύρωσης. Παρότι η τεχνολογία RhCE μπορεί θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή αερίων και αερολυμάτων, αυτά δεν μπορούν να εξεταστούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

12. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με το άλας φορμαζάνης MTT (με φυσικό τρόπο ή μετά από αγωγή) και υπό δοκιμή χημικές ουσίες ικανές να ανάγουν άμεσα τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT (σε άλας φορμαζάνης MTT) μπορεί να παρεμποδίζουν τις μετρήσεις βιωσιμότητας των ιστών, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις. Το είδος των προσαρμοσμένων μαρτύρων που μπορεί να απαιτούνται ποικίλλει ανάλογα με το είδος της παρεμποδιστικής δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της χρησιμοποιούμενης διαδικασίας ποσοτικού προσδιορισμού του άλατος φορμαζάνης MTT (βλ. παραγράφους 36-42).

13. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις μελέτες προεπικύρωσης (21)(22) και τις πλήρεις μελέτες επικύρωσης (8)(10)(11), κατεδείχθη ότι αμφότερες οι δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT μπορούν να διεξαχθούν από εργαστήρια που θεωρείται ότι δεν διαθέτουν πείρα στη διεξαγωγή των δοκιμασιών, καθώς και ότι είναι αναπαραγώγιμες εντός και μεταξύ εργαστηρίων. Με βάση τις εν λόγω μελέτες, το επίπεδο αναπαραγωγιμότητας από την άποψη της συμφωνίας των προβλέψεων που μπορεί να αναμένεται από την EpiOcular™ EIT από δεδομένα για 113 χημικές ουσίες ανέρχεται σε 95 % εντός εργαστηρίου και 93 % μεταξύ εργαστηρίων. Το επίπεδο αναπαραγωγιμότητας από την άποψη της συμφωνίας των προβλέψεων που μπορεί να αναμένεται από τη SkinEthic™ HCE EIT από δεδομένα για 120 χημικές ουσίες ανέρχεται σε 92 % εντός εργαστηρίου και 95 % μεταξύ εργαστηρίων.

14. Η μέθοδος δοκιμών EpiOcular™ EIT μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη βάσει του συστήματος ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (8), η EpiOcular™ EIT παρουσιάζει συνολική ορθότητα 80 % (βάσει 112 χημικών ουσιών), ευαισθησία 96 % (βάσει 57 χημικών ουσιών), ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 4 % (βάσει 57 χημικών ουσιών), ειδικότητα 63 % (βάσει 55 χημικών ουσιών) και ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 37 % (βάσει 55 χημικών ουσιών), σε σύγκριση με δεδομένα αναφοράς της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14) που ταξινομήθηκαν με βάση το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP. Βάσει μελέτης στην οποία ελέγχθηκαν 97 υγρά αγροχημικά σκευάσματα με την EpiOcular™ EIT, διαπιστώθηκαν ανάλογες επιδόσεις της μεθόδου δοκιμής για τον συγκεκριμένο τύπο μειγμάτων με εκείνες που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (23). Τα 97 σκευάσματα κατανέμονταν ως εξής: 21 κατηγορίας 1, 19 κατηγορίας 2A, 14 κατηγορίας 2B και 43 καμίας κατηγορίας, τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ βάσει δεδομένων αναφοράς της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14). Προέκυψε συνολική ορθότητα 82 % (βάσει 97 σκευασμάτων), ευαισθησία 91 % (βάσει 54 σκευασμάτων), ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 9 % (βάσει 54 σκευασμάτων), ειδικότητα 72 % (βάσει 43 σκευασμάτων) και ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 28 % (βάσει 43 σκευασμάτων) (23).

15. Η μέθοδος δοκιμών SkinEthic™ HCE EIT μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη βάσει του συστήματος ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (10) (11), η SkinEthic™ HCE EIT παρουσιάζει συνολική ορθότητα 84 % (βάσει 200 χημικών ουσιών), ευαισθησία 95 % (βάσει 97 χημικών ουσιών), ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης 5 % (βάσει 97 χημικών ουσιών), ειδικότητα 72 % (βάσει 103 χημικών ουσιών) και ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης 28 % (βάσει 103 χημικών ουσιών), σε σύγκριση με δεδομένα αναφοράς της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14) που ταξινομήθηκαν με βάση το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP.

16. Τα ποσοστά ψευδοαρνητικής έκβασης που προέκυψαν και από τις δύο δοκιμές RhCE, είτε με ουσίες είτε με μείγματα, εμπίπτουν στο 12 % συνολικής πιθανότητας χαρακτηρισμού των χημικών ουσιών είτε στην κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP είτε σε καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP βάσει της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής Draize, στο πλαίσιο επαναλαμβανόμενων δοκιμών· αυτό οφείλεται στην εγγενή μεταβλητότητα εντός δοκιμής που παρουσιάζει η μέθοδος (24). Τα ποσοστά ψευδοθετικής έκβασης που προέκυψαν και από τις δύο μεθόδους δοκιμών RhCE, είτε με ουσίες είτε με μείγματα, δεν είναι κρίσιμης σημασίας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, καθώς για όλες τις υπό

δοκιμή χημικές ουσίες που δίνουν βιωσιμότητα ιστών ίση ή χαμηλότερη από τις καθορισμένες τιμές αποκοπής (βλ. παράγραφο 44) θα απαιτηθούν περαιτέρω δοκιμές με άλλες μεθόδους *in vitro*, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, με χρήση στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης. Οι εν λόγω μέθοδοι δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για όλους τους τύπους χημικών ουσιών, οπότε και ένα αρνητικό αποτέλεσμα θα πρέπει να γίνεται δεκτό ως λόγος για τη μη ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας ως προς οφθαλμικό ερεθισμό και σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP). Θα πρέπει να ζητείται η γνώμη των αρμόδιων ρυθμιστικών αρχών πριν από τη χρήση των EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT βάσει συστημάτων ταξινόμησης άλλων εκτός από το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP.

17. Ένας περιορισμός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι ότι δεν επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ οφθαλμικού ερεθισμού / αναστρέψιμων επιδράσεων στους οφθαλμούς (κατηγορία 2) και σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / μη αναστρέψιμων επιδράσεων στους οφθαλμούς (κατηγορία 1), βάσει του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP, ούτε μεταξύ ερεθιστικών για τους οφθαλμούς (προαιρετική κατηγορία 2A) και ήπιων ερεθιστικών για τους οφθαλμούς (προαιρετική κατηγορία 2B), βάσει του GHS του ΟΗΕ (1). Για τους σκοπούς αυτούς απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών με άλλες μεθόδους *in vitro*.

18. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή ([2]) και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμών RhCE στον έλεγχο ουσιών και/ή μειγμάτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

19. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε δύο τουλάχιστον τρισδιάστατα ιστικά μορφώματα RhCE και η κυτταρική βιωσιμότητα μετράται μετά την έκθεση και μετά από περίοδο επώασης κατόπιν αγωγής. Οι ιστοί RhCE ανασυστήνονται από πρωτογενή κερατινοκύτταρα ανθρώπινης επιδερμίδας ή αθανατοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου κερατοειδούς, που έχουν καλλιεργηθεί για αρκετές ημέρες για να σχηματίσουν ένα στρωματοποιημένο, ισχυρά διαφοροποιημένο πλακώδες επιθήλιο, παρόμοιο μορφολογικά με το επιθήλιο του ανθρώπινου κερατοειδούς. Το ιστικό μόρφωμα EpiOcular™ RhCE αποτελείται από τουλάχιστον 3 βιώσιμα στρώματα κυττάρων και μια μη κερατινοποιημένη επιφάνεια, σχηματίζοντας δομή παρόμοια με του κερατοειδούς, ανάλογη με αυτή που παρατηρείται *in vivo*. Το ιστικό μόρφωμα SkinEthic™ HCE RhCE αποτελείται από τουλάχιστον 4 βιώσιμα στρώματα κυττάρων, στα οποία περιλαμβάνονται κυλινδρικά βασικά κύτταρα, μεταβατικά πτερυγοειδή κύτταρα και επιφανειακά πλακώδη κύτταρα, παρόμοια με τα κύτταρα του φυσιολογικού επιθηλίου του ανθρώπινου κερατοειδούς (20)(26).

20. Η σοβαρή οφθαλμική βλάβη / ο οφθαλμικός ερεθισμός που επάγονται από χημικά προϊόντα και εκδηλώνονται *in vivo* κυρίως με θολερότητα του κερατοειδούς, ιρίτιδα, ερύθημα του επιπεφυκότα και/ή οίδημα του επιπεφυκότα, είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς διαδοχικών συμβάντων που ξεκινούν με τη διείσδυση της χημικής ουσίας διαμέσου του κερατοειδούς και/ή του επιπεφυκότα και την πρόκληση βλάβης στα κύτταρα. Βλάβη στα κύτταρα μπορεί να προκληθεί με διάφορους τρόπους δράσης, όπως: λύση της κυτταρικής μεμβράνης (π.χ. από επιφανειοδραστικές ουσίες, οργανικούς διαλύτες)· πήξη μακρομορίων (ιδίως πρωτεϊνών) (π.χ. λόγω επιφανειοδραστικών ουσιών, οργανικών διαλυτών, αλκαλίων και οξέων)· σαπωνοποίηση λιπιδίων (π.χ. λόγω αλκαλίων)· και αλκυλίωση ή άλλες ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με μακρομόρια (π.χ. λόγω λευκαντικών, υπεροξειδίων και αλκυλιωτών) (15)(27)(28). Ωστόσο, έχει καταδειχθεί ότι η κυτταροτοξικότητα διαδραματίζει σημαντικό, αν όχι τον κύριο, μηχανιστικό ρόλο όσον αφορά τη γενική αντίδραση σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού σε μια χημική ουσία, ανεξαρτήτως των φυσικοχημικών διεργασιών που προκαλούν την ιστική βλάβη (29)(30). Επιπλέον, το δυναμικό πρόκλησης σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού μιας χημικής ουσίας καθορίζεται πρωτίστως από τον βαθμό του αρχικού τραύματος (31), το οποίο συνδέεται με τον βαθμό της κυτταρικής νέκρωσης (29) και με την έκταση των επακόλουθων αποκρίσεων και τελικών εκβάσεων (32). Έτσι, τα ελαφρά ερεθιστικά επηρεάζουν γενικά μόνο το επιφανειακό επιθήλιο του κερατοειδούς, τα ήπια και μέτρια ερεθιστικά προκαλούν βλάβη πρωτίστως στο επιθήλιο και στο επιφανειακό στρώμα, ενώ τα ισχυρά ερεθιστικά προκαλούν βλάβη στο επιθήλιο, το εν τω βάθει στρώμα και, ενίοτε, στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς (30)(33). Η μέτρηση της βιωσιμότητας του ιστικού μορφώματος RhCE μετά από τοπική έκθεση σε υπό δοκιμή χημική ουσία για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών για τις οποίες δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς σοβαρή οφθαλμική βλάβη / οφθαλμικό ερεθισμό (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP) βασίζεται στην παραδοχή ότι όλες οι χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη ή οφθαλμικό ερεθισμό θα επάγουν κυτταροτοξικότητα στο επιθήλιο του κερατοειδούς και/ή στον επιπεφυκότα.

([2]) Τον Ιούνιο του 2013, η κοινή συνεδρίαση του ΟΟΣΑ συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλέον με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ.

21. Η βιωσιμότητα του ιστού RhCE μετράται παραδοσιακά με βάση την ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο· βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου· αριθ. CAS 298-93-1] από τα βιώσιμα κύτταρα του ιστού σε κυανό άλας φορμαζάνης MTT, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (16). Ως χημικές ουσίες για τις οποίες δεν επιβάλλεται η ταξινόμηση και η επισήμανση με βάση το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP (καμία κατηγορία) χαρακτηρίζονται οι ουσίες που δεν μειώνουν τη βιωσιμότητα των ιστών κάτω από ένα καθορισμένο όριο (δηλαδή βιωσιμότητα ιστών > 60 %, στις EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EITL ([3]), ή > 50 % στη SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (βλ. παράγραφο 44).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

22. Πριν από την ένταξη των δοκιμών RhCE στην καθημερινή τους πρακτική για κανονιστικούς σκοπούς, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα πραγματοποιώντας ορθές προβλέψεις για τις δεκαπέντε χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 1. Οι εν λόγω χημικές ουσίες επιλέχτηκαν μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες επικύρωσης των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς (8)(10)(11). Η επιλογή περιλαμβάνει, στο μέτρο του δυνατού, χημικές ουσίες οι οποίες: i) καλύπτουν διαφορετικές φυσικές καταστάσεις· ii) καλύπτουν το πλήρες φάσμα αποκρίσεων σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού *in vivo* βάσει αποτελεσμάτων υψηλής ποιότητας που προέκυψαν από την *in vivo* οφθαλμική δοκιμή αναφοράς σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5) (2)(14), το σύστημα ταξινόμησης GHS του ΟΗΕ (κατηγορίες 1, 2A, 2B, ή καμία κατηγορία) (1) και το σύστημα ταξινόμησης του κανονισμού CLP (κατηγορίες 1, 2 ή καμία κατηγορία)· iii) καλύπτουν τους διάφορους παράγοντες ταξινόμησης *in vivo* (24)(25)· iv) είναι αντιπροσωπευτικές των χημικών κατηγοριών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (8)(10)(11)· v) καλύπτουν ένα ορθό και ευρύ αντιπροσωπευτικό μέρος των οργανικών λειτουργικών ομάδων (8)(10)(11)· vi) έχουν καλά προσδιορισμένες χημικές δομές (8)(10)(11)· vii) είναι έγχρωμες και/ή άμεσα αναγωγικά της MTT· viii) παρήγαγαν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στις μεθόδους δοκιμών RhCE στη διάρκεια των σχετικών επικυρώσεων· ix) προβλέφθηκαν σωστά από τις μεθόδους δοκιμών RhCE στη διάρκεια των σχετικών μελετών επικύρωσης· x) καλύπτουν το πλήρες φάσμα των *in vitro* αποκρίσεων βάσει δεδομένων μεθόδων δοκιμών RhCE υψηλής ποιότητας (βιωσιμότητα 0 έως 100 %)· xi) διατίθενται στο εμπόριο· και xii) δεν έχουν απαγορευτικό κόστος απόκτησης και/ή απόρριψης. Σε περιπτώσεις στις οποίες μια απαριθμούμενη χημική ουσία δεν είναι διαθέσιμη ή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλους βάσιμους λόγους, μπορεί να χρησιμοποιείται άλλη χημική ουσία, π.χ. από τις χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επικύρωση της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς (VRM). Τέτοιες αποκλίσεις θα πρέπει ωστόσο να αιτιολογούνται.

Πίνακας 1

Κατάλογος χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας

Χημική ονομασία	CASRN	Οργανική λειτουργική ομάδα ([1])	Φυσική κατάσταση	Βιωσιμότητα VRM1 (%) ([2])	Βιωσιμότητα VRM2 (%) ([3])	Πρόβλεψη VRM	Αναγωγικό της MTT	Παρεμπόδιση λόγω χρώματος
***In vivo* κατηγορία 1** ([4])								
Θειογλυκολικός μεθυλεστέρας	2365-48-2	Εστέρας καρβοξυλικού οξέος· θειοαλκοόλη	Υ	10,9±6,4	5,5±7,4	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Ναι (ισχυρό)	Όχι
Ακρυλικό υδροξυαιθύλιο	818-61-1	Ακρυλική ένωση· αλκοόλη	Υ	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
2,5-Διμεθυλο-2,5-εξανοδιόλη	110-03-2	Αλκοόλη	Σ	2,3±0,2	0,2±0,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
Οξαλικό νάτριο	62-76-0	Οξοκαρβοξυλικό οξύ	Σ	29,0±1,2	5,3±4,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
***In vivo* κατηγορία 2A** ([4])								
Δι-D-γλυκονικό N,N''-δις(4-χλωροφαινυλο)-3,12-διιμινο-2,4,11,13-τετρααζαδεκατετρανοδιιμιδαμίδιο (20 %, υδατικό) ([6])	18472-51-0	Αρωματικό ετεροκυκλικό αλογονίδιο· αρυλαλογονίδιο· διυδροξυλική ομάδα· γουανιδίνη	Υ	4,0±1,1	1,3±0,6	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Ναι (ασθενές)

([3]) EITL: EIT για υγρά στην περίπτωση της SkinEthic™ HCE
([4]) EITS: EIT για στερεά στην περίπτωση της SkinEthic™ HCE

Χημική ονομασία	CASRN	Οργανική λειτουργική ομάδα (1)	Φυσική κατάσταση	Βιωσιμότητα VRM1 (%) (2)	Βιωσιμότητα VRM2 (%) (3)	Πρόβλεψη VRM	Αναγωγικό της MTT	Παρεμπόδιση λόγω χρώματος
Βενζοϊκό νάτριο	532-32-1	Αρύλιο· καρβοξυλικό οξύ	Σ	3,5±2,6	0,6±0,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι

***In vivo* κατηγορία 2Β** (4)

Διαιθυλοτολουαμίδιο	134-62-3	Βενζαμίδιο	Υ	15,6±6,3	2,8±0,9	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι
2,2-Διμεθυλο-3-μεθυλενοδικυκλο[2.2.1]επτάνιο	79-92-5	Αλκάνιο, διακλαδισμένο με τριτοταγές άτομο άνθρακα· αλκένιο· δικυκλοεπτάνιο· καρβοκυκλικές ενώσεις γεφυρωμένων δακτυλίων· κυκλοαλκάνιο	Σ	4,7±1,5	15,8±1,1	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης	Όχι	Όχι

Καμία κατηγορία *in vivo* (4)

Αιθυλοθειικό 1-αιθυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο	342573-75-5	Αλκοξύ· αμμωνιακό άλας· αρύλιο· ιμιδαζόλιο· θειικό άλας	Υ	79,9±6,4	79,4±6,2	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
Δικαπρυλυλικός αιθέρας	629-82-3	Αλκοξύ· αιθέρας	Υ	97,8±4,3	95,2±3,0	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
Πιπερονυλοβουτοξείδιο	51-03-6	Αλκοξύ· βενζοδιοξόλη· βενζύλιο· αιθέρας	Υ	104,2±4,2	96,5±3,5	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-40) υδρογονωμένο ρικινέλαιο	61788-85-0	Ακυλάλη· αλκοόλη· αλλύλιο· αιθέρας	Παχύρρευστο	77,6±5,4	89,1±2,9	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
1-(4-Χλωροφαινυλο)-3-(3,4-διχλωροφαινυλ)ουρία	101-20-2	Αρωματικό ετεροκυκλικό αλογονίδιο· αρυλαλογονίδιο· παράγωγα ουρίας	Σ	106,7±5,3	101,9±6,6	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι
2,2'-Μεθυλενοδις(6-(2H)-βενζοτριαζολ-2-υλο)-4-(1,1,3,3-τετραμεθυλοβουτυλο)-φαινόλη)	103597-45-1	Αλκάνιο, διακλαδισμένο με τεταρτοταγές άτομο άνθρακα· συμπυκνωμένες καρβοκυκλικές αρωματικές ενώσεις· συμπυκνωμένες κορεσμένες ετεροκυκλικές ενώσεις· πρόδρομες κινοειδείς ενώσεις· tert-βουτύλιο	Σ	102,7±13,4	97,7±5,6	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι

Χημική ονομασία	CASRN	Οργανική λειτουργική ομάδα ([1])	Φυσική κατάσταση	Βιωσιμότητα VRM1 (%) ([2])	Βιωσιμότητα VRM2 (%) ([3])	Πρόβλεψη VRM	Αναγωγικό της MTT	Παρεμπόδιση λόγω χρώματος
Τετραφθοροβορικό κάλιο	14075-53-7	Ανόργανο άλας	Σ	88,6±3,3	92,9±5,1	Καμία κατηγορία	Όχι	Όχι

Συντομογραφίες: CASRN = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstracts Service· GHS του ΟΗΕ = Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (1)· VRM1 = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, EpiOcular™ EIT· VRM2 = επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς, SkinEthic™ HCE EIT· Παρεμπόδιση λόγω χρώματος = παρεμπόδιση, λόγω χρώματος, της τυπικής μέτρησης απορρόφησης [οπτικής πυκνότητας (OD)] της φορμαζάνης MTT.

([1]) Οργανική λειτουργική ομάδα που αποδίδεται σύμφωνα με ένθετη ανάλυση εργαλειοθήκης 3.1 του ΟΟΣΑ (8).

([2]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την EpiOcular™ EIT στη μελέτη επικύρωσης οφθαλμικού ερεθισμού του EURL ECVAM/Cosmetics Europe (EIVS) (8).

([3]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη SkinEthic™ HCE EIT στη μελέτη επικύρωσης (10)(11).

([4]) Βάσει των αποτελεσμάτων της *in vivo* οφθαλμικής δοκιμής σε κουνέλια (μέθοδος δοκιμών B.5/TG 405 του ΟΟΣΑ) (2)(14) και σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ.

([5]) Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στην CEFIC CONsortium για την *in vitro* μελέτη (CON4EI) στρατηγικής δοκιμών οφθαλμικού ερεθισμού.

([6]) Η ταξινόμηση στην κατηγορία 2A ή 2B εξαρτάται από την ερμηνεία του κριτηρίου του GHS του ΟΗΕ για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, δηλ. για την κατάταξη στην κατηγορία 2A είναι απαραίτητο να εμφανίζουν επιδράσεις την 7η ημέρα 1 από τα 3 ζώα έναντι 2 από τα 3 ζώα. Η μελέτη *in vivo* περιλάμβανε 3 ζώα. Όλες οι παράμετροι, εκτός από τη θολερότητα του κερατοειδούς σε ένα ζώο, επανήλθαν σε μηδενική βαθμολογία την ημέρα 7 ή νωρίτερα. Το ένα ζώο που δεν είχε αναρρώσει πλήρως την ημέρα 7 παρουσίαζε θολερότητα του κερατοειδούς βαθμού 1 (την ημέρα 7) η οποία είχε υποχωρήσει πλήρως την ημέρα 9.

23. Στο πλαίσιο της δοκιμής απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών σύμφωνα με τις προδιαγραφές του παραγωγού των ιστικών μορφωμάτων RhCE, μετά την παραλαβή τους (βλ. παραγράφους 25, 27 και 30). Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση μιας δοκιμής και αφού επιτευχθεί και αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρόλα αυτά, όταν η δοκιμή εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

24. Επί του παρόντος, η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει τις επιστημονικά έγκυρες δοκιμές EpiOcular™ EIT και SkinEthic™ HCE EIT (9)(12)(13), που αναφέρονται ως «επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς» (VRM1 και VRM2 αντίστοιχα). Οι τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP) για τις μεθόδους δοκιμών RhCE είναι διαθέσιμες και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή και τη χρήση των μεθόδων δοκιμών στο εργαστήριο (34)(35). Στις ακόλουθες παραγράφους και στο προσάρτημα 2 περιγράφονται τα κύρια στοιχεία και διαδικασίες των δοκιμών RhCE.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHCE

Γενικοί όροι

25. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σχετικά κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης για την ανασύσταση του τρισδιάστατου ιστού επιθηλίου παρόμοιου με του κερατοειδούς, ο οποίος θα πρέπει να αποτελείται από σταδιακώς στρωματοποιημένα αλλά όχι κερατινοποιημένα κύτταρα. Το ιστικό μόρφωμα RhCE παρασκευάζεται σε ενθέματα με πορώδη συνθετική μεμβράνη μέσω της οποίας μπορούν να διέρχονται οι θρεπτικές ουσίες προς τα κύτταρα. Στο παρόμοιο με κερατοειδή ανασυσταθέν επιθήλιο θα πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στοιβάδες βιώσιμων, μη κερατινοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων. Η επιθηλιακή επιφάνεια του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον αέρα ώστε να επιτρέπεται η άμεση τοπική έκθεση στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν διά του οποίου θα εκτίθετο το επιθήλιο του κερατοειδούς *in vivo*. Το ιστικό μόρφωμα RhCE θα πρέπει να σχηματίζει λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση των κυτταροτοξικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, π.χ. Triton X-100 ή δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS). Η λειτουργία φραγμού θα πρέπει να αποδεικνύεται και μπορεί να αξιολογείται μέσω του προσδιορισμού είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για τη μείωση της βιωσιμότητας των ιστών κατά 50 % (ET_{50}) κατά την εφαρμογή ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης σε καθορισμένη, σταθερή συγκέντρωση (π.χ. 100 μl Triton X-1000,3 % κ.ό.) είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}) μετά από καθορισμένο χρόνο διάστημα έκθεσης (π.χ. 30 λεπτά αγωγής με 50 μl SDS) (βλ. παράγραφο 30). Οι ιδιότητες συγκράτησης του ιστικού μορφώματος RhE θα πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη του βιώσιμου ιστού από την υπό δοκιμή χημική ουσία, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του κερατοειδούς. Τα κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να είναι ελεύθερα μολύνσεων από βακτήρια, ιούς, μυκόπλασμα και μύκητες. Ο προμηθευτής θα πρέπει να ελέγχει τη στειρότητα του ιστικού μορφώματος ως προς την απουσία μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

26. Για τον προσδιορισμό της τάξης μεγέθους της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (16). Τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhCE ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT, το οποίο εκχυλίζεται στη συνέχεια από τον ιστό με χρήση ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη). Η τάξη μεγέθουστου

εκχυλισθέντος άλατος φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με χρήση είτε τυπικής μέτρησης απορρόφησης [οπτικής πυκνότητας (OD)] είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (36). Η οπτική πυκνότητα του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλαδή μικρότερη από 0,1. Οι χρήστες του ιστικού μορφώματος RhCE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του ιστικού μορφώματος RhCE πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Στον πίνακα 2 φαίνονται οι αποδεκτές κλίμακες τιμών οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα για τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς. Οι χρήστες HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θα πρέπει να χρησιμοποιούν τις κλίμακες τιμών οπτικής πυκνότητας αρνητικού μάρτυρα που φαίνονται στον πίνακα 2 ως κριτήριο αποδοχής για τον αρνητικό μάρτυρα. Θα πρέπει να τεκμηριώνεται στην έκθεση δοκιμής ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (δηλαδή δίνουν παραπλήσιες τιμές στις μετρήσεις βιωσιμότητας ιστού) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης της δοκιμής. Ο παρασκευαστής του ιστού θα πρέπει να ακολουθεί ανάλογη διαδικασία στο πλαίσιο του ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων ιστών, αλλά στη συγκεκριμένη περίπτωση ενδέχεται να ισχύουν διαφορετικά κριτήρια αποδοχής από εκείνα που φαίνονται στον πίνακα 2. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να προσδιορίζει κλίμακα τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για τις τιμές OD αρνητικού μάρτυρα (στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών ποιοτικού ελέγχου).

Πίνακας 2

Κλίμακες τιμών αποδοχής για τις τιμές OD αρνητικού μαρτύρα (για τους χρήστες της δοκιμής)

Δοκιμή	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (για τα πρωτόκολλα υγρών και στερεών)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (για τα πρωτόκολλα υγρών και στερεών)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Για το εν λόγω όριο αποδοχής λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα αποστολής/αποθήκευσης παρατεταμένης διάρκειας (π.χ. > 4 ημέρες), η οποία έχει αποδειχθεί ότι δεν επηρεάζει τις επιδόσεις της μεθόδου δοκιμών (37).

Λειτουργία φραγμού

27. Το ιστικό μόρφωμα RhCE θα πρέπει να είναι αρκούντως παχύ και ανθεκτικό ώστε να ανθίσταται στην ταχεία διείσδυση των κυτταροτοξικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, όπως εκτιμάται π.χ. βάσει της ET_{50} (Triton X-100) ή της IC_{50} (SDS) (πίνακας 3). Η φραγματική λειτουργία κάθε παρτίδας του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να καταδεικνύεται από τον φορέα ανάπτυξης/πωλητή του ιστικού μορφώματος RhCE κατά την προμήθεια των ιστών στον τελικό χρήστη (βλ. παράγραφο 30).

Μορφολογία

28. Η ιστολογική εξέταση του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να αναδεικνύει δομή επιθηλίου παρόμοιου με ανθρώπινο κερατοειδή (που να περιλαμβάνει τουλάχιστον 3 στοιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων και μη κερατινοποιημένη επιφάνεια). Για τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, η κατάλληλη μορφολογία έχει εξακριβωθεί από τον φορέα ανάπτυξης/προμηθευτή και, ως εκ τούτου, δεν είναι απαραίτητο να καταδεικνύεται εκ νέου από χρήστη της μεθόδου δοκιμών για κάθε χρησιμοποιούμενη παρτίδα ιστών.

Αναπαραγωγιμότητα

29. Τα αποτελέσματα για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες της μεθόδου δοκιμών πρέπει να εμφανίζουν διαχρονική αναπαραγωγιμότητα.

Έλεγχος ποιότητας

30. Το ιστικό μόρφωμα RhCE θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εφόσον ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του ιστικού μορφώματος RhCE ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη βιωσιμότητα (παράγραφος 26) και τη λειτουργία φραγμού (παράγραφος 27). Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να καθορίζει κλίμακα τιμών αποδοχής (ανώτερα και κατώτερα όρια) για τις λειτουργίες φραγμού όπως μετράται από τις ET_{50} ή IC_{50} (βλ. παραγράφους 25 και 26). Η κλίμακα τιμών αποδοχής των ET_{50} και IC_{50} που χρησιμοποιείται ως κριτήριο αποδέσμευσης παρτίδων ποιοτικού ελέγχου από τον φορέα ανάπτυξης/προμηθευτή των ιστικών μορφωμάτων RhCE (που χρησιμοποιούνται στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς) φαίνεται στον πίνακα 3. Ο φορέας ανάπτυξης/προμηθευτής του ιστικού μορφώματος RhCE θα πρέπει να παρέχει στους χρήστες της μεθόδου δοκιμών στοιχεία που καταδεικνύουν τη συμμόρφωση με το σύνολο των κριτηρίων αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής ώστε να μπορούν να συμπεριλαμβάνουν τις εν λόγω πληροφορίες στην έκθεση δοκιμής. Μόνο αποτελέσματα που προκύπτουν με ιστούς που πληρούν όλα αυτά τα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής μπορούν να γίνονται δεκτά για την πραγματοποίηση αξιόπιστης πρόβλεψης σχετικά με χημικές ουσίες που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν και να επισημανθούν ως ουσίες που προκαλούν οφθαλμικό ερεθισμό ή σοβαρή οφθαλμική βλάβη με βάση το GHS του ΟΗΕ / τον κανονισμό CLP.

Πίνακας 3

Κριτήριο ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων

Δοκιμή	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 μl Triton X-1000,3 % κ.ό.)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (αγωγή 30 λεπτών με 50 μl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

31. Σε κάθε σειρά δοκιμών πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα ιστού για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και κάθε μάρτυρα. Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πρωτόκολλα αγωγής, ένα για τις υγρές και ένα για τις στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (34)(35). Και για τις δύο μεθόδους, και για τα δύο πρωτόκολλα, η επιφάνεια των ιστών θα πρέπει να διαβρέχεται με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων Dulbecco ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου (DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}) πριν από την εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, ώστε να προσομοιώνονται οι συνθήκες υγρασίας των ανθρώπινων οφθαλμών. Η αγωγή των ιστών ξεκινά με την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή ουσίες και τους μάρτυρες. Και για τα δύο πρωτόκολλα αγωγής σε αμφότερες τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή μάρτυρα ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια του επιθηλίου και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες δόσεις (βλ. παραγράφους 32 και 33) (προσάρτημα 2).

32. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που μπορούν να φέρονται με σιφώνιο (πιπέτα) στους 37 °C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (με χρήση σιφωνίου θετικής εκτόπισης, εάν χρειάζεται) αντιμετωπίζονται ως υγρά στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, διαφορετικά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως στερεά (βλ. παράγραφο 33). Στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς, οι υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επιστρώνονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια των ιστών (δηλ. εφαρμόζονται τουλάχιστον 60 μl/cm^2) (βλ. προσάρτημα 2) (33)(34). Τα τριχοειδή φαινόμενα (φαινόμενα επιφανειακής τάσης) που μπορεί να εμφανιστούν λόγω των χαμηλών όγκων που εφαρμόζονται στο ένθεμα (στην επιφάνεια του ιστού) θα πρέπει να αποφεύγονται, στο μέτρο του δυνατού, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η χορήγηση της ορθής ποσότητας δόσεων στον ιστό. Οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επωάζονται επί 30 λεπτά σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η υγρή υπό δοκιμή χημική ουσία και οι μάρτυρες θα πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά από την επιφάνεια των ιστών μέσω διεξοδικής έκπλυσης με DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο έκπλυσης ακολουθείται από εμβύθιση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε θερμοκρασία δωματίου (για την αφαίρεση τυχόν χημικής ουσίας που έχει απορροφηθεί από τον ιστό) για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, η διάρκεια του οποίου εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς. Μόνο για τη VMR1, πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας MTT εφαρμόζεται επώαση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας [βλ. προσάρτημα 2, (34)(35)].

33. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν φέρονται με σιφώνιο σε θερμοκρασίες έως 37 °C αντιμετωπίζονται ως στερεά στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM). Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε επαρκή ποσότητα ώστε να καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια του ιστού, θα πρέπει δηλαδή να εφαρμόζονται τουλάχιστον 60 mg/cm^2 (προσάρτημα 2). Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες επωάζονται για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα (ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς) σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας [βλ. προσάρτημα 2, (34) (35)]. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η στερεή υπό δοκιμή χημική ουσία και οι μάρτυρες θα πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά από την επιφάνεια των ιστών μέσω διεξοδικής έκπλυσης με DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο έκπλυσης ακολουθείται από εμβύθιση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε θερμοκρασία δωματίου (για την αφαίρεση τυχόν χημικής ουσίας που έχει απορροφηθεί από τον ιστό) για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, η διάρκεια του οποίου εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη επικυρωμένη μέθοδο αναφοράς, και επώαση μετά την έκθεση σε πρόσφατο θρεπτικό μέσο σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας, πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας MTT [βλ. προσάρτημα 2 (34)(35)].

34. Σε κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνονται αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες προκειμένου να καταδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (που προσδιορίζεται με τον αρνητικό μάρτυρα) και η ευαισθησία (που προσδιορίζεται με τον θετικό μάρτυρα) των ιστών περιλαμβάνονται εντός της κλίμακας τιμών αποδοχής που καθορίζονται βάσει των ιστορικών δεδομένων. Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας παρέχει επίσης τη γραμμή βάσης (βιωσιμότητα ιστού 100 %) για τον υπολογισμό της σχετικής εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία (%$Viability_{test}$). Η συνιστώμενη ουσία θετικού μάρτυρα προς χρήση με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM) είναι ο αμιγής οξικός μεθυλεστέρας (αριθ. CAS 79-20-9, διατίθεται στο εμπόριο μεταξύ άλλων από τη Sigma-Aldrich, αριθ. κατ. 45997, υγρό). Οι συνιστώμενες ουσίες αρνητικού μάρτυρα προς χρήση με τις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς VRM1 και VRM2 είναι το υπερκαθαρό H_2O και το DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} αντίστοιχα. Αυτές ήταν οι ουσίες μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες επικύρωσης των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς και είναι οι ουσίες μάρτυρες για τις οποίες υπάρχουν τα περισσότερα ιστορικά δεδομένα. Η χρήση κατάλληλων εναλλακτικών θετικών ή αρνητικών μαρτύρων θα πρέπει να αιτιολογείται επαρκώς επιστημονικά. Οι αρνητικοί και οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με το ή τα ίδια πρωτόκολλα με αυτά που χρησιμοποιούνται για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που περιλαμβάνονται στη σειρά δοκιμών (δηλ. για τα υγρά και/ή τα στερεά). Η εφαρμογή θα πρέπει να ακολουθείται από έκθεση αγωγής, έκπλυση, εμβύθιση μετά την έκθεση, και επώαση μετά την έκθεση κατά περίπτωση, όπως περιγράφεται για τους μάρτυρες που υποβάλλονται σε δοκιμή παράλληλα με τις υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (βλ. παράγραφο 32) ή για τους μάρτυρες που υποβάλλονται σε δοκιμή παράλληλα με τις στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (βλ. παράγραφο 33), πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας MTT (βλ. παράγραφο 35) (34)(35). Ένα μόνο σύνολο αρνητικών και θετικών μαρτύρων αρκεί για όλες τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες της ίδιας φυσικής κατάστασης (υγρά ή στερεά) που περιλαμβάνονται στην ίδια σειρά δοκιμών.

Μετρήσεις βιωσιμότητας ιστών

35. Η δοκιμασία MTT αποτελεί τυποποιημένη ποσοτική μέθοδο (16) η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των ιστών στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Είναι συμβατή με τη χρήση σε τρισδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Η δοκιμασία MTT διεξάγεται αμέσως μετά την περίοδο επώασης μετά την έκθεση. Στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM), το δείγμα ιστικού μορφώματος RhCE τοποθετείται σε 0,3 ml διαλύματος MTT 1 mg/ml επί 180±15 λεπτά σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας. Η χρωστική ζωτικής χρώσης MTT ανάγεται σε κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT από τα βιώσιμα κύτταρα του ιστικού μορφώματος RhCE. Στη συνέχεια, εκχυλίζεται από τον ιστό το σχηματιζόμενο κυανό ίζημα άλατος φορμαζάνης MTT με χρήση κατάλληλου όγκου ισοπροπανόλης (ή παρεμφερούς διαλύτη) (34)(35). Οι ιστοί που υποβάλλονται σε δοκιμή με υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει να εκχυλίζονται από το επάνω και το κάτω μέρος των ιστών, ενώ οι ιστοί που υποβάλλονται σε δοκιμή με στερεές υπό δοκιμή χημικές ουσίες και έγχρωμα υγρά θα πρέπει να εκχυλίζονται μόνο από το κάτω μέρος του ιστού (ώστε να ελαχιστοποιείται τυχόν μόλυνση του διαλύματος εκχύλισης ισοπροπανόλης με υπό δοκιμή χημική ουσία που ενδεχομένως έχει παραμείνει στον ιστό). Οι ιστοί που υποβάλλονται σε δοκιμή με υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες οι οποίες δεν απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση μπορούν επίσης να εκχυλίζονται μόνο από το κάτω μέρος του ιστού. Οι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες που εξετάζονται παράλληλα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τρόπο ανάλογο με αυτόν της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Το εκχυλισθέν άλας φορμαζάνης MTT μπορεί να προσδιορίζεται ποσοτικά είτε μέσω τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) στα 570 nm με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ±30 nm είτε μέσω διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. παράγραφο 42) (11)(36).

36. Οι οπτικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή η χημική δράση της επί της MTT μπορεί να παρεμποδίσουν τη μέτρηση του άλατος φορμαζάνης MTT, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας των ιστών. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να παρεμποδίσουν τη μέτρηση του άλατος φορμαζάνης MTT επειδή ανάγουν άμεσα την MTT σε κυανή φορμαζάνη MTT και/ή επειδή δρουν παρεμποδιστικά ως έγχρωμες ουσίες, εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία απορροφά το φως, εκ φύσεως ή κατά την αγωγή, στο ίδιο φάσμα με τη φορμαζάνη MTT (δηλ. περίπου στα 570 nm). Θα πρέπει να διενεργούνται προέλεγχοι πριν από τη δοκιμή προκειμένου να επιτρέπεται ο προσδιορισμός των δυνητικών άμεσων αναγωγικών της MTT και/ή των έγχρωμων χημικών ουσιών με παρεμποδιστική δράση, και θα πρέπει να διενεργούνται πρόσθετοι έλεγχοι για την ανίχνευση και τη διόρθωση της δυνητικής παρεμποδιστικής δράσης των εν λόγω υπό δοκιμή χημικών ουσιών (βλ. παραγράφους 37-41). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν μια συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία δεν απομακρύνεται ολοκληρωτικά από το ιστικό μόρφωμα RhCE μέσω έκπλυσης ή όταν διαπερνά το παρόμοιο με κερατοειδή επιθήλιο, και, ως εκ τούτου, εξακολουθεί να είναι παρούσα στα ιστικά μορφώματα RhCE κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας MTT. Όσον αφορά υπό δοκιμή χημικές ουσίες που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με αυτό του άλατος φορμαζάνης MTT (εκ φύσεως ή μετά από αγωγή), οι οποίες δεν είναι συμβατές με την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) της φορμαζάνης MTT λόγω υπέρμετρα ισχυρής παρεμποδιστικής δράσης, δηλαδή ισχυρή απορρόφηση στα 570±30 nm, μπορεί να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση του άλατος φορμαζάνης MTT (βλ. παραγράφους 41 και 42) (11)(36). Ο τρόπος ανίχνευσης και διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των επικυρωμένων μεθόδων αναφοράς (34)(35). Επεξηγηματικά διαγράμματα ροής που παρέχουν καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο προσδιορισμού και μεταχείρισης των άμεσων αναγωγικών της MTT και/ή των έγχρωμων ουσιών με παρεμποδιστική δράση για τις VRM1 και VRM2 παρέχονται επίσης στα προσαρτήματα III και IV αντίστοιχα.

37. Για τον προσδιορισμό της δυνητικής παρεμποδιστικής δράσης υπό δοκιμή χημικών ουσιών που απορροφούν το φως στο ίδιο φάσμα με αυτό του άλατος φορμαζάνης MTT (εκ φύσεως ή μετά από αγωγή) και τη λήψη απόφασης σχετικά με την ανάγκη πρόσθετων μαρτύρων, η υπό δοκιμή χημική ουσία προστίθεται σε νερό και/ή ισοπροπανόλη και επωάζεται για κατάλληλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου [βλ. προσάρτημα 2, (34)(35)]. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία σε νερό και/ή ισοπροπανόλη απορροφά επαρκή ποσότητα φωτός στο φάσμα 570±20 nm για τη VRM1 (βλ. προσάρτημα 3), ή εάν λαμβάνεται έγχρωμο διάλυμα όταν αναμιγνύεται η υπό δοκιμή χημική ουσία με νερό για τη VRM2 (βλ. προσάρτημα 4), η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι παρεμποδίζει την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) του άλατος φορμαζάνης MTT και θα πρέπει να διενεργούνται περαιτέρω έλεγχοι για τις έγχρωμες ουσίες ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, οπότε οι εν λόγω έλεγχοι δεν είναι απαραίτητοι (βλ. παραγράφους 41 και 42 και προσαρτήματα III και IV)(34)(35). Κατά την πραγματοποίηση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία με παρεμποδιστική δράση εφαρμόζεται τουλάχιστον σε δύο πανομοιότυπα δείγματα βιώσιμου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της δοκιμής, αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης της MTT προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζώντες ιστούς (NSC_{living}) (34)(35). Ο έλεγχος μάρτυρα NSC_{living} πρέπει να διενεργείται ταυτόχρονα με τον έλεγχο της έγχρωμης υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, σε περίπτωση πολλαπλών δοκιμών, πρέπει να διεξάγεται ανεξάρτητος έλεγχος NSC_{living} με κάθε εκτελούμενη δοκιμή (σε κάθε σειρά δοκιμών) λόγω της εγγενούς βιολογικής μεταβλητότητας των ζωντανών ιστών. Η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως εξής: η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με το διάλυμα MTT ($\%Viability_{test}$) μείον την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{living}$), δηλαδή πραγματική βιωσιμότητα ιστών = $[\%Viability_{test}]$ - $[\%NSC_{living}]$.

38. Για τον προσδιορισμό των άμεσων αναγωγικών της MTT, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προστίθεται σε πρόσφατο διάλυμα MTT. Κατάλληλη ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται σε διάλυμα MTT και το μείγμα επωάζεται για περίπου 3 ώρες σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (βλ. προσαρτήματα III και IV)(34)(35). Εάν το μείγμα MTT που περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία (ή εναιώρημα για τις μη διαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες) αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, η υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται ότι ανάγει άμεσα την MTT και, επομένως, θα πρέπει να διενεργείται περαιτέρω λειτουργικός έλεγχος σε μη βιώσιμα ιστικά μορφώματα RhCE, ανεξάρτητα από τη χρήση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD) ή διαδικασίας HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας. Σε αυτόν τον πρόσθετο λειτουργικό έλεγχο χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένοι ιστοί με υπολειμματική μόνο μεταβολική δραστηριότητα, οι οποίοι, ωστόσο, απορροφούν και κατακρατούν την υπό δοκιμή χημική ουσία σε βαθμό παρόμοιο με τους βιώσιμους ιστούς. Οι αδρανοποιημένοι ιστοί της VRM1 παρασκευάζονται με έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία («αδρανοποιημένοι με κατάψυξη»). Οι αδρανοποιημένοι ιστοί της VRM2 παρασκευάζονται με παρατεταμένη επώαση (π.χ. τουλάχιστον 24±1 ώρες) σε νερό, ακολουθούμενη από φύλαξη σε χαμηλή θερμοκρασία («αδρανοποιημένοι με νερό»). Κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία που ανάγει την MTT εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο αδρανοποιημένα πανομοιότυπα δείγματα ιστού τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής προκειμένου να προκληθεί μη ειδική αναγωγή της MTT (NSMTT) (34)(35). Ένας μοναδικός μάρτυρας NSMTT ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών/σειρών δοκιμών που διεξάγονται. Η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως εξής: η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στο αναγωγικό της MTT ($\%Viability_{test}$) μείον την εκατοστιαία μη ειδική αναγωγή της MTT που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στο ίδιο αναγωγικό της MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που ελέγχθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή (%NSMTT), δηλαδή πραγματική βιωσιμότητα ιστών = $[\%Viability_{test}]$ − [%NSMTT].

39. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαπιστώνεται ότι παρουσιάζουν τόσο παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος (βλ. παράγραφο 37) όσο και άμεση αναγωγή της MTT (βλ. παράγραφο 38) θα απαιτηθεί επίσης ένα τρίτο σύνολο μαρτύρων κατά την εκτέλεση της τυπικής μέτρησης απορρόφησης (OD), πέραν των μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} που περιγράφονται στις προηγούμενες παραγράφους. Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις σκουρόχρωμων υπό δοκιμή χημικών ουσιών που απορροφούν το φως στο φάσμα 570±30 nm (π.χ. κυανές, ιώδεις, μαύρες), διότι το εγγενές χρώμα τους παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να ανάγουν απευθείας την MTT όπως περιγράφεται στην παράγραφο 38. Κατά συνέπεια, μαζί με τους μάρτυρες NSC_{living} χρειάζεται κατά κανόνα να χρησιμοποιούνται και μάρτυρες NSMTT. Υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες εκτελούνται αμφότεροι οι έλεγχοι μαρτύρων NSMTT και NSC_{living} μπορεί να απορροφηθούν και να συγκρατηθούν από τους ζωντανούς και τους αδρανοποιημένους ιστούς. Ως εκ τούτου, σε αυτή την περίπτωση, ο μάρτυρας NSMTT μπορεί να διορθώσει τη δοκιμή όχι μόνο ως προς την πιθανή άμεση αναγωγή της MTT από την υπό δοκιμή χημική ουσία αλλά και ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος που οφείλεται στην απορρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους αδρανοποιημένους ιστούς. Κατ' αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να προκύψει διπλή διόρθωση ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, δεδομένου ότι ο μάρτυρας NSC_{living} διορθώνει ήδη τη δοκιμή ως προς τηνπαρεμπόδιση

λόγω χρώματος που οφείλεται στην απορρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τους ζωντανούς ιστούς. Για την αποφυγή πιθανής διπλής διόρθωσης ως προς την παρεμπόδιση λόγω χρώματος, πρέπει να χρησιμοποιείται τρίτος μάρτυρας μη ειδικής εμφάνισης χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς (NSC_{killed}) (βλ. προσαρτήματα III και IV)(34)(35). Σε αυτόν τον πρόσθετο μάρτυρα, η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα αδρανοποιημένου ιστού, τα οποία υποβάλλονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής αλλά τα οποία επωάζονται με θρεπτικό μέσο αντί διαλύματος MTT κατά το στάδιο της επώασης MTT. Ένας μοναδικός μάρτυρας NSC_{killed} ανά υπό δοκιμή χημική ουσία αρκεί, ανεξάρτητα από τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών δοκιμών/σειρών δοκιμών που εκτελούνται, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα NSMTT και με την ίδια παρτίδα ιστών. Η πραγματική βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως εξής: η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών που μετρήθηκε με ζωντανούς ιστούς που εκτέθηκαν στην υπό δοκιμή χημική ουσία ($\%Viability_{test}$) μείον τον %NSMTT μείον τον $\%NSC_{living}$ συν την εκατοστιαία μη ειδική εμφάνιση χρώματος που μετρήθηκε με τους αδρανοποιημένους ιστούς που εκτέθηκαν στην παρεμποδιστική υπό δοκιμή χημική ουσία και επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο χωρίς MTT, υπολογιζόμενη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα με την υπό διόρθωση δοκιμή ($\%NSC_{killed}$), ήτοι: πραγματική βιωσιμότητα ιστών = [$\%Viability_{test}$] − [%NSMTT] − [$\%NSC_{living}$] + [$\%NSC_{killed}$].

40. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι παρεμποδίσεις λόγω μη ειδικής αναγωγής της MTT και λόγω μη ειδικού χρώματος ενδέχεται να αυξήσουν την OD (κατά την εκτέλεση μετρήσεων απορρόφησης προτύπου) του εκχυλίσματος ιστού πάνω από την περιοχή γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, και ότι η μη ειδική αναγωγή της MTT μπορεί επίσης να αυξήσει το εμβαδόν της κορυφής του άλατος φορμαζάνης MTT (κατά την εκτέλεση μετρήσεων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας) του εκχυλίσματος ιστού πάνω από την περιοχή γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου. Με βάση τα παραπάνω, είναι σημαντικό κάθε εργαστήριο να καθορίζει την περιοχή τιμών γραμμικότητας OD / εμβαδού κορυφής του φασματοφωτόμετρού του π.χ. με φορμαζάνη MTT (CAS # 57360-69-7), η οποία διατίθεται στο εμπόριο π.χ. από τη Sigma-Aldrich (αρ. κατ. M2003), προτού ξεκινήσει τις δοκιμές χημικών ουσιών για κανονιστικούς σκοπούς.

41. Η τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) με χρήση φασματοφωτόμετρου είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT και των παρεμποδιστικών λόγω χρώματος χημικών ουσιών, όταν η παρατηρούμενη παρεμπόδιση της μέτρησης του άλατος φορμαζάνης της MTT δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρή (δηλαδή οι OD των εκχυλισμάτων που μετρώνται με την υπό δοκιμή χημική ουσία χωρίς καμία διόρθωση ως προς την άμεση αναγωγή της MTT και/ή την παρεμπόδιση λόγω χρώματος περιλαμβάνονται εντός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου). Εντούτοις, τα αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες σε σχέση με τις οποίες προκύπτει %NSMTT και/ή $\%NSC_{living}$ ≥ 60 % (VRM1, και VRM2 για το πρωτόκολλο υγρών) ή 50 % (VRM2 για το πρωτόκολλο στερεών) του αρνητικού μάρτυρα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη με επιφυλακτικότητα, διότι αυτή είναι η τιμή αποκοπής που χρησιμοποιείται στις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς (VRM) για τη διάκριση μεταξύ ταξινομημένων και μη ταξινομημένων χημικών ουσιών (βλ. παράγραφο 44). Ωστόσο, η τυπική απορρόφηση (OD) δεν μπορεί να μετρηθεί όταν η παρεμπόδιση της μέτρησης του άλατος φορμαζάνης MTT είναι ιδιαίτερα ισχυρή (δηλαδή δίνει μη διορθωμένες οπτικές πυκνότητες των εκχυλισμάτων ιστού δοκιμής που βρίσκονται εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου). Οι έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καθίστανται έγχρωμες όταν έρχονται σε επαφή με το νερό ή την ισοπροπανόλη και οι οποίες παρεμποδίζουν υπέρμετρα την τυπική μέτρηση απορρόφησης (OD) του άλατος φορμαζάνης της MTT μπορούν, ωστόσο, να αξιολογούνται με χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας (βλ. προσαρτήματα III και IV). Αυτό οφείλεται στο ότι το σύστημα HPLC/UPLC επιτρέπει τον διαχωρισμό της φορμαζάνης MTT από τη χημική ουσία πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της (36). Για αυτόν τον λόγο, δεν χρειάζονται ποτέ μάρτυρες NSC_{living} ή NSC_{killed} όταν χρησιμοποιείται HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία, ανεξάρτητα από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εντούτοις, μάρτυρες NSMTT θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περίπτωση που υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία ανάγει άμεσα την MTT (βάσει της διαδικασίας που περιγράφεται στην παράγραφο 38). Μάρτυρες NSMTT θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιούνται με υπό δοκιμή χημικές ουσίες που έχουν χρώμα (εγγενές ή εμφανιζόμενο κατά την επαφή με νερό) που παρεμποδίζει την αξιολόγηση της ικανότητας άμεσης αναγωγής της MTT, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 38. Όταν γίνεται χρήση HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT, η εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών υπολογίζεται ως το ποσοστό του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT που μετράται με ζωντανούς ιστούς που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με την κορυφή της φορμαζάνης MTT που μετράται με τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που ανάγουν άμεσα την MTT, η πραγματική βιωσιμότητα υπολογίζεται ως εξής: $\%Viability_{test}$ μείον %NSMTT, όπως περιγράφεται στην τελευταία πρόταση της παραγράφου 38. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι άμεσοι αναγωγείς της MTT ή οι άμεσοι αναγωγείς της MTT οι οποίοι έχουν επίσης παρεμποδιστική δράση λόγω χρώματος, και οι οποίοι κατακρατούνται στους ιστούς μετά την αγωγή και ανάγουν την MTT σε τέτοιο βαθμό ώστε να δίνουν OD (με τυπική μέτρηση OD) ή εμβαδά κορυφών (με χρήση UPLC/HPLC-φασματοφωτομετρίας) εκτός της περιοχής γραμμικότητας του φασματοφωτόμετρου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν με μεθόδους δοκιμών RhCE, αν και δεν αναμένεται να εμφανίζονται παρά σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις.

42. Η HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με όλα τα είδη υπό δοκιμή χημικών ουσιών (έγχρωμων, μη έγχρωμων, αναγωγικών της MTT και μη αναγωγικών της MTT) για τη μέτρηση της φορμαζάνης MTT (11)(36). Λόγω της ποικιλίας των συστημάτων HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας, δεν είναι εφικτό ο κάθε χρήστης να διασφαλίσει την ύπαρξη πανομοιότυπων συνθηκών συστήματος. Για τον λόγο αυτό, πριν από τη χρήση του συστήματος HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT από εκχυλίσματα ιστών, θα πρέπει να καταδεικνύεται η καταλληλότητά του για τον συγκεκριμένο σκοπό διά της εκπλήρωσης των κριτηρίων αποδοχής για σειρά τυποποιημένων παραμέτρων συμμόρφωσης που βασίζονται στις παραμέτρους που περιγράφονται στην καθοδήγηση της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για τον κλάδο σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (36)(38). Οι εν λόγω κύριες παράμετροι και τα κριτήρια αποδοχής τους παρατίθενται στο προσάρτημα 5. Εφόσον εκπληρούνται τα κριτήρια αποδοχής που καθορίζονται στο προσάρτημα 5, το σύστημα HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας θεωρείται κατάλληλο και έτοιμο για μέτρηση της φορμαζάνης MTT υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Κριτήρια αποδοχής

43. Για κάθε σειρά δοκιμών στην οποία γίνεται χρήση παρτίδων ιστών RhCE που έχει διαπιστωθεί ότι πληρούν τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου (βλ. παράγραφο 30), οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να παρουσιάζουν οπτική πυκνότητα αντιπροσωπευτική της ποιότητας των ιστών μετά τα στάδια αποστολής και παραλαβής και τις διεργασίες πρωτοκόλλου και δεν θα πρέπει να βρίσκονται εκτός των καθορισμένων ορίων που εμφαίνονται στον πίνακα 2 (βλ. παράγραφο 26). Παρομοίως, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλ. τον οξικό μεθυλεστέρα, θα πρέπει να παρουσιάζουν μέση βιωσιμότητα ιστών < 50 % σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στην VRM1 με χρήση των πρωτοκόλλων υγρών ή στερεών, και ≤ 30 % (πρωτόκολλο υγρών) ή ≤ 20 % (πρωτόκολλο στερεών) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στην VRM2, ούτως ώστε να αντικατοπτρίζεται η ικανότητά τους να αποκρίνονται σε ερεθιστική υπό δοκιμή χημική ουσία υπό τις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (34)(35). Η μεταβλητότητα της δράσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός των αποδεκτών ορίων (δηλαδή η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % ή η τυπική απόκλιση (SD) μεταξύ τριών πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 18 %). Σε περίπτωση που είτε ο αρνητικός είτε ο θετικός μάρτυρας που περιλαμβάνονται σε μια σειρά δοκιμών είναι εκτός των αποδεκτών πεδίων τιμών, η σειρά θεωρείται ότι δεν πληροί τα κριτήρια και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται. Εάν η μεταβλητότητα της δράσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών είναι εκτός του αποδεκτού πεδίου τιμών, η δοκιμή πρέπει να θεωρείται ότι δεν πληροί τα κριτήρια και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και μοντέλο πρόβλεψης

44. Οι τιμές OD / τα εμβαδά κορυφής που μετρώνται με τα εκχυλίσματα πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών (μέση τιμή μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστών), κανονικοποιημένης ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται ίσος με 100 %. Στον πίνακα 4 φαίνεται η εκατοστιαία τιμή αποκοπής για τη βιωσιμότητα των ιστών κατά τον προσδιορισμό υπό δοκιμή χημικών ουσιών οι οποίες δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ και κανονισμό CLP). Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα ερμηνεύονται ως εξής:

— Η υπό δοκιμή χημική ουσία χαρακτηρίζεται ουσία για την οποία δεν επιβάλλεται ταξινόμηση και επισήμανση βάσει του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP (καμία κατηγορία) εάν η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την έκθεση υπερβαίνει (>) την καθορισμένη εκατοστιαία τιμή αποκοπής βιωσιμότητας των ιστών, όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Σε αυτή την περίπτωση, δεν είναι απαραίτητη η δοκιμή με άλλες μεθόδους.

— Εάν η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών μετά την έκθεση και την επώαση μετά την έκθεση είναι μικρότερη ή ίση με την καθορισμένη εκατοστιαία τιμή αποκοπής για την ιστική βιωσιμότητα, δεν μπορεί να γίνει πρόβλεψη, όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Σε αυτή την περίπτωση θα χρειαστεί δοκιμή με άλλες μεθόδους, διότι οι μέθοδοι δοκιμών RhCE δίνουν ένα ορισμένο ποσοστό ψευδοθετικών αποτελεσμάτων (βλ. παραγράφους 14-15) και δεν είναι εφικτή η διάκριση μεταξύ των κατηγοριών 1 και 2 του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP (βλ. παράγραφο 17).

Πίνακας 4

Μοντέλα πρόβλεψης βάσει της ταξινόμησης του GHS του ΟΗΕ και του κανονισμού CLP

VRM	Καμία κατηγορία	Αδύνατη η διατύπωση πρόβλεψης
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (και για τα δύο πρωτόκολλα)	Μέση βιωσιμότητα ιστών > 60 %	Μέση βιωσιμότητα ιστών ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (για το πρωτόκολλο υγρών)	Μέση βιωσιμότητα ιστών > 60 %	Μέση βιωσιμότητα ιστών ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (για το πρωτόκολλο στερεών)	Μέση βιωσιμότητα ιστών > 50 %	Μέση βιωσιμότητα ιστών ≤ 50 %

45. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες των οποίων το αποτέλεσμα δεν επιδέχεται αμφισβήτηση, αρκεί μία μόνο δοκιμή, αποτελούμενη από δύο τουλάχιστον πανομοιότυπα δείγματα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως η ασυμφωνία μεταξύ των μετρήσεων των πανομοιότυπων δειγμάτων και/ή μια μέση εκατοστιαία τιμή βιωσιμότητας ιστών ίση με 60 ± 5 % (VRM1, και VRM2 για το πρωτόκολλο υγρών) ή 50 ± 5 % (VRM2 για το πρωτόκολλο στερεών), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης δοκιμής, ακόμη και τρίτης δοκιμής, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων δοκιμών.

46. Ανάλογα με την περίπτωση και εφόσον αιτιολογείται, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο καθορισμού διαφορετικών εκατοστιαίων τιμών αποκοπής για τη βιωσιμότητα ιστών για συγκεκριμένους τύπους μειγμάτων, προκειμένου να αυξηθούν οι συνολικές επιδόσεις της μεθόδου δοκιμών για τους συγκεκριμένους τύπους μειγμάτων (βλ. παράγραφο 14). Η χρήση χημικών ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης μπορεί να είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση του δυναμικού πρόκλησης σοβαρής οφθαλμικής βλάβης / οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων υπό δοκιμή ουσιών ή κατηγοριών προϊόντων, ή για την αξιολόγηση του σχετικού δυναμικού οφθαλμικής τοξικότητας ταξινομημένης χημικής ουσίας εντός συγκεκριμένου φάσματος θετικών αποκρίσεων.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένα

47. Τα δεδομένα από μεμονωμένα πανομοιότυπα δείγματα ιστών σε μια σειρά δοκιμών (π.χ. τιμές OD / εμβαδόν κορυφής φορμαζάνης MTT και δεδομένα υπολογισθείσας εκατοστιαίας βιωσιμότητας των ιστών για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τους μάρτυρες, και η τελική πρόβλεψη της μεθόδου δοκιμών RhCE) θα πρέπει να αναφέρονται υπό μορφή πίνακα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων από επαναλήψεις δοκιμών, ανάλογα με την περίπτωση. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρεται η μέση εκατοστιαία βιωσιμότητα των ιστών και η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού (εάν n=2 πανομοιότυπα δείγματα ιστού) ή η SD (εάν n≥ 3 πανομοιότυπα δείγματα ιστού) για κάθε μεμονωμένη υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να αναφέρονται τυχόν παρατηρούμενες παρεμποδίσεις της μέτρησης της φορμαζάνης MTT λόγω άμεσης αναγωγής της MTT και/ή παρεμπόδισης λόγω χρώματος.

Έκθεση δοκιμής

48. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική κατάσταση, πτητικότητα, pH, LogP, μοριακό βάρος, χημική κατηγορία, και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική κατάσταση και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική κατάσταση, πτητικότητα, μοριακό βάρος, χημική κατηγορία, και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διενέργεια της μελέτης, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της χρήσης διαφορετικού αρνητικού μάρτυρα από το υπερκαθαρό H_2O ή το DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}, εάν ισχύει,

— αιτιολόγηση της χρήσης διαφορετικού θετικού μάρτυρα από τον αμιγή οξικό μεθυλεστέρα, εάν ισχύει,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των σειρών δοκιμών.

Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης.

— *Ιστικό μόρφωμα RhCE και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν (με αιτιολόγηση των επιλογών, εάν ισχύει)*

Συνθήκες της μεθόδου δοκιμών

— ιστικό μόρφωμα RhCE που χρησιμοποιήθηκε, περιλαμβανομένου του αριθμού παρτίδας,

— μήκος κύματος και ζώνη διάβασης (κατά περίπτωση) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT, και περιοχή γραμμικότητας της συσκευής μέτρησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο),

— περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φορμαζάνης MTT,

— περιγραφή του συστήματος HPLC/UPLC-φασματοφωτομετρίας που χρησιμοποιήθηκε, κατά περίπτωση,

— πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο ιστικό μόρφωμα RhCE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) ποιοτικός έλεγχος βιωσιμότητας (προμηθευτής)

  ii) βιωσιμότητα υπό τις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (χρήστης),

  iii) ποιοτικός έλεγχος λειτουργίας φραγμού,

  iv) μορφολογία, εάν διατίθεται,

  v) αναπαραγωγιμότητα και προβλεπτική ικανότητα,

  vi) άλλοι ποιοτικοί έλεγχοι του ιστικού μορφώματος RhCE, εάν διατίθενται,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το ιστικό μόρφωμα RhCE. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά: αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου σε σχέση με ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες,

— δήλωση ότι η εγκατάσταση δοκιμών έχει αποδείξει την τεχνική της ικανότητα να χρησιμοποιεί τη μέθοδο δοκιμών προτού την εντάξει στην καθημερινή της πρακτική διά του ελέγχου των χημικών ουσιών ελέγχου ικανότητας.

Κριτήρια της σειράς δοκιμών και της αποδοχής δοκιμής

— μέσες τιμές και πεδία τιμών αποδοχής του θετικού και αρνητικού μάρτυρα βάσει ιστορικών δεδομένων,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για τους θετικούς και τους αρνητικούς μάρτυρες,

— αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για την υπό δοκιμή χημική ουσία.

Διαδικασία δοκιμής

— λεπτομέρειες για την εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμών,

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των μαρτύρων,

— διάρκεια και θερμοκρασία περιόδων έκθεσης και εμβύθισης μετά την έκθεση και επώασης μετά την έκθεση (ανάλογα με την περίπτωση),

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής,

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι άμεσα αναγωγικά της MTT ή /και έγχρωμες, κατά περίπτωση,

— αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ανά υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας, NSMTT, NSC_{living} και NSC_{killed}, κατά περίπτωση).

Αποτελέσματα

— δεδομένα σε μορφή πίνακα από τις επιμέρους υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες, για κάθε σειρά δοκιμών (περιλαμβανομένων των επαναληπτικών πειραμάτων, ανάλογα με την περίπτωση) και κάθε μέτρηση πανομοιότυπου δείγματος, περιλαμβανομένης της τιμής OD ή του εμβαδού κορυφής της φορμαζάνης MTT, της εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της μέσης εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, της διαφοράς μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού ή της SD, και της τελικής πρόβλεψης,

— κατά περίπτωση, αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν για τα άμεσα αναγωγικά της MTT και/ή τις έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της τιμής OD ή του εμβαδού της κορυφής της φορμαζάνης MTT, του %NSMTT, του $\%NSC_{living}$, του $\%NSC_{killed}$, της διαφοράς μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού ή της SD, της τελικής ορθής εκατοστιαίας βιωσιμότητας ιστών, και της τελικής πρόβλεψης,

— αποτελέσματα που προέκυψαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες και τους μάρτυρες σε σχέση με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής για τη σειρά δοκιμών και τη δοκιμή,

— περιγραφή άλλων παρατηρηθεισών επιδράσεων, π.χ. χρώση των ιστών από έγχρωμη υπό δοκιμή χημική ουσία.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Κεφάλαιο B.5 του παρόντος παραρτήματος: Οξείας μορφής ερεθισμός/διάβρωση των οφθαλμών.

(3) Κεφάλαιο B.47 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του βόειου κερατοειδούς για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(4) Κεφάλαιο B.48 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν.

(5) Κεφάλαιο B.61 του παρόντος παραρτήματος: Μέθοδος δοκιμών διαρροής φλουορεσκεΐνης για τον προσδιορισμό διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών.

(6) Κεφάλαιο B.68 του παρόντος παραρτήματος: *In Vitro* μέθοδος δοκιμών βραχυχρόνιας έκθεσης για τον προσδιορισμό i) χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη και ii) χημικών ουσιών για τις οποίες δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN· doi:10.2787/41680. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014 EUR 28173 EN· doi: 10.2787/043697. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016 EUR 28175 EN· doi: 10.2787/390390. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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. (Χειρόγραφο υπό επεξεργασία).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Στο: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. Στο *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της «καταλληλότητας». Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (18).

Χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: χημική ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με μια υπό δοκιμή χημική ουσία. Οι χημικές ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης θα πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες: i) συνεπείς και αξιόπιστες πηγές προέλευσης για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό τους, ii) δομική, λειτουργική ομοιότητα και/ή ομοιότητα χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντος με την υπό δοκιμή χημική ουσία/-ες, iii) γνωστές φυσικοχημικές ιδιότητες; iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων, και v) γνωστή ισχύ στο φάσμα της επιθυμητής απόκρισης.

Ανοδική προσέγγιση (bottom-up): κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες θεωρείται ότι δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν και να επισημανθούν ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που δεν επιβάλλεται να ταξινομηθούν και να επισημανθούν (αρνητική έκβαση) με βάση άλλες χημικές ουσίες (θετική έκβαση).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συμφωνία: βλ. «ορθότητα».

Κερατοειδής: το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού, το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του οφθαλμού.

CV: (Coefficient of Variation) συντελεστής μεταβλητότητας.

Dev: (Deviation) απόκλιση.

EIT: (Eye Irritation Test) δοκιμή οφθαλμικού ερεθισμού.

EURL ECVAM: εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα.

Οφθαλμικός ερεθισμός: πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

ET_{50}: χρόνος έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας συγκριτικής αξιολόγησης.

Ποσοστό ψευδοαρνητικής έκβασης: το ποσοστό όλων των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται αρνητικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ποσοστό ψευδοθετικής έκβασης: το ποσοστό όλων των αρνητικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται θετικές με μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί έναν από τους δείκτες επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

HCE: επιθήλιο ανθρώπινου κερατοειδούς SkinEthic™.

HPLC: υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

IC_{50}: συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία συγκριτικής αξιολόγησης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης (π.χ. αγωγή 30 λεπτών με SDS).

Πλεονάζουσα δόση: ποσότητα υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στο ιστικό μόρφωμα RhCE και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιφάνειας του επιθηλίου.

Μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

LLOQ: (Lower Limit of Quantification) κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.

LogP: λογάριθμος του συντελεστή κατανομής σε οκτανόλη/νερό.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

MTT: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, βρωμιούχο τετραζόλιο-κυανό του θειαζολυλίου.

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι δεν επάγει θετική απόκριση στο σύστημα δοκιμής. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της 100 % βιωσιμότητας των ιστών.

Δεν ταξινομείται: χημικές ουσίες που δεν ταξινομούνται ως προς τον οφθαλμικό ερεθισμό (κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP, κατηγορία 2A ή 2B κατά GHS του ΟΗΕ) ή τη σοβαρή οφθαλμική βλάβη (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ».

NSC_{killed}: (Non-Specific Colour in killed tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε αδρανοποιημένους ιστούς.

NSC_{living}: (Non-Specific Colour in living tissues) μάρτυρας μη ειδικού χρώματος σε ζωντανούς ιστούς.

NSMTT: (Non-Specific MTT reduction) μη ειδική αναγωγή της MTT.

OD: (Optical Density) οπτική πυκνότητα.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών η οποία κρίθηκε ότι είναι επιστημονικά έγκυρη, και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Σε αυτά περιλαμβάνονται: i) βασικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και (iii) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (18).

Θετικός μάρτυρας: δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι επάγει θετική απόκριση στο σύστημα δοκιμής. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (18).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (18).

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική και αποδεκτή για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιπτώσεις δοκιμής και υπό δοκιμή χημικές ουσίες (18).

Αναπαραγωγιμότητα: η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη διεξαγωγή επαναληπτικών δοκιμών με την ίδια υπό δοκιμή χημική ουσία και με τη χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου δοκιμών (βλ. «αξιοπιστία») (18).

Αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς: βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

RhCE: (Reconstructed human Cornea-like Epithelium) ανασυσταθέν επιθήλιο παρόμοιο με τον ανθρώπινο κερατοειδή.

Σειρά δοκιμών: η σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με αρνητικό μάρτυρα και θετικό μάρτυρα.

SD: (Standard Deviation) τυπική απόκλιση.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (18).

Σοβαρή οφθαλμική βλάβη: πρόκληση βλάβης στους οφθαλμικούς ιστούς ή σοβαρής μείωσης της όρασης, κατόπιν εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τους όρους «μη αναστρέψιμες επιδράσεις στους οφθαλμούς» και «κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP».

Τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (Standard Operating Procedures, SOP): επίσημες γραπτές διαδικασίες που περιγράφουν αναλυτικά τον τρόπο εκτέλεσης συγκεκριμένων εργαστηριακών εργασιών της καθημερινής πρακτικής σε σχέση με συγκεκριμένες δοκιμές. Είναι υποχρεωτικές βάσει της ορθής εργαστηριακής πρακτικής (GLP).

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών υπό δοκιμή χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των μεθόδων δοκιμών (18).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Δοκιμή: μια μεμονωμένη υπό δοκιμή χημική ουσία η οποία υποβάλλεται ταυτόχρονα σε δοκιμή σε τουλάχιστον δύο πανομοιότυπα δείγματα ιστών, όπως ορίζεται στην αντίστοιχη SOP.

Βιωσιμότητα των ιστών: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού σε ανασυσταθέντα ιστό, ως ικανότητα αναγωγής της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT, η οποία, ανάλογα με τη μετρούμενη παράμετρο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή τη ζωτικότητα των ζωντανών κυττάρων.

Καθοδική (top-down) προσέγγιση: κλιμακωτή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για υπό δοκιμή χημική ουσία για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει με τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που προκαλούν σοβαρή οφθαλμική βλάβη (θετική έκβαση) σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες (αρνητική έκβαση).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κλιμακωτή στρατηγική δοκιμών: στρατηγική δοκιμών κατά βαθμίδες, στο πλαίσιο της οποίας χρησιμοποιούνται μέθοδοι δοκιμών κατά διαδοχικό τρόπο. Όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια υπό δοκιμή χημική ουσία εξετάζονται σε κάθε στάδιο με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο της στρατηγικής, αν διατίθενται επαρκείς πληροφορίες για να ληφθεί απόφαση περί ταξινόμησης κινδύνου. Εάν σε υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό επικινδυνότητας/ισχύς βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών σε συγκεκριμένο στάδιο, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές (18).

ULOQ: (Upper Limit of Quantification) ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

Κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Σοβαρή οφθαλμική βλάβη».

Κατηγορία 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: βλ. «Οφθαλμικός ερεθισμός».

Καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP: χημικά προϊόντα που δεν πληρούν τις απαιτήσεις ταξινόμησης ως κατηγορίας 1 ή 2 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP (ή κατηγορίας 2A ή 2B κατά GHS του ΟΗΕ). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τον όρο «δεν ταξινομείται».

UPLC: (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Οι μέθοδοι δοκιμών δεν είναι ποτέ έγκυρες με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (18).

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (18).

VRM: (Validated Reference Method) επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς.

VRM1: η EpiOcular™ EIT αναφέρεται ως η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς 1.

VRM2: η SkinEthic™ HCE EIT αναφέρεται ως η επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς 2.

Βάρος της απόδειξης: διαδικασία εξέτασης της ισχύος και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με το δυναμικό επικινδυνότητας που ενέχει μια υπό δοκιμή χημική ουσία.

Προσάρτημα 2

ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ RHCE ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΚΥΡΩΘΕΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΝΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΘΟΥΝ ΚΑΙ ΝΑ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟ Ή ΤΗ ΣΟΒΑΡΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Πρωτόκολλα	Υγρά (φέρονται με σιφώνιο στους 37±1°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επί 15 λεπτά)	Στερεά (δεν φέρονται με σιφώνιο)	Υγρά και παχύρρευστα (φέρονται με σιφώνιο)	Στερεά (δεν φέρονται με σιφώνιο)
Επιφάνεια μοντέλου	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού	Τουλάχιστον 2	Τουλάχιστον 2	Τουλάχιστον 2	Τουλάχιστον 2
Προέλεγχος για παρεμπόδιση λόγω χρώματος	50 µl + 1 ml H_2O επί 60 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (μη έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες), ή 50 µl + 2 ml ισοπροπανόλης με ανάμειξη επί 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες) → εάν η οπτική πυκνότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα 570±20 nm, μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας για την ισοπροπανόλη ή το νερό, είναι > 0,08 (που αντιστοιχεί στο 5 % περίπου της μέσης οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα), θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	50 mg + 1 ml H_2O επί 60 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (μη έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες) και/ή 50 mg + 2 ml ισοπροπανόλης με ανάμειξη επί 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (έγχρωμες και μη έγχρωμες υπό δοκιμή χημικές ουσίες) → εάν η οπτική πυκνότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα 570±20 nm, μετά την αφαίρεση της οπτικής πυκνότητας για την ισοπροπανόλη ή το νερό, είναι > 0,08 (που αντιστοιχεί στο 5 % περίπου της μέσης οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα), θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	10 µl + 90 µl H_2O αναμεμειγμένα επί 30±2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT, 18-28°C) → εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι έγχρωμη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες	10 mg + 90 µl H_2O αναμεμειγμένα επί 30±2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου → εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι έγχρωμη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ζωντανοί προσαρμοσμένοι μάρτυρες

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Προέλεγχος για άμεση αναγωγή της MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180±15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 50 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180±15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι με κατάψυξη προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 50 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180± 15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι σε νερό προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 30 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml διαλύματος επί 180± 15 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → εάν το διάλυμα αποκτήσει κυανό/ιώδες χρώμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένοι σε νερό προσαρμοσμένοι μάρτυρες (χρησιμοποιούνται 30 µl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε διάλυμα MTT ως αρνητικός μάρτυρας)
Προκαταρκτική αγωγή	20 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} επί 30 ± 2 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, προστατευμένο από το φως.	20 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} επί 30±2 λεπτά στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, προστατευμένο από το φως.	—	—
Δόσεις αγωγής και εφαρμογή	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) με χρήση βαθμονομημένου εργαλείου (π.χ. κοφτή κουταλιά βαθμονομημένη να χωράει 50 mg χλωριούχου νατρίου).	10 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Για παχύρρευστο, χρησιμοποιήστε πλέγμα νάιλον	30 µl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} >+ 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Χρόνος και θερμοκρασία έκθεσης	30 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	6 ώρες (± 0,25 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	30 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	4 ώρες (± 0,1 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH

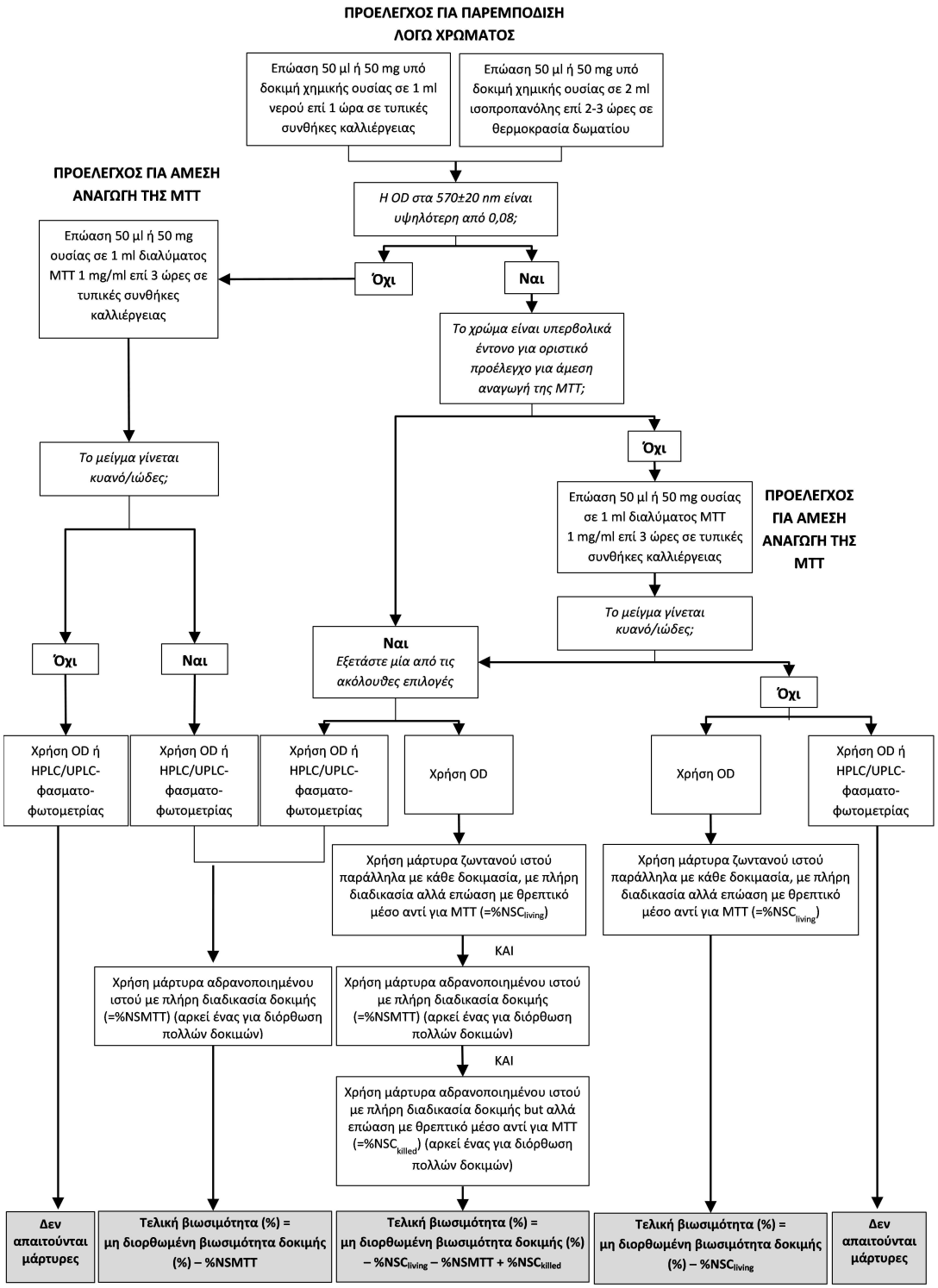
Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Έκπλυση σε θερμοκρασία δωματίου	3 φορές σε 100 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 φορές σε 100 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+}
Εμβύθιση μετά την έκθεση	12 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό μέσο	25 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό μέσο	30 λεπτά (± 2 λεπτά) στους 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH σε θρεπτικό μέσο	30 λεπτά (± 2 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό μέσο
Επώαση μετά την έκθεση	120 λεπτά (± 15 λεπτά) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	18 ώρες (± 0,25 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	καμία	18 ώρες (± 0,5 ώρες) σε θρεπτικό μέσο στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Αρνητικός μάρτυρας	50 μl H_2O Παράλληλη δοκιμή	50 μl H_2O Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl DPBS ελεύθερο Ca^{2+}/Mg^{2+} Παράλληλη δοκιμή
Θετικός μάρτυρας	50 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή	50 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή	30 ± 2 μl οξικού μεθυλεστέρα Παράλληλη δοκιμή

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Διάλυμα MTT	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml
Χρόνος και θερμοκρασία επώασης MTT	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 λεπτά (± 15 λεπτά) στους 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Διαλύτης εκχύλισης	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος με διάτρηση του ιστού)	2 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το κάτω τμήμα του ενθέματος με διάτρηση του ιστού)	1,5 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το επάνω και το κάτω τμήμα του ενθέματος)	1,5 ml ισοπροπανόλης (εκχύλιση από το κάτω τμήμα του ενθέματος)
Χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης	2-3 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονυχτίως στους 4-10°C	2-3 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονυχτίως στους 4-10°C	4 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου ή τουλάχιστον ολονυχτίως χωρίς ανάδευση στους 4-10°C	Τουλάχιστον 2 ώρες με ανάδευση (~120 σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου
Μέτρηση OD	570 nm (550 - 590 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (550-590 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (540 - 600 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς	570 nm (540 - 600 nm) χωρίς φίλτρο αναφοράς
Ποιοτικός έλεγχος ιστού	Αγωγή με 100 μl Triton X-1 000,3% κ.ό. 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 λεπτά	Αγωγή με 100 μl Triton X-1 000,3% κ.ό. 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 λεπτά	Αγωγή 30 λεπτών με SDS (50 μl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Αγωγή 30 λεπτών με SDS (50 μl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Στοιχεία δοκιμής	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Κριτήρια αποδοχής	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 0,8 και < 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 30 λεπτά στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 50 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 0,8 και < 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 6 ώρες στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι < 50 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 1,0 και ≤ 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 30 λεπτά στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 30 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.	1. Η μέση OD των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 1,0 και ≤ 2,5 2. Η μέση βιωσιμότητα των πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού που εκτέθηκαν επί 4 ώρες στον θετικό μάρτυρα, εκφραζόμενη ως ποσοστό (%) του αρνητικού μάρτυρα, θα πρέπει να είναι ≤ 20 % 3. Η διαφορά βιωσιμότητας μεταξύ δύο πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.

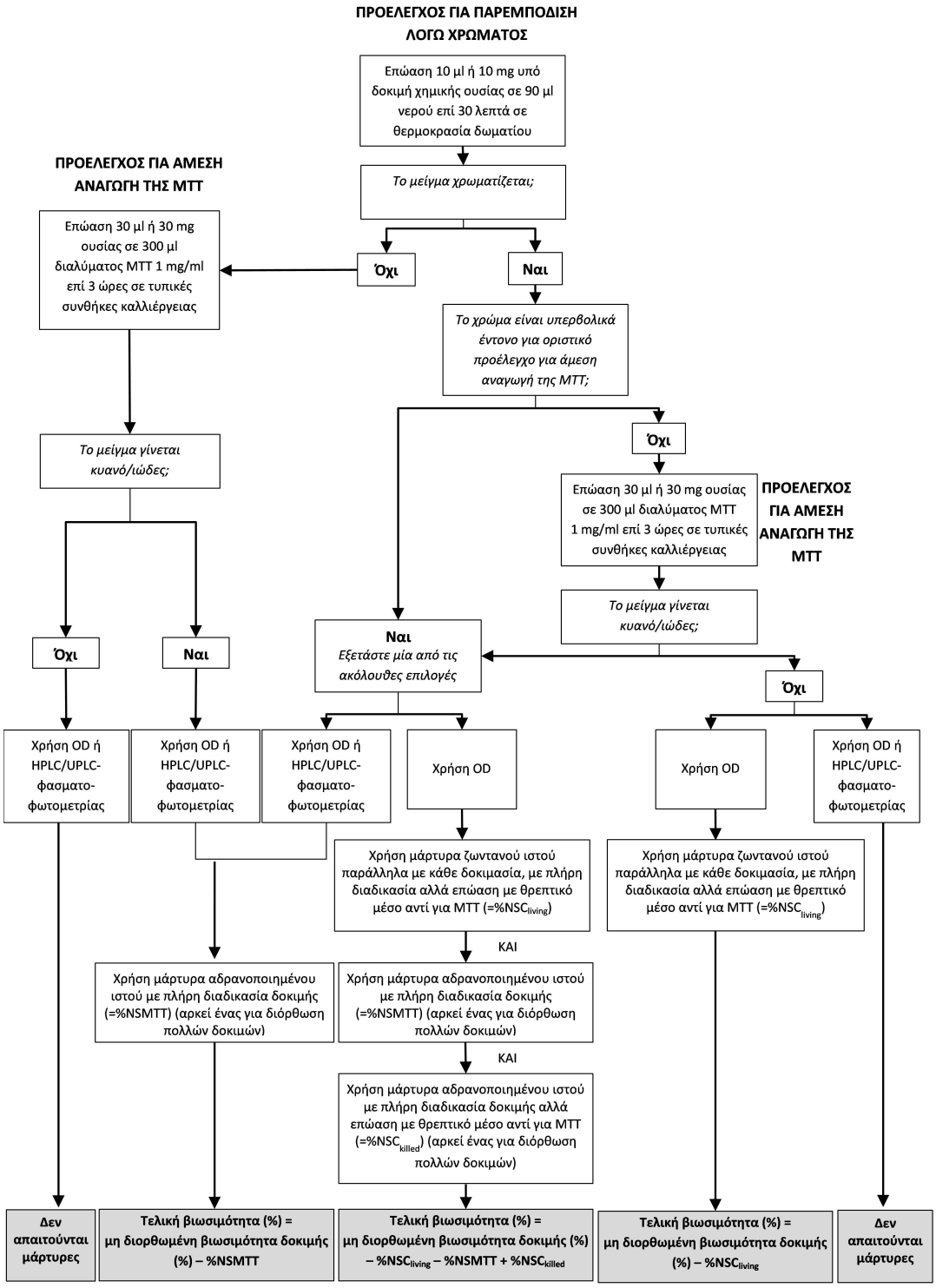
Προσάρτημα 3

ΕΠΕΞΗΓΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΜΕΣΩΝ ΑΝΑΓΩΓΙΚΩΝ ΤΗΣ MTT ΚΑΙ/Η ΤΩΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΩΝ ΛΟΓΩ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ SOP ΤΗΣ VRM1



Προσάρτημα 4

ΕΠΕΞΗΓΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΜΕΣΩΝ ΑΝΑΓΩΓΙΚΩΝ ΤΗΣ MTT ΚΑΙ/Η ΤΩΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΩΝ ΛΟΓΩ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ SOP ΤΗΣ VRM2



Προσάρτημα 5

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC/UPLC-ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗΣ MTT ΠΟΥ ΕΚΧΥΛΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΙΣΤΙΚΑ ΜΟΡΦΩΜΑΤΑ RHE

Παράμετρος	Πρωτόκολλο από την καθοδήγηση της FDA (36)(38)	Κριτήρια αποδοχής
Επιλεκτικότητα	Ανάλυση ισοπροπανόλης, ζωντανού τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από ζωντανούς ιστούς RhCE χωρίς καμία αγωγή), αδρανοποιημένου τυφλού δείγματος (εκχύλισμα ισοπροπανόλης από αδρανοποιημένα ιστικά μορφώματα RhCE χωρίς καμία αγωγή) και χρωστικής (π.χ. κυανό του μεθυλενίου)	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$ ([1])
Ακρίβεια	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου (φορμαζάνη MTT στα 1,6 μg/ml, 16 μg/ml και 160 μg/ml) σε ισοπροπανόλη (n=5)	CV ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Ορθότητα	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	%Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ
Φαινόμενο μήτρας	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=5)	85 % ≤ φαινόμενο μήτρας % ≤ 115 %
Μεταφορά υλικού	Ανάλυση ισοπροπανόλης μετά από πρότυπο ULOQ ([2])	εμβαδόν$_{παρεμβολής}$ ≤ 20 % του εμβαδού$_{LLOQ}$
Αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας)	3 ανεξάρτητες καμπύλες βαθμονόμησης (με βάση 6 διαδοχικές αραιώσεις φορμαζάνης MTT 1:3 σε ισοπροπανόλη, ξεκινώντας από το ULOQ, δηλαδή 200 μg/ml), Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=5)	Καμπύλες βαθμονόμησης: %Dev ≤ 15 % ή ≤ 20 % για το LLOQ Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου: %Dev ≤ 15 % και CV ≤ 15 %
Αναπαραγωγιμότητα (μεταξύ ημερών)	Ημέρα 1: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) Ημέρα 2: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3) Ημέρα 3: 1 καμπύλη βαθμονόμησης και μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ισοπροπανόλη (n=3)	
Βραχυχρόνια σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhCE	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από 24 ώρες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου	%Dev ≤ 15 %
Μακροχρόνια σταθερότητα της φορμαζάνης MTT σε εκχύλισμα ιστών RhCE, εφόσον απαιτείται	Μάρτυρες ποιοτικού ελέγχου σε ζωντανό τυφλό δείγμα (n=3) αναλυόμενοι την ημέρα της παρασκευής και μετά από αρκετές ημέρες φύλαξης στους -20°C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να καλύπτει βιωσιμότητα ιστού 1-2 %, δηλαδή 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: ανώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ορισμένο ώστε να είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερο από την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση φορμαζάνης MTT σε εκχυλίσματα ισοπροπανόλης από αρνητικούς μάρτυρες (~70 μg/ml στην VRM), δηλαδή 200 μg/ml.

B.70 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ER

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ με βάση τις επιδόσεις

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 493 του ΟΟΣΑ (2015). Η TG 493 είναι μια κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών που βασίζεται στις επιδόσεις (PBTG), στην οποία περιγράφεται η μεθοδολογία για τις *in vitro* δοκιμασίες ανασυνδυασμένου ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων για την ανίχνευση συγγένειας δέσμευσης με τον υποδοχέα οιστρογόνων (δοκιμασίες δέσμευσης hrER). Περιλαμβάνει δύο μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερείς δοκιμασίες για τον προσδιορισμό ουσιών που δεσμεύονται στον υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) και αναμένεται να διευκολύνει την ανάπτυξη νέων παρεμφερών ή τροποποιημένων δοκιμασιών, σύμφωνα με τις αρχές επικύρωσης που καθορίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την επικύρωση και τη διεθνή αποδοχή νέων ή επικαιροποιημένων μεθόδων δοκιμών για την αξιολόγηση επικινδυνότητας (1). Οι πλήρως επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών αναφοράς (προσάρτημα 2 και προσάρτημα 3) που αποτελούν τη βάση για την εν λόγω PBTG είναι οι ακόλουθες:

— η *in vitro* δοκιμασία δέσμευσης υποδοχέα οιστρογόνων (ER) Freyberger-Wilson (FW) με χρήση ανθρώπινου ανασυνδυασμένου ERα πλήρους μήκους (2) και

— η *in vitro* δοκιμασία δέσμευσης υποδοχέα οιστρογόνων με χρήση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης περιοχής δέσμευσης προσδέματος, του Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (Ινστιτούτο αξιολόγησης και έρευνας χημικών ουσιών) (2).

Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (PS) (3) που διευκολύνουν την ανάπτυξη και επικύρωση παρεμφερών μεθόδων δοκιμών για την ίδια παράμετρο επικινδυνότητας και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της PBTG 493, ούτως ώστε να εφικτή η προσθήκη νέων παρεμφερών δοκιμασιών στην επικαιροποιημένη PBTG. Εντούτοις, παρεμφερείς δοκιμασίες θα προστίθενται μόνο αφού τις εξετάσει ο ΟΟΣΑ και συμφωνήσει ότι πληρούνται τα πρότυπα επιδόσεων. Οι δοκιμασίες που περιλαμβάνονται στην TG 493 μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις απαιτήσεις των χωρών μελών του ΟΟΣΑ όσον αφορά τα αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με τη δέσμευση υποδοχέα οιστρογόνων, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

Ιστορικό και αρχές των δοκιμασιών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών

2. Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δράση πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων και την εκπόνηση νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών αναθεωρήθηκε το 2012. Τα αρχικά και τα αναθεωρημένα εννοιακά πλαίσια περιλαμβάνονται ως παραρτήματα στο έγγραφο καθοδήγησης «Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption» (Τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών για την αξιολόγηση του δυναμικού χημικών ουσιών ως ενδοκρινικών διαταρακτών) (4). Το εννοιακό πλαίσιο περιλαμβάνει πέντε επίπεδα, καθένα εκ των οποίων αντιστοιχεί σε διαφορετικό επίπεδο βιολογικής πολυπλοκότητας. Οι δοκιμασίες δέσμευσης ER που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών κατατάσσονται στο επίπεδο 2, το οποίο περιλαμβάνει «*in vitro δοκιμασίες για την παροχή δεδομένων σχετικά με επιλεγμένους ενδοκρινικούς μηχανισμούς/οδούς*». Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά *in vitro* δοκιμασίες δέσμευσης υποδοχέα που έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό προσδεμάτων του ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα).

3. Η καταλληλότητα της *in vitro* δοκιμασίας ER για τις βιολογικές λειτουργίες έχει καταδειχθεί με σαφήνεια. Οι δοκιμασίες δέσμευσης ER έχουν σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών που μπορούν να διαταράξουν την οιστρογονική ορμονική οδό και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες για τον χαρακτηρισμό της κατανομής των ER στους ιστούς, καθώς και για τον προσδιορισμό των αγωνιστών/ανταγωνιστών ER. Οι εν λόγω δοκιμασίες αποτυπώνουν την αλληλεπίδραση προσδέματος-υποδοχέα η οποία είναι το πρώτο στάδιο της οδού σηματοδότησης οιστρογόνων και είναι κρίσιμης σημασίας για την αναπαραγωγική λειτουργία όλων των σπονδυλωτών.

4. Η αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με τους ER μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων και να επαγάγει μη γονιδιωματικές επιδράσεις, με αποτέλεσμα την επαγωγή ή την αναστολή κυτταρικών διεργασιών, περιλαμβανομένων όσων είναι αναγκαίες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη φυσιολογική ανάπτυξη του διαμορφωμένου εμβρύου, και την αναπαραγωγική λειτουργία (5) (6) (7). Η διατάραξη των φυσιολογικών οιστρογονικών συστημάτων μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη (οντογένεση), την αναπαραγωγική υγεία και την ακεραιότητα του αναπαραγωγικού συστήματος. Η απρόσφορη σηματοδότηση μέσω των ER μπορεί να οδηγήσει σε επιδράσεις όπως αυξημένος κίνδυνος ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου, δυσμενείς επιπτώσεις στη γονιμότητα και αλλοιώσεις στη διαδικασία αύξησης και ανάπτυξης του εμβρύου (8).

5. Οι *in vitro* δοκιμασίες δέσμευσης βασίζονται στην άμεση αλληλεπίδραση μιας ουσίας με συγκεκριμένη θέση δέσμευσης προσδέματος υποδοχέα που ρυθμίζει τη γονιδιακή μεταγραφή. Το κύριο στοιχείο της δοκιμασίας δέσμευσης ανθρώπινου ανασυνδυασμένου υποδοχέα οιστρογόνων α (hrERα) μετρά την ικανότητα ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ([^{3}H]17β-οιστραδιόλη) να δεσμεύεται στον ER παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστή). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τον ER ανταγωνίζονται με το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες με χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα. Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από δύο βασικά στοιχεία: ένα πείραμα δέσμευσης κορεσμού για τον χαρακτηρισμό των παραμέτρων αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος και την τεκμηρίωση της ειδικότητας του ER, ακολουθούμενο από ένα πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης που χαρακτηρίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ως προς τη δέσμευση στον ER.

6. Μελέτες επικύρωσης των δοκιμασιών δέσμευσης CERI και FW έχουν καταδείξει την καταλληλότητα και την αξιοπιστία τους ως προς τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται (2).

7. Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

Πεδίο εφαρμογής και περιορισμοί που σχετίζονται με τις δοκιμασίες δέσμευσης υποδοχέα

8. Οι δοκιμασίες αυτές προτείνονται για σκοπούς διαλογής και καθορισμού προτεραιοτήτων, αλλά μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες για ένα μοριακό εναρκτήριο συμβάν (MIE) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης. Αφορούν τη δέσμευση χημικών ουσιών στη θέση δέσμευσης προσδέματος ERα σε *in vitro* σύστημα. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να παρεκβάλλονται άμεσα στην πολύπλοκη σηματοδότηση και ρύθμιση του ακέραιου ενδοκρινικού συστήματος *in vivo*.

9. Η δέσμευση του φυσικού προσδέματος, της 17β-οιστραδιόλης, είναι το αρχικό στάδιο της σειράς μοριακών συμβάντων που ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων και καταλήγει εντέλει σε αλλαγές της φυσιολογίας (9). Ως εκ τούτου, η δέσμευση στην περιοχή δέσμευσης προσδέματος ERα θεωρείται ένας από τους βασικούς μηχανισμούς ενδοκρινικών διαταραχών που μεσολαβούνται από τον ER, αν και υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να λάβει χώρα ενδοκρινική διαταραχή, συμπεριλαμβανομένων i) των αλληλεπιδράσεων με θέσεις του ERα διαφορετικές από τη θέση δέσμευσης προσδέματος, ii) των αλληλεπιδράσεων με άλλους υποδοχείς που σχετίζονται με τη σηματοδότηση οιστρογόνων, τον ERβ και τον συζευγμένο με πρωτεΐνη G υποδοχέα οιστρογόνων, άλλους υποδοχείς και ενζυμικά συστήματα εντός του ενδοκρινικού συστήματος, iii) της σύνθεσης ορμονών, iv) της μεταβολικής ενεργοποίησης και/ή της αδρανοποίησης ορμονών, v) της κατανομής ορμονών στους ιστούς στόχους, και vi) της απομάκρυνσης ορμονών από το σώμα. Καμία από τις δοκιμασίες της παρούσας μεθόδου δοκιμών δεν αφορά τους συγκεκριμένους τρόπους δράσης.

10. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά την ικανότητα των ουσιών να δεσμεύονται σε ανθρώπινο ERα και δεν παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ αγωνιστών ή ανταγωνιστών του ERα. Οι δοκιμασίες δεν αφορούν ούτε περαιτέρω κατάντη συμβάντα, όπως η μεταγραφή γονιδίων, ούτε φυσιολογικές αλλαγές. Δεδομένου ότι κατά την επικύρωση χρησιμοποιήθηκαν μόνο μεμονωμένες μονοσυστατικές ουσίες, δεν έχει εξεταστεί η εφαρμοσιμότητα σε μείγματα δοκιμών. Οι δοκιμασίες είναι πάντως θεωρητικά εφαρμόσιμες στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος.

11. Τα ελεύθερα κυττάρων συστήματα υποδοχέα δεν διαθέτουν εγγενή μεταβολική ικανότητα και δεν επικυρώθηκαν σε συνδυασμό με μεταβολικά ενζυμικά συστήματα. Ωστόσο, η ενσωμάτωση της μεταβολικής δραστηριότητας στον σχεδιασμό μελέτης μπορεί να είναι εφικτή αλλά θα απαιτήσει περαιτέρω εργασίες επικύρωσης.

12. Χημικές ουσίες που μπορούν να μετουσιώσουν την πρωτεΐνη (του υποδοχέα), όπως επιφανειοδραστικά ή χημικές ουσίες που μπορούν να μεταβάλλουν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος της δοκιμασίας, δεν επιτρέπεται να υποβάλλονται σε δοκιμή ή επιτρέπεται να υποβάλλονται σε δοκιμή μόνο σε συγκεντρώσεις που δεν προκαλούν τέτοιες αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, το φάσμα συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που μπορεί να εξεταστεί περιορίζεται από τη διαλυτότητά της στο ρυθμιστικό διάλυμα της δοκιμασίας.

13. Για λόγους πληροφόρησης, στον πίνακα 1 παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών αγωνιστών για τις 24 ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή στο πλαίσιο αμφότερων των πλήρως επικυρωμένων δοκιμασιών που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Εξ αυτών, οι 17 χαρακτηρίζονται ουσίες δεσμευόμενες στον ER και οι 6 χαρακτηρίζονται μη δεσμευόμενες με βάση δημοσιευμένες εργασίες, περιλαμβανομένων και *in vitro* δοκιμασιών για μεταγραφική ενεργοποίηση ER και/ή της μητροτροφικής δοκιμασίας (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Όσον αφορά τα δεδομένα που παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1, υπήρξε σχεδόν 100 % συμφωνία μεταξύ των δύο δοκιμασιών σχετικά με τις ταξινομήσεις όλων των ουσιών έως 10^{-4}M, και κάθε ουσία ταξινομήθηκε σωστά ως δεσμευόμενη ή μη δεσμευόμενη στον ER. Συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εν λόγω ομάδα χημικών ουσιών καθώς και πρόσθετων χημικών ουσιών που υποβλήθηκαν στις δοκιμασίες δέσμευσης ER στη διάρκεια των μελετών επικύρωσης παρέχονται στα πρότυπα επιδόσεων για τη δοκιμασία δέσμευσης hrER (3), προσάρτημα 2 (πίνακες 1, 2 και 3).

Πίνακας 1

Ταξινόμηση ουσιών ως δεσμευόμενων ή μη δεσμευόμενων στον ER, όταν υποβάλλονται σε δοκιμή στις δοκιμασίες δέσμευσης hrER FW και CERI σε σύγκριση με την αναμενόμενη απόκριση

	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS	Αναμενόμενη απόκριση	Δοκιμασία FW		Δοκιμασία CERI		Κατηγορία χημικής ουσίας MESH	Κατηγορία προϊόντος
				Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση		
1	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
2	Νορεθυνοδρέλη	68-23-5	*Δεσμευόμενη*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
3	Νορεθινδρόνη	68-22-4	*Δεσμευόμενη*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
4	Φθαλικό δι-*n*-βουτύλιο	84-74-2	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη (**) ()	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), εστέρας	Πλαστικοποιητής, ενδιάμεση χημική ουσία
5	DES	56-53-1	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
6	17α-Αιθινυλοιστραδιόλη	57-63-6	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
7	meso-Εξεστρόλη	84-16-2	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
8	Γενιστεΐνη	446-72-0	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (ετεροκυκλικός), φλαβονοειδές	Φυσικό προϊόν
9	Εκουόλη	531-95-3	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Μεταβολίτης φυτοοιστρογόνων	Φυσικό προϊόν
10	p-Υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας (4-υδροξυβενζοϊκό *n*-βουτύλιο)	94-26-8	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Paraben (p-υδροξυβενζοϊκός εστέρας)	Συντηρητικό

	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS	Αναμενόμενη απόκριση	Δοκιμασία FW		Δοκιμασία CERI		Κατηγορία χημικής ουσίας MESH	Κατηγορία προϊόντος
				Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση		
11	Εννεϋλοφαινόλη (μείγμα)	84852-15-3	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Αλκυλοφαινόλη	Ενδιάμεση ένωση
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Οργανοχλωριούχος	Εντομοκτόνο
13	Κορτικοστερόνη	50-22-6	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φυσικό προϊόν
14	Ζεαραλενόνη	17924-92-4	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (ετεροκυκλικός), λακτόνη	Φυσικό προϊόν
15	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
16	5α-Διυδροτεστοστερόνη	521-18-6	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Στεροειδές, μη φαινολική	Φυσικό προϊόν
17	Δισφαινόλη Α	80-05-7	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
18	4-*n*-Επτυλοφαινόλη	1987-50-4	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Αμφίβολο [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Αλκυλοφαινόλη	Ενδιάμεσο προϊόν
19	Κεπόνη (Chlordecone)	143-50-0	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Υδρογονάνθρακας (αλογονωμένος)	Φυτοφάρμακο
20	Βενζο(a)ανθρακένιο	56-55-3	*Μη δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Μη δεσμευόμενη [b]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Μη δεσμευόμενη [b]	Αρωματικός υδρογονάνθρακας	Ενδιάμεσο προϊόν
21	Εντερολακτόνη	78473-71-9	*Δεσμευόμενη*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Δεσμευόμενη	Φυτοοιστρογόνο	Φυσικό προϊόν
22	Προγεστερόνη	57-83-0	*Μη δεσμευόμενη* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Μη δεσμευόμενη	Στεροειδές	Φυσικό προϊόν

	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS	Αναμενόμενη απόκριση	Δοκιμασία FW		Δοκιμασία CERI		Κατηγορία χημικής ουσίας MESH	Κατηγορία προϊόντος
				Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (M)	Ταξινόμηση		
23	Οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο	2943-75-1	*Μη δεσμευόμενη*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Μη δεσμευόμενη	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Μη δεσμευόμενη	Σιλάνιο	Τροποποιητής επιφανειών
24	Ατραζίνη	1912-24-9	*Μη δεσμευόμενη* (*)	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	Μη δεσμευόμενη	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	Μη δεσμευόμενη	Ετεροκυκλική ένωση,	Ζιζανιοκτόνο

(*) Όριο διαλυτότητας < 1×10^{-4} M.

(**) Η χρήση και ταξινόμηση του φθαλικού δι-n-βουτυλίου (DBP) ως μη δεσμευόμενης ουσίας βασίστηκε στη διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις έως 10^{-4} M, διότι είχε παρατηρηθεί ότι η ουσία είναι αδιάλυτη στα 10^{-3}M (π.χ. θολερότητα) σε ορισμένα εργαστήρια στη διάρκεια των μελετών προεπικύρωσης.

(†) Στη μελέτη επικύρωσης, το φθαλικό δι-*n*-βουτύλιο (DBP) υποβλήθηκε σε δοκιμή ως κωδικοποιημένη υπό δοκιμή χημική ουσία σε συγκεντρώσεις έως 10^{-3} M. Υπό αυτές τις συνθήκες, ορισμένα εργαστήρια παρατήρησαν μείωση της δέσμευσης του ραδιοσημασμένου προσδέματος στην υψηλότερη συγκέντρωση (10^{-3} M) και/ή αμφίβολη προσαρμογή της καμπύλης. Για τις εν λόγω σειρές δοκιμών, η DBP ταξινομήθηκε ως «αμφίβολη» ή «δεσμευόμενη» σε 3/5 εργαστήρια με χρήση της δοκιμασίας CERI και σε 5/6 εργαστήρια με χρήση της δοκιμασίας FW [βλ. παραπομπή (2), ενότητες IV.B.3α, β και VI.A].

(a) Η ταξινόμηση δεν ήταν η αναμενόμενη. Η ταξινόμηση της 4-*n*-επτυλοφαινόλης ως «αμφίβολη» ή «μη δεσμευόμενη» από 3/5 εργαστήρια είχε ως αποτέλεσμα την ταξινόμησή της ως «αμφίβολη» κατά μέσο όρο. Κατόπιν διεξοδικότερου ελέγχου, διαπιστώθηκε ότι αυτό οφειλόταν στους περιορισμούς διαλυτότητας της ουσίας, που εμπόδιζαν την παραγωγή πλήρους καμπύλης δέσμευσης.

(b) Στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης, το βενζο(a)ανθρακένιο ταξινομήθηκε εκ νέου ως μη δεσμευόμενη (αρνητική) ουσία βάσει δημοσιευθείσας βιβλιογραφίας στην οποία καταδεικνύεται ότι η *in vitro* οιστρογόνος δραστηριότητα που αναφέρεται για την εν λόγω ουσία (16) εξαρτάται πρωτίστως από τη μεταβολική ενεργοποίησή της (17)(18). Στις ελεύθερες κυττάρων δοκιμασίες δέσμευσης hrER, όπως χρησιμοποιούνται στην παρούσα διεργαστηριακή μελέτη επικύρωσης, δεν αναμένεται ενζυμική μεταβολική ενεργοποίηση της ουσίας. Ως εκ τούτου, η ορθή ταξινόμηση για την εν λόγω ουσία είναι «μη δεσμευόμενη» όταν χρησιμοποιείται υπό τις πειραματικές συνθήκες που ισχύουν για τις δοκιμασίες FW και CERI.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER

Βασικά στοιχεία της δοκιμασίας

14. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε δοκιμασίες που χρησιμοποιούν υποδοχέα ER και κατάλληλα ισχυρό πρόσδεμα του υποδοχέα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης/ιχνηθέτης για τη δοκιμασία και μπορεί να εκτοπίζεται από αυξανόμενες συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Οι δοκιμασίες δέσμευσης περιλαμβάνουν τα ακόλουθα δύο βασικά στοιχεία: 1) δέσμευση κορεσμού και 2) ανταγωνιστική δέσμευση. Η δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της ειδικότητας και της δραστικότητας των σκευασμάτων υποδοχέα, ενώ το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ικανότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να δεσμεύεται στον hrER.

Μάρτυρες

15. Θα πρέπει να περιγράφεται η βάση του προτεινόμενου παράλληλου οιστρογόνου αναφοράς και των μαρτύρων. Οι παράλληλοι μάρτυρες [διαλύτης (φορέας), θετικός (ουσία δεσμευόμενη στον ER, ισχυρή και ασθενής συγγένεια), αρνητικός (μη δεσμευόμενη ουσία)], κατά περίπτωση, χρησιμεύουν ως ένδειξη της λειτουργικότητας της δοκιμασίας υπό τις συνθήκες δοκιμής και παρέχουν μια βάση για συγκρίσεις μεταξύ πειραμάτων· αποτελούν συνήθως μέρος των κριτηρίων αποδοχής για συγκεκριμένο πείραμα (1). Σε ένα τρυβλίο στη διάρκεια κάθε σειράς δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενη και μη δεσμευόμενη ουσία). Όλα τα άλλα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν: 1) υψηλή (σχεδόν πλήρης εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος) και μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, καθεμία εκ των οποίων εις τριπλούν, 2) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων εις τριπλούν.

Τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου

16. Οι τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να διεκπεραιώνονται σύμφωνα με τα οριζόμενα για κάθε δοκιμασία προκειμένου να διασφαλίζεται ότι οι υποδοχείς είναι ενεργοί, οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών είναι ορθές και τα όρια ανοχής παραμένουν σταθερά στη διάρκεια πολλών επαναλήψεων, διασφαλίζοντας τη διαχρονική ικανότητα παροχής των αναμενόμενων αποκρίσεων δέσμευσης ER.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

17. Πριν από τον έλεγχο άγνωστων χημικών ουσιών με οποιαδήποτε από τις δοκιμασίες της παρούσας μεθόδου δοκιμών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την τεχνική ικανότητά του να διεξάγει δοκιμασίες κορεσμού για την επιβεβαίωση της ειδικότητας και της δραστικότητας του σκευάσματος ER, καθώς και δοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμευσης με το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενης και μη δεσμευόμενης ουσίας). Το εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάση ιστορικών δεδομένων με τα αποτελέσματα για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες που προέκυψαν από 3-5 ανεξάρτητα πειράματα που διεξήχθησαν σε διαφορετικές ημέρες. Τα εν λόγω πειράματα θα αποτελούν τη βάση για το οιστρογόνο αναφοράς και τους ιστορικούς μάρτυρες του εργαστηρίου και θα χρησιμοποιούνται για τη μερική αξιολόγηση της αποδοχής της δοκιμασίας για μελλοντικές σειρές δοκιμών.

18. Η αποκρισιμότητα του συστήματος δοκιμής θα επιβεβαιώνεται και μέσω ελέγχου των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στον πίνακα 2. Ο κατάλογος ουσιών ελέγχου ικανότητας είναι ένα υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER (3). Οι ουσίες αυτές είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, αντιπροσωπεύουν τις κατηγορίες χημικών ουσιών που συνδέονται συνήθως με δράση δέσμευσης των ER, παρουσιάζουν το κατάλληλο φάσμα ισχύος που αναμένεται για τις δεσμευόμενες στον ER ουσίες (ισχυρές έως ασθενείς) και περιλαμβάνουν μη δεσμευόμενες (αρνητικές) ουσίες. Για κάθε ουσία ελέγχου ικανότητας, οι υπό δοκιμή συγκεντρώσεις θα πρέπει να καλύπτουν το φάσμα που παρέχεται στον πίνακα 2. Θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον τρία πειράματα για κάθε ουσία και τα αποτελέσματα θα πρέπει να είναι σύμφωνα με την αναμενόμενη χημική δραστικότητα. Κάθε πείραμα θα πρέπει να διεξάγεται ανεξάρτητα (δηλ. με πρόσφατα παρασκευασμένες αραιώσεις υποδοχέα, χημικών ουσιών και αντιδραστηρίου), με τρία πανομοιότυπα δείγματα για κάθε συγκέντρωση. Η τεχνική ικανότητα αποδεικνύεται μέσω της ορθής ταξινόμησης (θετική/αρνητική) κάθε ουσίας ελέγχου ικανότητας. Οι δοκιμές ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να εκτελούνται από κάθε τεχνικό κατά την εκμάθηση των δοκιμασιών.

Πίνακας 2

Κατάλογος μαρτύρων και ουσιών ελέγχου ικανότητας για τις δοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμευσης hrER (1)

Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS (2)	Αναμενόμενη Απόκριση (3) (4)	Εύρος συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Χημική κατηγορία MeSH (5)	Κατηγορία προϊόντος (6)
Μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία, μη δεσμευόμενη ουσία)						
1	17β-Οιστραδιόλη	50-28-2	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
2	Νορεθυνοδρέλη (ή) Νορεθινδρόνη	68-23-5 (ή) 68-22-4	Δεσμευόμενη	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
3	Οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο	2943-75-1	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Σιλάνιο	Τροποποιητής επιφανειών
Ουσίες ελέγχου ικανότητας (6)						
4	Διαιθυλοστιλβεστρόλη	56-53-1	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
5	17α-Αιθινυλοιστραδιόλη	57-63-6	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Στεροειδές	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
6	meso-Εξεστρόλη	84-16-2	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), φαινόλη	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
7	Ταμοξιφαίνη	10540-29-1	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός)	Φαρμακευτικό προϊόν, κτηνιατρικός παράγοντας
8	Γενιστεΐνη	446-72-0	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ετεροκυκλική ένωση, φλαβονοειδές	Φυσικό προϊόν

Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθ. CAS (2)	Αναμενόμενη Απόκριση (3) (4)	Εύρος συγκεντρώσεων δοκιμής (M)	Χημική κατηγορία MeSH (5)	Κατηγορία προϊόντος (6)
9	Δισφαινόλη Α	80-05-7	Δεσμευόμενη	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Φαινόλη	Ενδιάμεση χημική ουσία
10	Ζεαραλενόνη	17924-92-4	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Ετεροκυκλική ένωση, λακτόνη	Φυσικό προϊόν
11	p-Υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας	94-26-8	Δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Καρβοξυλικό οξύ, φαινόλη	Συντηρητικό
12	Ατραζίνη	1912-24-9	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ετεροκυκλική ένωση,	Ζιζανιοκτόνο
13	Φθαλικό δι-n-βουτύλιο (DBP) (7)	84-74-2	Μη δεσμευόμενη (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Υδρογονάνθρακας (κυκλικός), εστέρας	Πλαστικοποιητής, ενδιάμεση χημική ουσία
14	Κορτικοστερόνη	50-22-6	Μη δεσμευόμενη	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Στεροειδές	Φυσικό προϊόν

(1) Σε περίπτωση που μια ουσία ελέγχου ικανότητας δεν διατίθεται πλέον στο εμπόριο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ουσία με την ίδια ταξινόμηση ως προς δέσμευση του ER και συγκρίσιμη ισχύ και χημική κατηγορία.
(2) Συντομογραφίες: Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service
(3) Ταξινόμηση ως ουσία δεσμευόμενη ή μη δεσμευόμενη στον ERα κατά τη μελέτη επικύρωσης για τις δοκιμασίες δέσμευσης hrER CERI και FW (2).
(4) Η δραστικότητα δέσμευσης ER βασίστηκε στο έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων της ICCVAM για τις δοκιμασίες δέσμευσης ER και TA (9) καθώς και σε εμπειρικά δεδομένα και άλλες πληροφορίες που ελήφθησαν από τις αναφερόμενες δημοσιευμένες μελέτες που εξετάστηκαν (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες χημικές κατηγορίες με χρήση των θεματικών επικεφαλίδων ιατρικού περιεχομένου (Medical Subject Headings, MeSH) της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ, ενός διεθνώς αναγνωρισμένου, τυποποιημένου συστήματος ταξινόμησης (διατίθεται στη διεύθυνση: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Οι ουσίες ταξινομήθηκαν σε μία ή περισσότερες κατηγορίες προϊόντων με χρήση της βάσης δεδομένων επικίνδυνων ουσιών της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των ΗΠΑ (διατίθεται στη διεύθυνση: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) Το DBP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός μάρτυρας μη δεσμευόμενης ουσίας, σε μέγιστη συγκέντρωση 10^{-4} M.
(8) Το όριο διαλυτότητας για την ουσία αυτή είναι 10^{-4}. Η χρήση και ταξινόμηση του φθαλικού δι-n-βουτυλίου (DBP) ως μη δεσμευόμενης ουσίας βασίστηκε στη διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις έως 10^{-4} M, διότι είχε παρατηρηθεί ότι η ουσία είναι αδιάλυτη στα 10^{-3} M (π.χ. θολερότητα) σε ορισμένα εργαστήρια στη διάρκεια των μελετών προεπικύρωσης.

Δοκιμές διαλυτότητας και προσδιορισμός εύρους συγκεντρώσεων για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες

19. Θα πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή για τον προσδιορισμό του ορίου διαλυτότητας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον προσδιορισμό του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων προς χρήση κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής. Το όριο διαλυτότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να προσδιορίζεται αρχικά στον διαλύτη και να επιβεβαιώνεται περαιτέρω υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Η τελική συγκέντρωση που υποβάλλεται σε δοκιμή στη δοκιμασία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 mM. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν μάρτυρα με διαλύτη και οκτώ λογαριθμικές, διαδοχικές αραιώσεις, που ξεκινούν από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM ή χαμηλότερη, με βάση το όριο διαλυτότητας), και καταγραφή της παρουσίας θολερότητας ή ιζήματος. Οι συγκεντρώσεις στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα θα πρέπει να προσαρμόζονται κατά περίπτωση, με σκοπό τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

Κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών

20. Η αποδοχή ή η απόρριψη μιας σειράς δοκιμών βασίζεται στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για το οιστρογόνο αναφοράς και τον μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα. Πρώτον, για το τρυβλίο 1, οι πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για τους μάρτυρες αναφοράς από κάθε πείραμα θα πρέπει να αντιστοιχούν στα μέτρα των επιδόσεων με τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (π.χ. IC_{50} και κλίση Hill) να βασίζονται στα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί για τα αντίστοιχα πρωτόκολλα των δοκιμασιών CERI και FW (προσάρτημα 2 και 3), καθώς και στα ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες του εργαστηρίου που διεξάγει τη δοκιμή. Όλοι οι μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία, μη δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να ταξινομούνται σωστά για κάθε πείραμα. Δεύτερον, πρέπει να αξιολογείται η συνέπεια των μαρτύρων όλων των επακόλουθων τρυβλίων σε σχέση με το τρυβλίο 1. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκές εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να προσδιορίζεται με σαφήνεια η μέγιστη τιμή της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Η μεταβλητότητα μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθώς και μεταξύ των τριών ανεξάρτητων σειρών δοκιμών θα πρέπει να είναι εντός εύλογων ορίων και να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Η ικανότητα συνεπούς διεξαγωγής της δοκιμασίας θα πρέπει να αποδεικνύεται μέσω της ανάπτυξης και διατήρησης βάσης ιστορικών δεδομένων για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες. Ως μέτρο της αναπαραγωγιμότητας εντός εργαστηρίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι τυπικές αποκλίσεις ή οι συντελεστές μεταβλητότητας για τους μέσους όρους των παραμέτρων προσαρμογής των καμπυλών του οιστρογόνου αναφοράς και της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας-μάρτυρα από πολλαπλά πειράματα. Η επανεξέταση των αποτελεσμάτων μαρτύρων τρυβλίων κάθε σειράς δοκιμών καθώς και για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση την επαγγελματική κρίση.

Επιπλέον, αναφορικά με τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να διασφαλίζεται η συμμόρφωση με τις ακόλουθες αρχές:

— θα πρέπει να υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την ποσοτική αξιολόγηση της δέσμευσης ER

— οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται θα πρέπει να παραμένουν εντός του φάσματος διαλυτότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Ανάλυση των δεδομένων

21. Η καθορισμένη διαδικασία ανάλυσης δεδομένων για τα δεδομένα κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις βασικές αρχές χαρακτηρισμού των αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέματος. Τυπικά, τα δεδομένα δέσμευσης κορεσμού αναλύονται με χρήση μοντέλου μη γραμμικής παλινδρόμησης που καλύπτει τη συνολική και τη μη ειδική δέσμευση. Κατά τον προσδιορισμό των Bmax και Kd, ενδέχεται να χρειάζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος [π.χ. Swillens, 1995 (19)]. Τα δεδομένα από τις δοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμευσης τυπικά μετασχηματίζονται [π.χ. εκατοστιαία ειδική δέσμευση και συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (log M)]. Οι εκτιμήσεις των τιμών λογαρίθμου (IC_{50}) για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων. Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να εξετάζονται οι παράμετροι προσαρμογής της καμπύλης και να μελετάται ο βαθμός προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να χρειάζεται συμπληρωματική ανάλυση προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή προσαρμογή της καμπύλης [π.χ. περιορισμός της μέγιστης και/ή της ελάχιστης τιμής της καμπύλης, χρήση του κανόνα του 10 %, βλ. προσάρτημα 4 και παραπομπή 2 (ενότητα III.A.2)].

22. Η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής (παράγραφος 20) υποδεικνύει ότι το σύστημα δοκιμής λειτουργεί σωστά, αλλά δεν διασφαλίζει ότι οποιαδήποτε συγκεκριμένη δοκιμή θα παράξει ορθά δεδομένα. Η επανάληψη των ορθών αποτελεσμάτων της πρώτης δοκιμής αποτελεί την καλύτερη ένδειξη ότι παρήχθησαν ορθά δεδομένα.

Γενικά κριτήρια ερμηνείας των δεδομένων

23. Επί του παρόντος δεν υφίσταται καθολικά αποδεκτή μέθοδος ερμηνείας των δεδομένων δέσμευσης ER. Εντούτοις, τόσο η ποιοτική (π.χ. δεσμευόμενη / μη δεσμευόμενη ουσία) όσο και η ποσοτική [π.χ. log IC_{50}, σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) κ.λπ.] αξιολόγηση της μεσολαβούμενης από τον hrER δραστικότητας θα πρέπει να βασίζονται σε εμπειρικά δεδομένα και ορθή επιστημονική κρίση.

Έκθεση δοκιμής

24. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Δοκιμασία:

— χρησιμοποιηθείσα δοκιμασία,

Μάρτυρας/πρότυπο αναφοράς/υπό δοκιμή χημική ουσία

— πηγή, αριθμός παρτίδας, καταληκτική ημερομηνία χρήσης, εφόσον υπάρχει,

— σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη, εάν είναι γνωστές,

— μέτρηση του pH, της ωσμωμοριακότητας και του ιζήματος του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στο οποίο προστέθηκε η υπό δοκιμή χημική ουσία, κατά περίπτωση.

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμείξεων, κατά περίπτωση και εφόσον είναι πρακτικά εφικτό, κ.λπ.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Διαλύτης/φορέας:

— χαρακτηρισμός (φύση, προμηθευτής και παρτίδα),

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές.

Υποδοχείς:

— προέλευση υποδοχέων (προμηθευτής, αριθ. καταλόγου, παρτίδα, είδος υποδοχέα, παρεχόμενη από τον προμηθευτή συγκέντρωση ενεργού υποδοχέα, παρεχόμενη από τον προμηθευτή πιστοποίηση),

— χαρακτηρισμός των υποδοχέων (περιλαμβανομένων των αποτελεσμάτων δέσμευσης κορεσμού): Kd, Bmax,

— φύλαξη των υποδοχέων,

— ραδιοσημασμένο πρόσδεμα:

— προμηθευτής, αριθ. καταλόγου, παρτίδα, ειδική δραστικότητα.

Συνθήκες δοκιμής:

— περιορισμοί διαλυτότητας υπό τις συνθήκες δοκιμασίας,

— σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης,

— συγκέντρωση υποδοχέα,

— συγκέντρωση ιχνηθέτη (ραδιοσημασμένου προσδέματος),

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,

— εκατοστιαία τιμή φορέα στην τελική δοκιμασία,

— θερμοκρασία και χρόνος επώασης,

— μέθοδος διαχωρισμού δεσμευμένου/ελεύθερου προσδέματος,

— θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες/ουσίες αναφοράς,

— κριτήρια για την κατάταξη δοκιμών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων.

Έλεγχος αποδοχής:

— πραγματικές τιμές IC_{50} και κλίσης Hill για τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες/ουσίες αναφοράς.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα δεδομένα και δεδομένα για δεσμευμένο/ελεύθερο πρόσδεμα,

— έλεγχος επιβεβαίωσης μετουσίωσης, ανάλογα με την περίπτωση,

— η χαμηλότερη αποτελεσματική συγκέντρωση (LEC), εάν υπάρχει,

— τιμές RBA και/ή IC_{50}, ανάλογα με την περίπτωση,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— στατιστικές αναλύσεις, εάν υπάρχουν, μαζί με μέτρο σφάλματος και εμπιστοσύνης (π.χ. SEM, SD, CV ή 95 % CI) και περιγραφή του τρόπου υπολογισμού των τιμών αυτών.

Εξέταση των αποτελεσμάτων:

— εφαρμογή του κανόνα του 10 %

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro,* 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K· Noda, S· Imatanaka, N· Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V· Maskova, J· Zraly, Z· Neca, J· Simeckova, P· Vondracek, J· Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM· Nestor, KM· Fasco, MJ· Pentecost, BT· Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Κανόνας του 10 %: δυνατότητα αποκλεισμού, από τις αναλύσεις, εκείνων των σημείων δεδομένων στα οποία η μέση τιμή των πανομοιότυπων δειγμάτων για την εκατοστιαία ειδική δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπερβαίνει κατά 10 % ή περισσότερο τη μέση τιμή σε χαμηλότερη συγκέντρωση (βλ. προσάρτημα 4).

Κριτήρια αποδοχής: ελάχιστα πρότυπα για τις επιδόσεις των πειραματικών ελέγχων και των προτύπων αναφοράς. Για να θεωρηθεί ένα πείραμα έγκυρο, θα πρέπει να πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής.

Ορθότητα (συμφωνία): ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμασίας και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμασίας (1).

CF: (Conceptual Framework) το εννοιακό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση των ενδοκρινικών διαταρακτών.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV: (Coefficient of variation) συντελεστής μεταβλητότητας.

E2: 17β-οιστραδιόλη

ED: ενδοκρινική διαταραχή

hERα: (Human estrogen receptor alpha) ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α

ER: (Estrogen receptor) υποδοχέας οιστρογόνων

Οιστρογονική δραστικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να μιμείται την ικανότητα της 17β-οιστραδιόλης να δεσμεύεται από τους υποδοχείς οιστρογόνων. Η δέσμευση στον hERα μπορεί να ανιχνευτεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

IC50: ήμισυ της μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης μιας ανασταλτικής χημικής ουσίας.

ICCVAM: (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) Διυπηρεσιακή Συντονιστική Επιτροπή για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ΗΠΑ)

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια, που χρησιμοποιούν το ίδιο πρωτόκολλο και ελέγχουν τις ίδιες ουσίες, μπορούν να παράγουν ανάλογα αποτελέσματα από ποιοτική και ποσοτική άποψη. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων (1).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός εργαστηρίου» (1).

LEC: (Lowest Effective Concentration) η ελάχιστη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που επάγει απόκριση (δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία ο συντελεστής αύξησης της επαγωγής διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τον παράλληλο μάρτυρα με φορέα).

Δοκιμή παρόμοιου τύπου («me-too»): έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε δοκιμασία η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών».

PBTG: (Performance-Based Test Guideline) κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών με βάση τις επιδόσεις.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης δοκιμασίας η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Στα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνονται 1) τα βασικά στοιχεία της δοκιμασίας, 2) κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς, και 3) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη δοκιμασία όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (1).

Ουσίες ελέγχου ικανότητας: υποσύνολο των ουσιών αναφοράς που περιλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται από τα εργαστήρια για να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα στη διεξαγωγή τυποποιημένης δοκιμασίας. Τα κριτήρια επιλογής για τις εν λόγω ουσίες είναι συνήθως τα εξής: αντιπροσωπεύουν όλο το φάσμα αποκρίσεων, διατίθενται στο εμπόριο και συνοδεύονται από διαθέσιμα δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας.

Τεχνική ικανότητα: η αποδεδειγμένη ικανότητα ορθής διεξαγωγής δοκιμασίας, πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών με άγνωστες ουσίες.

Οιστρογόνο αναφοράς: 17β-οιστραδιόλη (E2, CAS 50-28-2).

Μέθοδοι δοκιμών αναφοράς: οι δοκιμασίες στις οποίες βασίζεται η PBTG 493.

RBA: (Relative Binding Affinity) σχετική συγγένεια δέσμευσης. Η RBA μιας ουσίας υπολογίζεται ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για την 17β-οιστραδιόλη

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης μιας δοκιμασίας με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον είναι κατάλληλη και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμασία μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) μιας δοκιμασίας (1).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμασία μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

SD: (Standard Deviation) τυπική απόκλιση.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: δοκιμασία για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (1).

Επικύρωση: η διαδικασία διά της οποίας διακριβώνεται η αξιοπιστία και η καταλληλότητα μιας συγκεκριμένης προσέγγισης, μεθόδου, δοκιμασίας, διεργασίας ή αξιολόγησης για καθορισμένο σκοπό (1).

Προσάρτημα 2

ΟΙ IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERA) FREYBERGER-WILSON ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ER ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΗΚΟΥΣΑ

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Στην παρούσα *in vitro* δοκιμασία κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) χρησιμοποιείται ανθρώπινος υποδοχέας ERα (hrERα) πλήρους μήκους που παράγεται και απομονώνεται από κύτταρα εντόμων μολυσμένα με βακουλοϊό. Το πρωτόκολλο, που ανέπτυξαν οι Freyberger και Wilson, αποτέλεσε αντικείμενο διεθνούς μελέτης επικύρωσης πολλών εργαστηρίων (2), η οποία κατέδειξε την καταλληλότητα και την αξιοπιστία του για τον επιδιωκόμενο σκοπό της δοκιμασίας.

2. Η παρούσα δοκιμασία αποτελεί διαδικασία διαλογής για τον προσδιορισμό ουσιών που μπορούν να δεσμεύονται στον hrERα πλήρους μήκους. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ικανότητας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να ανταγωνίζεται την 17β-οιστραδιόλη όσον αφορά τη δέσμευση από τον hrERα. Τα ποσοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας είναι η IC_{50} (μέτρο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που απαιτείται για να εκτοπιστεί το ήμισυ της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα) και οι σχετικές συγγένειες δέσμευσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τον hrERα σε σύγκριση με τη 17β-οιστραδιόλη. Για λόγους διαλογής των χημικών ουσιών, στα αποδεκτά ποιοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας περιλαμβάνεται η ταξινόμηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως δεσμευόμενων, μη δεσμευόμενων ή αμφίβολης δέσμευσης στον hrERα, με βάση τα κριτήρια που περιγράφονται για τις καμπύλες δέσμευσης.

3. Στη δοκιμασία χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο πρόσδεμα για τον οποίο το εργαστήριο απαιτείται να διαθέτει άδεια ραδιενεργών υλικών. Για κάθε διαδικασία στο πλαίσιο της οποίας γίνεται χρήση ραδιοϊσοτόπων και επικίνδυνων χημικών ουσιών θα πρέπει να τηρούνται οι κανονισμοί και οι διαδικασίες που ορίζει η εθνική νομοθεσία.

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «**ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**» και «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η δοκιμασία δέσμευσης hrERα μετρά την ικανότητα ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ([^{3}H]17β-οιστραδιόλη) να δεσμεύεται στον ER παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστή). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τον ER ανταγωνίζονται με το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες με χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα.

6. Η εν λόγω δοκιμασία αποτελείται από δύο βασικά στοιχεία: ένα πείραμα δέσμευσης κορεσμού για τον χαρακτηρισμό των παραμέτρων αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος, ακολουθούμενο από ένα πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης που χαρακτηρίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ως προς τη δέσμευση στον ER.

7. Σκοπός του πειράματος δέσμευσης κορεσμού είναι ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένης παρτίδας υποδοχέων ως προς τη συγγένεια δέσμευσης και τον αριθμό εν είδει προετοιμασίας για τη διεξαγωγή του πειράματος ανταγωνιστικής δέσμευσης. Το πείραμα δέσμευσης κορεσμού μετρά, υπό συνθήκες ισορροπίας, τη συγγένεια καθορισμένης συγκέντρωσης του υποδοχέα οιστρογόνων σε σχέση με το φυσικό πρόσδεμά του (η οποία αντιπροσωπεύεται από τη σταθερά διάστασης Kd), και τη συγκέντρωση των ενεργών θέσεων του υποδοχέα (Bmax).

8. Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη συγγένεια δέσμευσης μιας ουσίας στον ER, ανταγωνιζόμενη την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη. Η συγγένεια προσδιορίζεται ποσοτικά βάσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας η οποία, σε συνθήκες ισορροπίας, αναστέλλει το 50 % της ειδικής δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης (και η οποία καλείται «αναστολική συγκέντρωση 50 %» ή IC50). Η συγγένεια μπορεί επίσης να εκτιμηθεί με χρήση της σχετικής συγγένειας δέσμευσης (RBA, σε σχέση με την IC50 της οιστραδιόλης που μετράται χωριστά στην ίδια σειρά δοκιμών). Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε καθορισμένη συγκέντρωση παρουσία ευρέος φάσματος (οκτώ τάξεων μεγέθους) συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, τα δεδομένα προσαρμόζονται σε μια μορφή της εξίσωσης Hill (Hill, 1910) βάσει της οποίας περιγράφεται η εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος από ανταγωνιστική δεσμευόμενη ουσία μίας θέσης. Ο βαθμός εκτόπισης της ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε ισορροπία χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως δεσμευόμενης, μη δεσμευόμενης ή αμφίβολης απόκρισης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επίδειξη των αποδεκτών επιδόσεων πρωτεΐνης hrERα

9. Πριν από την ένταξη των δοκιμασιών δέσμευσης κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης στην καθημερινή πρακτική, θα πρέπει να καταδεικνύονται οι ορθές επιδόσεις κάθε νέας παρτίδας hrERα στο εργαστήριο στο οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Για την επίδειξη των επιδόσεων θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία δύο σταδίων. Τα στάδια αυτής είναι τα ακόλουθα:

— Διεξαγωγή δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με σκοπό να καταδειχθεί η ειδικότητα και ο κορεσμός του hrERα. Η μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των δεδομένων αυτών (π.χ. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) και η επακόλουθη ανάλυση Scatchard θα πρέπει να τεκμηριώνουν τη συγγένεια δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με τον hrERα (Kd) και τον αριθμό των υποδοχέων (Bmax) για κάθε παρτίδα hrERα.

— Διεξάγεται μια δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση των ουσιών μαρτύρων [οιστρογόνο αναφοράς (17β-οιστραδιόλη)], μιας ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας (π.χ. νορεθυνοδρέλη ή νορεθινδρόνη) και μιας μη δεσμευόμενης ουσίας (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο, OTES). Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάση ιστορικών δεδομένων για να τεκμηριώνει τη συνέπεια της τιμής IC_{50} και άλλων σχετικών τιμών για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στα διάφορα πειράματα και τις διάφορες παρτίδες hrERα. Οι παράμετροι των καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης για τις ουσίες μάρτυρες θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των ορίων του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % (βλ. πίνακα 1) που αναπτύχθηκαν με χρήση δεδομένων των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης για την παρούσα δοκιμασία (2).

Πίνακας 1

Κριτήρια επιδόσεων που αναπτύχθηκαν για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία της δοκιμασίας δέσμευσης hrER FW

Ουσία	Παράμετρος	Μέσος όρος [a]	Τυπική απόκλιση (n)	Διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % [b]	
				Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
17β-Οιστραδιόλη	Μέγιστη απόκριση (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Ελάχιστη απόκριση (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Κλίση Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Νορεθυνοδρέλη	Μέγιστη απόκριση (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Ελάχιστη απόκριση (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Κλίση Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Νορεθινδρόνη [c]	Μέγιστη απόκριση (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Ελάχιστη απόκριση (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Κλίση Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$(M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Η μέση τιμή (n) ± τυπική απόκλιση (SD) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε τέσσερα εργαστήρια στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παράρτημα Ν της παραπομπής 2).

[b] Τα διαστήματα εμπιστοσύνης επιπέδου 95 % παρέχονται ως οδηγός για τα κριτήρια αποδοχής.

[c] Η υποβολή της νορεθινδρόνης σε δοκιμές ήταν προαιρετική για το υποέργο 4 στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παραπομπή 2, υποέργο 4). Ως εκ τούτου, η μέση τιμή ± SD (n) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων της προσαρμογής της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για τις σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε δύο εργαστήρια.
Η κλίμακα τιμών της IC_{50} θα εξαρτάται από την Kd του σκευάσματος υποδοχέα και τη συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου προσδέματος που χρησιμοποιούνται σε κάθε εργαστήριο. Η κατάλληλη προσαρμογή της κλίμακας τιμών IC_{50} με βάση τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας είναι αποδεκτή.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

10. Βλ. παραγράφους 17 και 18, και πίνακα 2 στην ενότητα «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**» της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Κάθε δοκιμασία (κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης) θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (με πρόσφατα παρασκευασμένες αραιώσεις του υποδοχέα, των χημικών ουσιών και των αντιδραστηρίων) σε διαφορετικές ημέρες, και κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνει τρία πανομοιότυπα δείγματα.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποδοχέα (hrERα)

11. Η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα διαφέρει ελαφρώς ανά παρτίδα και συνθήκες φύλαξης. Για αυτόν τον λόγο, θα πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά την παραλαβή του από τον προμηθευτή. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά τη χρονική στιγμή της σειράς δοκιμών.

12. Υπό κατάλληλες για την ανταγωνιστική δέσμευση συνθήκες (δηλ. 1 nM [^{3}H]-οιστραδιόλη), θα πρέπει να επωάζονται ονομαστικές συγκεντρώσεις υποδοχέα 0,25, 0,5, 0,75, και 1 nM απουσία (συνολική δέσμευση) και παρουσία (μη ειδική δέσμευση) 1 μM μη ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης. Η ειδική δέσμευση, υπολογιζόμενη ως η διαφορά συνολικής και μη ειδικής δέσμευσης, χαράσσεται έναντι της ονομαστικής συγκέντρωσης υποδοχέα. Η συγκέντρωση του υποδοχέα από την οποία προκύπτουν τιμές ειδικής δέσμευσης που αντιστοιχούν στο 20 % της προστεθείσας ραδιοσήμανσης σχετίζεται με την αντίστοιχη ονομαστική συγκέντρωση υποδοχέα, και η εν λόγω συγκέντρωση υποδοχέα θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τα πειράματα κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συχνά, μια τελική συγκέντρωση hrER ίση με 0,5 nM θα συμμορφώνεται με τη συνθήκη αυτή.

13. Σε περίπτωση που αποτυγχάνει επανειλημμένα η ικανοποίηση του κριτηρίου του 20 %, θα πρέπει να ελέγχεται η οργάνωση του πειράματος για πιθανά σφάλματα. Η μη επίτευξη του κριτηρίου του 20 % μπορεί να υποδεικνύει ότι ο αριθμός των ενεργών υποδοχέων στην ανασυνδυασμένη παρτίδα είναι υπερβολικά χαμηλός, οπότε και θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης άλλης παρτίδας υποδοχέων.

Δοκιμασία κορεσμού

14. Θα πρέπει να αξιολογούνται εις τριπλούν οκτώ αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, υπό τις ακόλουθες τρεις συνθήκες (βλ. πίνακα 2):

— απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και παρουσία ER. Έτσι προσδιορίζεται η συνολική δέσμευση βάσει της ραδιενέργειας στις κοιλότητες που περιέχουν μόνο [^{3}H]17β-οιστραδιόλη,

— παρουσία 1 000πλάσιας πλεονάζουσας συγκέντρωσης μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε σχέση με τη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και παρουσία ER. Στόχος είναι ο κορεσμός των ενεργών θέσεων δέσμευσης με μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και ο προσδιορισμός της μη ειδικής δέσμευσης μέσω μέτρησης της ραδιενέργειας στις κοιλότητες. Τυχόν εναπομένουσα ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη που μπορεί να δεσμευτεί στον υποδοχέα θεωρείται ότι δεσμεύεται σε μη ειδική θέση, καθώς η μη ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη βρίσκεται σε τόσο υψηλή συγκέντρωση ώστε θα πρέπει να έχει δεσμευτεί σε όλες τις διαθέσιμες ειδικές θέσεις του υποδοχέα,

— απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και απουσία ER (προσδιορισμός της συνολικής ραδιενέργειας).

Παρασκευή διαλυμάτων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης και μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης

15. Παρασκευάζονται αραιώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε αποθεματικό διάλυμα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης 12 nM έτσι ώστε να προκύπτουν συγκεντρώσεις που κυμαίνονται αρχικά από 0,12 nM έως 12 nM. Με την προσθήκη 40 μl από τα διαλύματα αυτά στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας ενός τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (σε τελικό όγκο 160 μl), θα επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, που κυμαίνονται από 0,03 έως 3,0 nM. Η παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, αποθεματικού διαλύματος και αραιώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων περιγράφονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο FW (2).

16. Οι αραιώσεις των διαλυμάτων 17β-οιστραδιόλης με αιθανόλη θα πρέπει να παρασκευάζονται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας με σκοπό την επίτευξη οκτώ αυξανόμενων συγκεντρώσεων, που κυμαίνονται αρχικά από 0,06 μM έως 6 μM. Οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, από 0,03 μM έως 3 μM, λαμβάνονται με μεταφορά 80 μl των εν λόγω διαλυμάτων στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (σε τελικό όγκο 160 μl). Η τελική συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης στις μεμονωμένες κοιλότητες δοκιμασίας μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να είναι 1 000πλάσια σε σχέση με τη συγκέντρωση ραδιοσημασμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Η παρασκευή των αραιώσεων μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο FW (2).

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ονομαστική συγκέντρωση υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 20±5 % (βλ. παραγράφους 12-13). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται ακριβώς πριν τη χρήση του.

18. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων παρασκευάζονται όπως φαίνεται στον πίνακα 2, με 3 πανομοιότυπα δείγματα ανά συγκέντρωση. Παραδείγματα κατανομής των συγκεντρώσεων και των όγκων της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης, του ρυθμιστικού διαλύματος και του υποδοχέα στα τρυβλία παρέχονται στο προσάρτημα 2.2.

Πίνακας 2

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού

	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			Συνολική δέσμευση (διαλύτης)
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			
Γ													
Δ	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,10 μM E_2			Μη ειδική δέσμευση
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E			
ΣΤ													
Z													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-οιστραδιόλη
ER: υποδοχέας οιστρογόνων
E_2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη

19. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία 2° έως 8°C επί 16 έως 20 ώρες και να τοποθετούνται σε στροφέα στη διάρκεια της περιόδου επώασης.

Μέτρηση της δεσμευμένης σε hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης

20. Η δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη θα πρέπει να διαχωρίζεται από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη με προσθήκη 80 μl μη ραδιοσημασμένου εναιωρήματος DCC σε κάθε κοιλότητα, ανάδευση των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης επί 10 λεπτά και φυγοκέντρησή τους επί 10 λεπτά στις 2 500 σ.α.λ. περίπου. Για την ελαχιστοποίηση της διάστασης της δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα κατά τη διαδικασία αυτή, είναι εξαιρετικά σημαντικό η θερμοκρασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των κοιλοτήτων δοκιμασίας να διατηρείται μεταξύ 2 και 8°C και κάθε στάδιο να διεκπεραιώνεται γρήγορα. Για την αποδοτική και ταχεία επεξεργασία των τρυβλίων, είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναδευτήρα για τρυβλία μικροτιτλοδότησης.

21. Στη συνέχεια, 50 μl υπερκείμενου υγρού που περιέχει τη δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη λαμβάνονται με εξαιρετική προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των κοιλοτήτων από την επαφή με τον DCC, και μεταφέρονται σε δεύτερο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης.

22. Κατόπιν, σε κάθε κοιλότητα (A1-B12 και Δ1 έως E12) προστίθενται 200 μl υγρού σπινθηρισμού, το οποίο μπορεί να μετατρέπει την κινητική ενέργεια των πυρηνικών εκπομπών σε φωτεινή ενέργεια. Οι κοιλότητες Z1-H12 [προσδιοριζόμενες ως συνολικές διασπάσεις ανά λεπτό (dpm)] αντιπροσωπεύουν διαδοχικές αραιώσεις της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης (40 μl) οι οποίες θα πρέπει να παρέχονται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού στις κοιλότητες του τρυβλίου μέτρησης, όπως φαίνεται στον πίνακα 3, δηλαδή περιέχουν μόνο 200 μl υγρού σπινθηρισμού και την κατάλληλη αραίωση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Οι μετρήσεις αυτές δείχνουν την ποσότητα της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, σε dpm, που προστέθηκε σε κάθε σύνολο κοιλοτήτων για τη συνολική δέσμευση και τη μη ειδική δέσμευση.

Πίνακας 3

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού, μέτρηση ραδιενέργειας

	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			Συνολική δέσμευση (διαλύτης)
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			
Γ													
Δ	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			Μη ειδική δέσμευση
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
ΣΤ													
Z	0,03 nM [^{3}H] E_2 (συνολικές dpm)			0,06 nM [^{3}H] E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2			Συνολικές dpm (*)
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-οιστραδιόλη
ER: υποδοχέας οιστρογόνων
E2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη
dpm: διασπάσεις ανά λεπτό
(*) Εδώ, οι ραδιοσημασμένες διαδοχικές αραιώσεις της [^{3}H]-ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης θα πρέπει να προστίθενται απευθείας σε 200 μl υγρού σπινθηρισμού στις κοιλότητες Z1 – H12.

23. Η μέτρηση θα πρέπει να ξεκινά μετά από τουλάχιστον 2 ώρες και ο χρόνος καταμέτρησης θα πρέπει να είναι 40 λεπτά ανά κοιλότητα. Για τον προσδιορισμό των dpm/κοιλότητα με διόρθωση για τη σβέση θα πρέπει να χρησιμοποιείται μετρητής σπινθηρισμού τρυβλίων μικροτιτλοδότησης. Εναλλακτικά, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος μετρητής σπινθηρισμού, τα δείγματα μπορούν να μετρώνται σε συμβατικό μετρητή. Στην περίπτωση αυτή μπορεί ενδεχομένως να μειωθεί ο χρόνος καταμέτρησης.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

24. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση μιας μεμονωμένης συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για κάθε συγκέντρωση σε μία σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία παράλληλα πανομοιότυπα δείγματα. Επιπλέον, για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εκτελούνται τρεις μη παράλληλες σειρές δοκιμών. Η δοκιμασία θα πρέπει να οργανώνεται σε ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων.

Μάρτυρες

25. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας, σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνεται παράλληλος διαλύτης και μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία και μη δεσμευόμενη ουσία). Σε ένα τρυβλίο στη διάρκεια κάθε σειράς δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενη και μη δεσμευόμενη ουσία). Όλα τα υπόλοιπα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν i) υψηλή (μέγιστη εκτόπιση) και μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, ii) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων τουλάχιστον εις τριπλούν. Οι διαδικασίες για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και των διαλυμάτων μαρτύρων, [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, hrERα και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών περιγράφονται στην παραπομπή 2 (παράρτημα K, βλ. πρωτόκολλο δοκιμασίας FW).

Μάρτυρας με διαλύτη:

26. Ο μάρτυρας με διαλύτη υποδεικνύει ότι ο διαλύτης δεν αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής και, επίσης, μετρά τη συνολική δέσμευση (TB). Ο προτιμώμενος διαλύτης είναι η αιθανόλη. Εναλλακτικά, εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή στην αιθανόλη, μπορεί να χρησιμοποιείται DMSO. Η συγκέντρωση της αιθανόλης ή του DMSO, εφόσον χρησιμοποιείται, στις κοιλότητες της τελικής δοκιμασίας είναι 1,5 % και δεν μπορεί να υπερβαίνει το 2 %.

Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα:

27. Ο μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα δεν θα πρέπει να περιέχει ούτε διαλύτη ούτε υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά όλα τα υπόλοιπα στοιχεία της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας.

Ισχυρώς δεσμευόμενη ουσία (οιστρογόνο αναφοράς)

28. Η 17β-οιστραδιόλη (CAS 50-28-2) είναι το ενδογενές πρόσδεμα και δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στον ER υποτύπου α. Θα πρέπει να καταρτίζεται πρότυπη καμπύλη με χρήση 17β-οιστραδιόλης για κάθε δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrERα, προκειμένου να είναι δυνατή η αξιολόγηση της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας στο ίδιο εργαστήριο. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε αιθανόλη, με εύρος συγκεντρώσεων στις κοιλότητες δοκιμασίας 100 nM – 10 pM (-7[logM] έως -11[logM]), στα εξής διαστήματα: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Η υψηλότερη συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης (1 μM) χρησιμεύει επίσης ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης. Παρότι αποτελεί επίσης μέρος της πρότυπης καμπύλης, η συγκεκριμένη συγκέντρωση διακρίνεται από την ένδειξη «NSB» στον πίνακα 4.

Ασθενώς δεσμευόμενη ουσία

29. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται μια ασθενώς δεσμευόμενη ουσία [νορεθυνοδρέλη (CAS68-23-5) ή νορεθινδρόνη (CAS 68-22-4)] προκειμένου να καταδεικνύεται η ευαισθησία κάθε πειράματος και να παρέχεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου στο πλαίσιο διεξαγωγής της δοκιμασίας. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας σε αιθανόλη, με εύρος συγκεντρώσεων στις κοιλότητες δοκιμασίας 3 nM έως 30 μM (-8,5[logM] έως -4,5[logM]), στα εξής διαστήματα: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Μη δεσμευόμενη ουσία

30. Ως αρνητικός μάρτυρας (μη δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να χρησιμοποιείται το οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο (OTES, CAS 2 943-75-1). Αυτό διασφαλίζει ότι η δοκιμασία θα ανιχνεύσει τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν δεσμεύονται στον hrERα. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της μη δεσμευόμενης ουσίας σε αιθανόλη, με εύρος συγκεντρώσεων στις κοιλότητες δοκιμασίας 0,1 nM έως 1 000 μM (-10[logM] έως -3[logM]), ανά λογαριθμικές βηματικές προσαυξήσεις. Ως εναλλακτικός μάρτυρας μη δεσμευόμενης ουσίας μπορεί να χρησιμοποιείται το φθαλικό δι-*n*-βουτύλιο (DBP). Η μέγιστη διαλυτότητά του έχει καταδειχθεί ότι είναι -4[logM].

Συγκέντρωση hrERα

31. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ποσότητα υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 20±5 % ραδιοσημασμένου προσδέματος 1 nM (βλ. παραγράφους 12-13 του προσαρτήματος 2). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται ακριβώς πριν τη χρήση του.

[^{3}H]17β-οιστραδιόλη

32. Η συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στις κοιλότητες δοκιμασίας θα πρέπει να είναι 1,0 nM.

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

33. Καταρχάς, είναι απαραίτητο να διεξάγεται δοκιμή διαλυτότητας για τον προσδιορισμό του ορίου διαλυτότητας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον προσδιορισμό του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων προς χρήση κατά τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου δοκιμής. Το όριο διαλυτότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να προσδιορίζεται αρχικά στον διαλύτη και να επιβεβαιώνεται περαιτέρω υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Η τελική συγκέντρωση που υποβάλλεται σε δοκιμή στη δοκιμασία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 mM. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν μάρτυρα με διαλύτη και 8 λογαριθμικές, διαδοχικές αραιώσεις, που ξεκινούν από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM ή χαμηλότερη, με βάση το όριο διαλυτότητας), και καταγραφή της παρουσίας θολερότητας ή ιζήματος (βλ. επίσης παράγραφο 35). Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση 8 λογαριθμικά κατανεμημένων καμπυλών συγκέντρωσης, όπως έχουν καθοριστεί από την προηγούμενη δοκιμή προσδιορισμού εύρους συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα θα πρέπει να προσαρμόζονται κατά περίπτωση, με σκοπό τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

34. Οι αραιώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρασκευάζονται στον κατάλληλο διαλύτη (βλ. παράγραφο 26 του προσαρτήματος 2). Εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή ούτε σε αιθανόλη ούτε σε DMSO, και η προσθήκη περισσότερου διαλύτη θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύτη στον τελικό σωλήνα πάνω από το αποδεκτό όριο, επιτρέπεται η μείωση της υψηλότερης συγκέντρωσης έως την επόμενη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να προστεθεί μία επιπλέον συγκέντρωση στο χαμηλό άκρο της σειράς συγκεντρώσεων. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της σειράς θα πρέπει να παραμείνουν αμετάβλητες.

35. Τα διαλύματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά όταν προστίθενται στην κοιλότητα δοκιμασίας, καθότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να σχηματίσει ίζημα κατά την προσθήκη της στην κοιλότητα δοκιμασίας. Τα δεδομένα για όλες τις κοιλότητες που περιέχουν ίζημα θα πρέπει να αποκλείονται από την προσαρμογή της καμπύλης, και θα πρέπει να καταγράφεται ο λόγος του αποκλεισμού τους.

36. Εάν υπάρχουν ήδη διαθέσιμες πληροφορίες από άλλες πηγές που παρέχουν τον λογάριθμο (IC_{50}) μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ίσως είναι σκόπιμο τα διαστήματα των αραιώσεων να διαμορφωθούν με γεωμετρικό τρόπο [δηλ. 0,5 λογαριθμικές μονάδες γύρω από τον αναμενόμενο λογάριθμο (IC_{50})]. Το τελικό αποτέλεσμα θα πρέπει να αντιπροσωπεύει επαρκή διασπορά συγκεντρώσεων εκατέρωθεν του λογάριθμου (IC_{50}), περιλαμβανομένης της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής, κατά τρόπον ώστε να είναι εφικτός ο επαρκής χαρακτηρισμός της καμπύλης δέσμευσης.

Οργάνωση τρυβλίων δοκιμασίας

37. Θα πρέπει να προετοιμάζονται επισημασμένα τρυβλία μικροτιτλοδότησης για εξαπλές επωάσεις, με κωδικούς για τον μάρτυρα με διαλύτη, την υψηλότερη συγκέντρωση του οιστρογόνου αναφοράς που χρησιμεύει επίσης ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης (NSB), καθώς και τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα, και για τριπλές επωάσεις με κωδικούς για καθεμία από τις οκτώ συγκεντρώσεις του μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο), τις 7 χαμηλότερες συγκεντρώσεις για το οιστρογόνο αναφοράς, τα επίπεδα δόσης των οκτώ συγκεντρώσεων της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, και τις 8 συγκεντρώσεις κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC). Ένα παράδειγμα διάταξης του διαγράμματος τρυβλίων για τις πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης που αφορούν το οιστρογόνο αναφοράς και τον μάρτυρα παρέχεται στον πίνακα 4 κατωτέρω. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται πρόσθετα τρυβλία μικροτιτλοδότησης, τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνουν μάρτυρες τρυβλίων, ήτοι 1) μια υψηλή (μέγιστη εκτόπιση) και μία μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, και 2) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων εις εξαπλούν (πίνακας 5). Παράδειγμα φύλλου εργασίας διάταξης τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση τριών άγνωστων υπό δοκιμή χημικών ουσιών παρέχεται στο προσάρτημα 2.3. Οι συγκεντρώσεις που φαίνονται στους πίνακες 4 και 5 είναι οι τελικές συγκεντρώσεις της δοκιμασίας. Η μέγιστη συγκέντρωση για την E2 θα πρέπει να είναι 1×10^{-7} M, ενώ όσον αφορά την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στο τρυβλίο 1. Η συγκέντρωση IC_{50} θα πρέπει να καθορίζεται από το εργαστήριο βάσει της βάσης ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες. Η εν λόγω τιμή αναμένεται να είναι παρεμφερής με την τιμή που παρατηρήθηκε στις μελέτες επικύρωσης (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 4

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης, πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (τρυβλίο 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (μόνο διαλύτης)			TB (μόνο διαλύτης)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
Γ	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Τυφλό (*)		
Δ	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 ($1\times10^{-8,5}$)		
ΣΤ	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
Z	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Τυφλό (για ραδιοσήμανση) (**)			Τυφλό (για ραδιοσήμανση) (**)			Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα			Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα		

Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)

(*) πραγματικό τυφλό, μη χρησιμοποιούμενη κοιλότητα

(**) τυφλό, δεν χρησιμοποιείται κατά την επώαση, αλλά χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της συνολικής προστιθέμενης ραδιενέργειας.

Πίνακας 5

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης, πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τους μάρτυρες τρυβλίου

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (μόνο διαλύτης)			TB (μόνο διαλύτης)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
Γ	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
Δ	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})		
ΣΤ	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
Z	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})		

Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)

Ολοκλήρωση της δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης

38. Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, στις κοιλότητες θα πρέπει να προστεθούν 80 μl του μάρτυρα με διαλύτη, του οιστρογόνου αναφοράς, της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, της μη δεσμευόμενης ουσίας και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα της δοκιμασίας. Στη συνέχεια, σε κάθε κοιλότητα θα πρέπει να προστεθούν 40 μl διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης 4 nM. Μετά από ήπια ανάδευση επί 10 έως 15 λεπτά σε θερμοκρασία μεταξύ 2° και 8°C, θα πρέπει να προστεθούν 40 μl διαλύματος hrERα. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία 2° έως 8°C επί 16 έως 20 ώρες και να τοποθετούνται σε περιστροφικό αναδευτήρα στη διάρκεια της περιόδου επώασης.

Πίνακας 6

'Ογκος στοιχείων δοκιμασίας για τη δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrER, τρυβλία μικροτιτλοδότησης

Όγκος (μl)	Συστατικό
80	Μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη, νορεθυνοδρέλη, OTES, υπό δοκιμή χημικές ουσίες, διαλύτης ή ρυθμιστικό διάλυμα
40	4 nM διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης
40	Διάλυμα hrERα, συγκέντρωση όπως έχει καθοριστεί
160	***Συνολικός όγκος σε κάθε κοιλότητα δοκιμασίας***

39. Στη συνέχεια, θα πρέπει να πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, μετά τον διαχωρισμό της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη, διά της προσθήκης 80 μl μη ραδιοσημασμένου εναιωρήματος DCC σε κάθε κοιλότητα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 20-23 για τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

40. Οι κοιλότητες H1-6 [που προσδιορίζονται ως τυφλό δείγμα (για τη ραδιοσήμανση) στον πίνακα 4] αντιπροσωπεύουν τις dpm της [^{3}H]-ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε 40 μl. Η ποσότητα των 40 μl θα πρέπει να προστίθεται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού στις κοιλότητες H1 – H6.

Κριτήρια αποδοχής

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

41. Η καμπύλη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να φθάνει σε ένα πλατώ όταν χρησιμοποιούνται αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, γεγονός που υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με το πρόσδεμα.

42. Η ειδική δέσμευση σε 1 nM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του αποδεκτού φάσματος 15 % έως 25 % της μέσης μετρηθείσας συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε σε όλες τις σειρές δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί και η δοκιμασία κορεσμού να επαναληφθεί.

43. Από τα δεδομένα θα πρέπει να προκύπτει γραμμικό διάγραμμα Scatchard.

44. Η μη ειδική δέσμευση δεν θα πρέπει να είναι υπέρμετρη. Η τιμή της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να αντιστοιχεί κατά κανόνα σε <35 % της συνολικής δέσμευσης. Ωστόσο, ο λόγος μπορεί περιστασιακά να υπερβαίνει το εν λόγω όριο, όταν μετρώνται ιδιαίτερα χαμηλές dpm για τη χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

45. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να εκτοπίζουν την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη από τον υποδοχέα κατά τρόπο που συνάδει με ανταγωνιστική δέσμευση μίας θέσης.

46. Η τιμή IC_{50} για το οιστρογόνο αναφοράς (δηλ. τη 17β-οιστραδιόλη) θα πρέπει να είναι κατά προσέγγιση ίση με τη γραμμομοριακή συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης συν την Kd που προσδιορίζεται από τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

47. Η συνολική ειδική δέσμευση θα πρέπει να εμπίπτει σταθερά εντός του αποδεκτού φάσματος 20 ± 5 % όταν η μέση μετρηθείσα συγκέντρωση συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε σε κάθε κοιλότητα ήταν 1 nM στη διάρκεια όλων των σειρών δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί.

48. Ο διαλύτης δεν θα πρέπει να αλλοιώνει την ευαισθησία ή την αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με διαλύτη (κοιλότητες ΤΒ) συγκρίνονται με τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα της συνολικής δέσμευσης (ΤΒ) και του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμα, εάν δεν υπάρχει επίδραση του διαλύτη στη δοκιμασία.

49. Η μη δεσμευόμενη ουσία δεν θα πρέπει να εκτοπίζει ποσοστό άνω του 25 % της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα, όταν ελέγχεται σε συγκέντρωση έως 10^{-3} M (OTES) ή 10^{-4} M (DBP).

50. Για το οιστρογόνο αναφοράς και δύο ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες (π.χ. νορεθυνοδρέλη, νορεθινδρόνη) αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων με χρήση δεδομένων από τη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας δέσμευσης hrER FW (παράρτημα Ν της παραπομπής 2). Παρέχονται διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τη μέση τιμή (n) +/- την SD για όλες τις σειρές δοκιμών μάρτυρα σε όλα τα εργαστήρια που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης. Υπολογίστηκαν διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (δηλ. μέγιστη τιμή, ελάχιστη τιμή, κλίση Hill, $logIC_{50}$) για το οιστρογόνο αναφοράς και τις ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες, και για το log_{10}RBA των ασθενώς δεσμευόμενων ουσιών σε σχέση με το οιστρογόνο αναφοράς, τα οποία παρέχονται ως κριτήρια επιδόσεων για τους θετικούς μάρτυρες. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι αναμενόμενες κλίμακες τιμών για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια επιδόσεων. Στην πράξη, η κλίμακα τιμών της IC_{50} μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς με βάση την Kd του σκευάσματος υποδοχέα και τη συγκέντρωση προσδέματος.

51. Δεν αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες λόγω του ευρέος φάσματος των δυνητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών που υπάρχουν και του φάσματος των δυνητικών συγγενειών και εκβάσεων (π.χ. πλήρης καμπύλη, μερική καμπύλη, καμία προσαρμογή καμπύλης). Ωστόσο, η εξέταση των αποτελεσμάτων από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση την επαγγελματική κρίση. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκές εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να προσδιορίζεται με σαφήνεια η μέγιστη τιμή (π.χ. 90 - 100 % δέσμευσης) της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Η μεταβλητότητα μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθώς και μεταξύ των 3 μη παράλληλων σειρών δοκιμών θα πρέπει να είναι εντός εύλογων ορίων και να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Οι μάρτυρες από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προσεγγίζουν τα μέτρα επιδόσεων που αναφέρονται για τη συγκεκριμένη δοκιμασία FW και πρέπει να είναι σύμφωνοι με τα ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες από κάθε αντίστοιχο εργαστήριο.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

52. Μετράται τόσο η συνολική όσο και η μη ειδική δέσμευση. Από τις εν λόγω τιμές, υπολογίζεται η ειδική δέσμευση αυξανόμενων συγκεντρώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπό συνθήκες ισορροπίας, αφαιρώντας τη μη ειδική δέσμευση από τη συνολική δέσμευση. Ένα διάγραμμα της ειδικής δέσμευσης έναντι της συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης αναμένεται ότι θα φθάνει σε πλατώ όσον αφορά τη μέγιστη ειδική δέσμευση, το οποίο υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων θα πρέπει να τεκμηριώνει τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε μία μοναδική θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας. Η μη ειδική, η συνολική και η ειδική δέσμευση θα πρέπει να παρουσιάζονται σε καμπύλη δέσμευσης κορεσμού. Στο πλαίσιο περαιτέρω ανάλυσης των εν λόγω δεδομένων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης (π.χ. BioSoft, McPherson 1985, Motulsky 1995), με τελική παρουσίαση των δεδομένων υπό μορφή ανάλυσης Scatchard.

53. Η ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να προσδιορίζει τις Bmax και Kd αποκλειστικά από τα δεδομένα συνολικής δέσμευσης, βάσει της παραδοχής ότι η μη ειδική δέσμευση είναι γραμμική, εκτός εάν αιτιολογείται η χρήση διαφορετικής μεθόδου. Επιπλέον, κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Θα πρέπει να αναφέρεται η επιλεγμένη μέθοδος για την εύρωστη παλινδρόμηση. Κατά τον προσδιορισμό των Bmax και Kd από δεδομένα δέσμευσης κορεσμού, θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος (π.χ. με χρήση της μεθόδου Swillens 1995).

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

54. Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης χαράσσεται ως ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης έναντι της συγκέντρωσης (μονάδες log10) του ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει το 50 % της μέγιστης ειδικής δέσμευσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης είναι η τιμή IC_{50}.

55. Οι εκτιμήσεις των τιμών λογάριθμου (IC_{50}) για τους θετικούς μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς και ασθενώς δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων (π.χ. BioSoft, McPherson 1985, Motulsky 1995). Κατά την προσαρμογή των εν λόγω καμπυλών, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή, η κλίση και ο λογάριθμος (IC_{50}) θα πρέπει, γενικά, να μην περιορίζονται. Κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος. Μετά την αρχική ανάλυση, κάθε καμπύλη δέσμευσης θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη προσαρμογή στο μοντέλο. Η σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να υπολογίζεται ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για τη 17β-οιστραδιόλη. Τα αποτελέσματα από τους θετικούς μάρτυρες και τον μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση των μέτρων των επιδόσεων δοκιμασίας των παραγράφων 45-50 του παρόντος προσαρτήματος 2.

56. Τα δεδομένα για το σύνολο των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να αναλύονται με χρήση κλιμακωτής προσέγγισης ώστε να διασφαλίζεται η δέουσα ανάλυσή τους και η σωστή ταξινόμηση κάθε καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συνιστάται κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία να υποβάλλεται αρχικά σε τυποποιημένη ανάλυση δεδομένων πανομοιότυπη με την ανάλυση που χρησιμοποιείται για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (βλ. παράγραφο 55 ανωτέρω). Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να γίνεται τεχνική επανεξέταση των παραμέτρων προσαρμογής της καμπύλης και να εξετάζεται οπτικά η ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης για κάθε σειρά δοκιμών. Εάν, κατά την τεχνική επανεξέταση, παρατηρηθεί εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση του ποσοστού της ειδικά δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των τεχνικών πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση χημικής ουσίας, και συμφωνία των παραμέτρων προσαρμογής μεταξύ των τριών σειρών δοκιμών, αυτό αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ότι η δοκιμασία και οι αναλύσεις δεδομένων διεξήχθησαν ορθά.

Ερμηνεία των δεδομένων

57. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται δεσμευόμενη στον hrERα εάν είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 50 % (σχήμα 1).

58. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται μη δεσμευόμενη στον hrERα εάν:

— είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %, ή

— δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο μη εξομαλυμένο μέσο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.

59. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θεωρούνται αμφίβολες εάν δεν πληρούται καμία από τις ανωτέρω προϋποθέσεις (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 και 51 %).

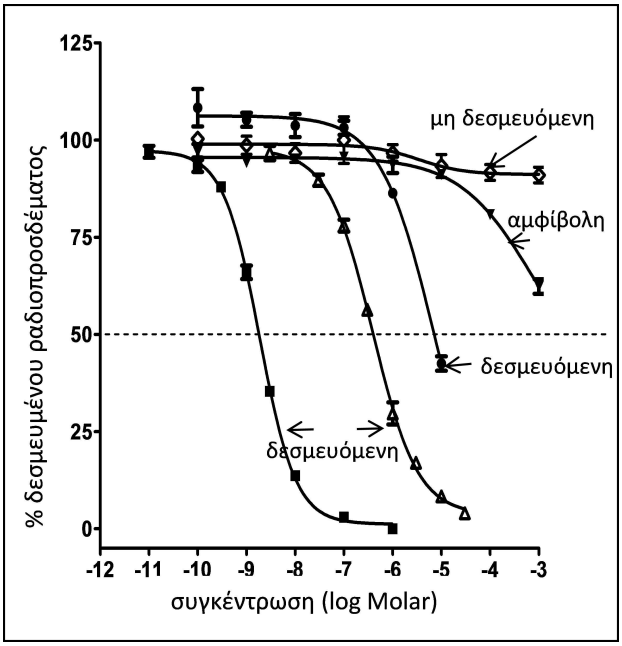
Πίνακας 7

Κριτήρια ταξινόμησης βάσει της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης για υπό δοκιμή χημική ουσία

Ταξινόμηση	Κριτήρια
Δεσμευόμενη[α]	Είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης. Το **χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 500%.**
Μη δεσμευόμενη[β]	Εάν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %.** Εάν δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο μη εξομαλυμένο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.**
Αμφίβολη[γ]	Οποιαδήποτε ελέγξιμη σειρά δοκιμών η οποία δεν αντιστοιχεί ούτε σε δεσμευόμενη ούτε σε μη δεσμευόμενη ουσία (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 και 51 %).

Σχήμα 1

Παραδείγματα ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης



60. Πολλές σειρές δοκιμών που διεξάγονται σε ένα εργαστήριο για υπό δοκιμή χημική ουσία συνδυάζονται διά της απόδοσης αριθμητικών τιμών σε κάθε σειρά δοκιμών και διά της εξαγωγής του μέσου όρου των σειρών δοκιμών, όπως φαίνεται στον πίνακα 8. Τα αποτελέσματα των συνδυασμένων σειρών δοκιμών σε κάθε εργαστήριο συγκρίνονται με την αναμενόμενη ταξινόμηση για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πίνακας 8

Μέθοδος ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση πολλών σειρών δοκιμών σε ένα εργαστήριο

Για την απόδοση τιμής σε κάθε σειρά δοκιμών:	
Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	2
Αμφίβολη	1
Μη δεσμευόμενη	0
Για την ταξινόμηση του μέσου όρου αριθμητικών τιμών στις σειρές δοκιμών:	
Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	Μέσος όρος ≥ 1,5
Αμφίβολη	0,5 ≤ Μέσος όρος < 1,5
Μη δεσμευόμενη	Μέσος όρος < 0,5

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

61. Βλ. παράγραφο 24 της ενότητας «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**» της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2.1

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΡΩΝ

[^{3}H]E2: 17β-οιστραδιόλη ραδιοσημασμένη με τρίτιο

DCC: επιχρισμένος με δεξτράνη ενεργός άνθρακας

E2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη (αδρανής)

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας: 10 mM Tris, 10 mg αλβουμίνης βόειου ορού /ml, 2 mM DTT, 10 % γλυκερόλης, 0,2 mM λευπεπτίνης, pH 7,5

hrERα: (human recombinant estrogen receptor alpha) ανασυνδασμένος ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α

Πανομοιότυπο δείγμα: μία από πολλές κοιλότητες με το ίδιο περιεχόμενο στις ίδιες συγκεντρώσεις, οι οποίες υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή στο πλαίσιο μεμονωμένης σειράς δοκιμών. Στο παρόν πρωτόκολλο, κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υποβάλλεται σε δοκιμή εις τριπλούν· δηλαδή υπάρχουν τρία πανομοιότυπα δείγματα που υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σειρά δοκιμών: πλήρης σειρά ταυτόχρονα εξεταζόμενων κοιλοτήτων δοκιμασίας τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, που παρέχει όλες τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον χαρακτηρισμό της δέσμευσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον hrERα (δηλαδή συνολική [^{3}H]17β-οιστραδιόλη που προστίθεται στην κοιλότητα δοκιμασίας, μέγιστη δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στον hrERα, μη ειδική δέσμευση, και συνολική δέσμευση σε διάφορες συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικής ουσίας). Μια σειρά δοκιμών μπορεί να περιλαμβάνει ακόμη και μία μόνο κοιλότητα δοκιμασίας (πανομοιότυπο δείγμα) ανά συγκέντρωση αλλά, δεδομένου ότι στο παρόν πρωτόκολλο απαιτείται η διεξαγωγή της δοκιμασίας εις τριπλούν, μία σειρά δοκιμών περιλαμβάνει τρεις κοιλότητες δοκιμασίας ανά συγκέντρωση. Επιπλέον, στο παρόν πρωτόκολλο απαιτούνται τρεις ανεξάρτητες (δηλ. μη παράλληλες) σειρές δοκιμών ανά χημική ουσία.

Προσάρτημα 2.2

ΤΥΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΟΡΕΣΜΟΥ [^{3}H]17Β-ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΜΕ ΤΡΕΙΣ ΠΑΝΟΜΟΙΟΤΥΠΕΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΕΣ

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
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

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
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

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Ραδιοσημασμένο	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Ραδιοσημασμένο	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Ραδιοσημασμένο	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Ραδιοσημασμένο	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Ραδιοσημασμένο	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Ραδιοσημασμένο	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Ραδιοσημασμένο	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Ραδιοσημασμένο	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Ραδιοσημασμένο	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Ραδιοσημασμένο	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Ραδιοσημασμένο	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Ραδιοσημασμένο	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Ραδιοσημασμένο	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Ραδιοσημασμένο	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Ραδιοσημασμένο	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Ραδιοσημασμένο	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Τυπική δοκιμασία κορεσμού [3H]-17β-οιστραδιόλης με τρεις πανομοιότυπες κοιλότητες

Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Κωδικός τύπου κοιλότητας	Αρχική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Όγκος ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση ραδιοσημασμένης E2 (nM)	Αρχική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος μη ραδιοσημασμένης E2 (μl)	Τελική συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένης E2 (μM)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος υποδοχέα (μl)	Συνολικός όγκος στις κοιλότητες
H5	2	Ραδιοσημασμένο	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Ραδιοσημασμένο	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Ραδιοσημασμένο	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Ραδιοσημασμένο	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Ραδιοσημασμένο	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Ραδιοσημασμένο	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Ραδιοσημασμένο	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Ραδιοσημασμένο	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Επισημαίνεται ότι οι «ραδιοσημασμένες» κοιλότητες είναι κενές κατά την επώαση. Τα 40 μl προστίθενται μόνο για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

Προσάρτημα 2.3

ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποδεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος χρηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	A1	1	συνολική δέσμευση	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	μη ραδιοση-μασμένο E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	μη ραδιοση-μασμένη E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αφαίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	B10	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	τυφλό	τυφλό	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	τυφλό	τυφλό	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	τυφλό	τυφλό	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	D7	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	E11	2	νορεθυνοδρέ-λη	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	νορεθυνοδρέ-λη	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
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

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αφαίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
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	ραδιοσημα-σμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	ραδιοσημα-σμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	ραδιοσημα-σμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	ραδιοσημα-σμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	ραδιοσημα-σμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	ραδιοσημα-σμένο	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Επισημαίνεται ότι οι «ραδιοσημασμένες» κοιλότητες είναι κενές κατά την επώαση. Τα 40 μl προστίθενται μόνο για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης												
Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	A1	1	συνολική δέσμευση	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	μη σημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης												
Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	C1	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Υπό δοκιμή ουσία 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης												
Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (μL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μL)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	E1	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Υπό δοκιμή ουσία 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Διάταξη κοιλοτήτων δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (µL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µL)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	G1	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Υπό δοκιμή ουσία 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	νορεθυνοδρέλη	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	νορεθυνοδρέλη	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	νορεθυνοδρέλη	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	νορεθυνοδρέλη	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	νορεθυνοδρέλη	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	νορεθυνοδρέλη	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	μη ραδιοσημασμένη E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	μη ραδιοσημασμένη E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	μη ραδιοσημασμένη E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	μη ραδιοσημασμένη E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	μη ραδιοσημασμένη E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	μη ραδιοσημασμένη E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Προσάρτημα 3

IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΜΑΤΟΣ ERA, ΤΟΥ CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) (ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

1. Η παρούσα *in vitro* δοκιμασία κορεσμού υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) και ανταγωνιστικής δέσμευσης χρησιμοποιεί μια περιοχή δέσμευσης προσδέματος (ligand binding domain, LBD) του ανθρώπινου ERα (hrERα). Αυτό το πρωτεϊνικό κατασκεύασμα παρήχθη από το ιαπωνικό Ινστιτούτο Αξιολόγησης και Έρευνας Χημικών Ουσιών (CERI) ως πρωτεΐνη σύντηξης με S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και εκφράζεται στην *E. coli*. Το πρωτόκολλο CERI αποτέλεσε αντικείμενο διεθνούς μελέτης επικύρωσης πολλών εργαστηρίων (2), η οποία κατέδειξε την καταλληλότητα και την αξιοπιστία του για τον επιδιωκόμενο σκοπό της δοκιμασίας.

2. Η παρούσα δοκιμασία αποτελεί διαδικασία διαλογής για τον προσδιορισμό ουσιών που μπορούν να δεσμεύονται στον hrERα. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ικανότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας να ανταγωνίζεται τη 17β-οιστραδιόλη ως προς τη δέσμευση στην hrERα-LBD. Τα ποσοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας είναι η IC_{50} (μέτρο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που απαιτείται για να εκτοπιστεί το ήμισυ της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα) και οι σχετικές συγγένειες δέσμευσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τον hrERα σε σύγκριση με τη 17β-οιστραδιόλη. Για λόγους διαλογής των χημικών ουσιών, στα αποδεκτά ποιοτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας περιλαμβάνεται η ταξινόμηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ως δεσμευόμενων, μη δεσμευόμενων ή αμφίβολης δέσμευσης στον hrERα, με βάση τα κριτήρια που περιγράφονται για τις καμπύλες δέσμευσης.

3. Στη δοκιμασία χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο πρόσδεμα για τον οποίο το εργαστήριο απαιτείται να διαθέτει άδεια ραδιενεργών υλικών. Για κάθε διαδικασία στο πλαίσιο της οποίας γίνεται χρήση ραδιοϊσοτόπων και επικίνδυνων χημικών ουσιών θα πρέπει να τηρούνται οι κανονισμοί και οι διαδικασίες που ορίζει η εθνική νομοθεσία.

4. Πριν από τη χρήση της παρούσας δοκιμασίας για κανονιστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μελετηθούν οι ενότητες «**ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**» και «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**». Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ΒΛ. ΕΠΙΣΗΣ ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ)

5. Η δοκιμασία δέσμευσης hrERα μετρά την ικανότητα ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ([^{3}H]17β-οιστραδιόλη) να δεσμεύεται στον ER παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανταγωνιστή). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τον ER ανταγωνίζονται με το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες με χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα.

6. Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από δύο βασικά στοιχεία: ένα πείραμα δέσμευσης κορεσμού για τον χαρακτηρισμό των παραμέτρων αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος, ακολουθούμενο από ένα πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης που χαρακτηρίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και ενός ραδιοσημασμένου προσδέματος ως προς τη δέσμευση στον ER.

7. Σκοπός του πειράματος δέσμευσης κορεσμού είναι ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένης παρτίδας υποδοχέων ως προς τη συγγένεια δέσμευσης και τον αριθμό εν είδει προετοιμασίας για τη διεξαγωγή του πειράματος ανταγωνιστικής δέσμευσης. Το πείραμα δέσμευσης κορεσμού μετρά, υπό συνθήκες ισορροπίας, τη συγγένεια καθορισμένης συγκέντρωσης του υποδοχέα οιστρογόνων σε σχέση με το φυσικό πρόσδεμά του (η οποία αντιπροσωπεύεται από τη σταθερά διάστασης Kd), και τη συγκέντρωση των ενεργών θέσεων του υποδοχέα (Bmax).

8. Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη συγγένεια δέσμευσης μιας ουσίας στον ER, ως ανταγωνίστρια της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Η συγγένεια προσδιορίζεται ποσοτικά βάσει της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας η οποία, σε συνθήκες ισορροπίας, αναστέλλει το 50 % της ειδικής δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης (και η οποία καλείται «ανασταλτική συγκέντρωση 50 %» ή IC_{50}). Η συγγένεια μπορεί επίσης να εκτιμηθεί με χρήση της σχετικής συγγένειας δέσμευσης (RBA, σε σχέση με την IC_{50} της οιστραδιόλης που μετράται χωριστά στην ίδια σειρά δοκιμών). Το πείραμα ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε καθορισμένη συγκέντρωση παρουσία ευρέος φάσματος (οκτώ τάξεων μεγέθους) συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, τα δεδομένα προσαρμόζονται σε μια μορφή της εξίσωσης Hill (Hill, 1910) βάσει της οποίας περιγράφεται η εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος από ανταγωνιστική δεσμευόμενη ουσία μίας θέσης. Ο βαθμός εκτόπισης της ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε ισορροπία χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως δεσμευόμενης, μη δεσμευόμενης ή αμφίβολης απόκρισης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επίδειξη των αποδεκτών επιδόσεων πρωτεΐνης hrERα

9. Πριν από την ένταξη των δοκιμασιών δέσμευσης κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης στην καθημερινή πρακτική, θα πρέπει να καταδεικνύονται οι ορθές επιδόσεις κάθε νέας παρτίδας hrERα στο εργαστήριο στο οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Για την επίδειξη των επιδόσεων θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαδικασία δύο σταδίων. Τα στάδια αυτής είναι τα ακόλουθα:

— Διεξαγωγή δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με σκοπό να καταδειχθεί η ειδικότητα και ο κορεσμός του hrERα. Η μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των δεδομένων αυτών (π.χ. BioSoft, McPherson 1985, Motulsky 1995) και η επακόλουθη ανάλυση Scatchard θα πρέπει να τεκμηριώνουν τη συγγένεια δέσμευσης της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης με τον hrERα (Kd) και τον αριθμό των υποδοχέων (Bmax) για κάθε παρτίδα hrERα.

— Διεξαγωγή δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση των ουσιών μαρτύρων [οιστρογόνο αναφοράς (17β-οιστραδιόλη), μια ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (π.χ. νορεθυνοδρέλη ή νορεθινδρόνη) και μια μη δεσμευόμενη ουσία (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο, OTES)]. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να δημιουργεί βάση ιστορικών δεδομένων για να τεκμηριώνει τη συνέπεια της τιμής IC50 και των σχετικών τιμών για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στα διάφορα πειράματα και τις διάφορες παρτίδες hrERα. Επιπλέον, οι παράμετροι των καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης για τις ουσίες μάρτυρες θα πρέπει να περιλαμβάνονται εντός των ορίων του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % (βλ. πίνακα 1) που αναπτύχθηκαν με χρήση δεδομένων των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης για την παρούσα δοκιμασία (2).

Πίνακας 1

Κριτήρια επιδόσεων που αναπτύχθηκαν για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία της δοκιμασίας δέσμευσης hrER CERI

Ουσία	Παράμετρος	Μέσος όρος (α)	Τυπική απόκλιση (n)	Διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % (β)	
				Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
17β-Οιστραδιόλη	Μέγιστη απόκριση	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Ελάχιστη απόκριση	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Κλίση Hill	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Νορεθυνοδρέλη	Μέγιστη απόκριση	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Ελάχιστη απόκριση	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Κλίση Hill	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Νορεθινδρόνη (γ)	Μέγιστη απόκριση	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Ελάχιστη απόκριση	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Κλίση Hill	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

(α) Η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) με μέγεθος δείγματος (n) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων για την προσαρμογή της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε τέσσερα εργαστήρια στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παράρτημα Ν της παραπομπής 2).

(β) Η εμπιστοσύνη επιπέδου 95 % παρέχεται ως οδηγός για τα κριτήρια αποδοχής.

(γ) Η υποβολή της νορεθινδρόνης σε δοκιμές ήταν προαιρετική για το υποέργο 4 στη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης (βλ. παραπομπή 2, υποέργο 4). Ως εκ τούτου, η μέση τιμή ± SD (n) υπολογίστηκαν με χρήση εκτιμήσεων της προσαρμογής της καμπύλης (εξίσωση Hill 4 παραμέτρων) για τις σειρές δοκιμών μαρτύρων που διεξήχθησαν σε δύο εργαστήρια.
Η κλίμακα τιμών της IC_{50} θα εξαρτάται από την Kd του σκευάσματος υποδοχέα και τη συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου προσδέματος που χρησιμοποιούνται σε κάθε εργαστήριο. Η κατάλληλη προσαρμογή της κλίμακας τιμών IC_{50} με βάση τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας είναι αποδεκτή.

Απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου

10. Βλ. παραγράφους 17 και 18, και πίνακα 2 στην ενότητα «**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER**» της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Κάθε δοκιμασία (κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης) θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (με πρόσφατα παρασκευασμένες αραιώσεις του υποδοχέα, των χημικών ουσιών και των αντιδραστηρίων) σε διαφορετικές ημέρες, και κάθε σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνει τρία πανομοιότυπα δείγματα.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποδοχέα (hrERα)

11. Η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα διαφέρει ελαφρώς ανά παρτίδα και ανάλογα με τις συνθήκες φύλαξης. Για αυτόν τον λόγο, θα πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά την παραλαβή του από τον προμηθευτή. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα υπολογιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του ενεργού υποδοχέα κατά τη χρονική στιγμή της σειράς δοκιμών.

12. Υπό συνθήκες κατάλληλες για την ανταγωνιστική δέσμευση (δηλαδή 0,5 nM [^{3}H]-οιστραδιόλης), θα πρέπει να επωάζονται ονομαστικές συγκεντρώσεις υποδοχέα 0,1, 0,2, 0,4 και 0,6 nM απουσία (συνολική δέσμευση) και παρουσία (μη ειδική δέσμευση) 1 μM μη ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης. Η ειδική δέσμευση, υπολογιζόμενη ως η διαφορά μεταξύ συνολικής και μη ειδικής δέσμευσης, χαράσσεται έναντι της ονομαστικής συγκέντρωσης υποδοχέα. Η συγκέντρωση του υποδοχέα από την οποία προκύπτουν τιμές ειδικής δέσμευσης που αντιστοιχούν στο 40 % της προστεθείσας ραδιοσήμανσης σχετίζεται με την αντίστοιχη συγκέντρωση υποδοχέα, και η εν λόγω συγκέντρωση υποδοχέα θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τα πειράματα κορεσμού και ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συχνά, μια τελική συγκέντρωση hrER ίση με 0,2 nM θα συμμορφώνεται με τη συνθήκη αυτή.

13. Σε περίπτωση που αποτυγχάνει επανειλημμένα η ικανοποίηση του κριτηρίου του 40 %, θα πρέπει να ελέγχεται η οργάνωση του πειράματος για πιθανά σφάλματα. Η μη επίτευξη του κριτηρίου του 40 % μπορεί να υποδεικνύει ότι ο αριθμός των ενεργών υποδοχέων στην ανασυνδυασμένη παρτίδα είναι υπερβολικά χαμηλός, οπότε και θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης άλλης παρτίδας υποδοχέων.

Δοκιμασία κορεσμού

14. Θα πρέπει να αξιολογούνται εις τριπλούν οκτώ αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, υπό τις ακόλουθες τρεις συνθήκες (βλ. πίνακα 2):

α) απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και παρουσία ER. Έτσι προσδιορίζεται η συνολική δέσμευση βάσει της ραδιενέργειας στις κοιλότητες που περιέχουν μόνο [^{3}H]17β-οιστραδιόλη.

β) παρουσία κατά 2 000 φορές πολλαπλάσιας υπερβάλλουσας συγκέντρωσης μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε σχέση με τη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και παρουσία ER. Στόχος είναι ο κορεσμός των ενεργών θέσεων δέσμευσης με μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη και ο προσδιορισμός της μη ειδικής δέσμευσης μέσω μέτρησης της ραδιενέργειας στις κοιλότητες. Τυχόν εναπομένουσα ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη που μπορεί να δεσμευτεί στον υποδοχέα θεωρείται ότι δεσμεύεται σε μη ειδική θέση, καθώς η μη ραδιοσημασμένη οιστραδιόλη βρίσκεται σε τόσο υψηλή συγκέντρωση ώστε θα πρέπει να έχει δεσμευτεί σε όλες τις διαθέσιμες ειδικές θέσεις του υποδοχέα.

γ) απουσία μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και απουσία ER (προσδιορισμός της συνολικής ραδιενέργειας).

Παρασκευή διαλυμάτων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης και hrERα

15. Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα 40 nM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από αποθεματικό διάλυμα 1 μM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε DMSO, με προσθήκη DMSO (για την παρασκευή 200 nM) και ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου (για την παρασκευή 40 nM). Χρησιμοποιώντας αυτό το διάλυμα 40 nM παρασκευάζεται η σειρά αραιώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, από 0,313 nM έως 40 nM, με ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου (όπως φαίνεται στη στήλη 12 του πίνακα 2). Οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, από 0,0313 έως 4,0 nM, λαμβάνονται με προσθήκη 10 μl από τα διαλύματα αυτά στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων (βλ. πίνακες 2 και 3). Η παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, ο υπολογισμός του αρχικού αποθεματικού διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης βάσει της ειδικής δραστικότητάς του, η παρασκευή αραιώσεων και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων περιγράφονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο CERI (2).

16. Οι αραιώσεις των διαλυμάτων μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να παρασκευάζονται από αποθεματικό διάλυμα 17β-οιστραδιόλης 1 nM, με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας με σκοπό την επίτευξη οκτώ αυξανόμενων συγκεντρώσεων, που κυμαίνονται αρχικά από 0,625 μM έως 80 μM. Οι τελικές συγκεντρώσεις δοκιμασίας, από 0,0625 έως 8 μM, λαμβάνονται με προσθήκη 10 μl από αυτά τα διαλύματα στις αντίστοιχες κοιλότητες δοκιμασίας τρυβλίου μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων που προορίζονται ειδικά για τη μέτρηση της μη ειδικής δέσμευσης (βλ. πίνακες 2 και 3). Η παρασκευή των αραιώσεων μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο CERI (2).

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η συγκέντρωση υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 40±10 % (βλ. παραγράφους 12-13). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται με παγόψυχρο ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας ακριβώς πριν από τη χρήση, δηλαδή μετά την προετοιμασία όλων των κοιλοτήτων για συνολική δέσμευση, μη ειδική δέσμευση και ραδιοσημασμένο πρόσδεμα μόνο.

18. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων παρασκευάζονται όπως φαίνεται στον πίνακα 2, με 3 πανομοιότυπα δείγματα ανά συγκέντρωση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης. Η κατανομή όγκων της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης, του ρυθμιστικού διαλύματος και του υποδοχέα περιγράφεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 2

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας δέσμευσης κορεσμού

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Για μέτρηση της TB			Για μέτρηση της NSB			Για τον προσδιορισμό του ραδιοσημασμένου προσδέματος μόνο				Αραιώσεις μη ραδιοσημασμένης E2 για τη στήλη τρυβλίου 4-6	Αραιώσεις [^{3}H]E2 για τη στήλη τρυβλίου 1-9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
Γ	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
Δ	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
ΣT	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
Z	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: συνολική δέσμευση
NSB: μη ειδική δέσμευση
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-οιστραδιόλη
E2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη
(*) Οι υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις εδώ είναι οι τελικές συγκεντρώσεις σε κάθε κοιλότητα.
(**) Οι αραιώσεις της μη ραδιοσημασμένης E2 και της [^{3}H]E2 μπορούν να παρασκευαστούν σε διαφορετικό τρυβλίο.

Πίνακας 3

'Όγκοι αντιδραστηρίου για το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης κορεσμού

Αριθμός λωρίδας		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Στάδια παρασκευής		Κοιλότητες TB			Κοιλότητες NSB			Μόνο ραδιοσημασμένο πρόσδεμα		
Όγκος στοιχείων για τις παραπάνω κοιλότητες αντίδρασης και σειρά προσθήκης	Ρυθμιστικό διάλυμα	60 μl			50 μl			90 μl		
	μη ραδιοσημασμένη E2 από τη λωρίδα 11 στον πίνακα 2	-			10 μl			-		
	[^{3}H]E2 από τη λωρίδα 12 στον πίνακα 2	10 μl			10 μl			10 μl		
	hrERα	30 μl			30 μl			-		
Συνολικός όγκος αντίδρασης		100 μl			100 μl			100 μl		
Επώαση		**ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΠΩΑΣΗΣ 2 ΩΡΩΝ**						Ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας αμέσως μετά την παρασκευή Καμία επώαση		
Αγωγή με 0,4 % DCC		Ναι			Ναι			**'Οχι**		
Όγκος 0,4 % DCC		100 μl			100 μl			—		
Διήθηση		Ναι			Ναι			Όχι		
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ DPM										
Όγκος ποσοτικού προσδιορισμού που προστέθηκε στο κοκτέιλ σπινθηρισμού		100 μl (**)			100 μl (**)			50 μl		

(*) Εάν για τη μέτρηση των dpm χρησιμοποιείται LSC για τρυβλία μικροτιτλοδότησης, δεν είναι σκόπιμο να γίνεται η παρασκευή ραδιοσημασμένου προσδέματος μόνο στο ίδιο τρυβλίο δοκιμασίας με τις κοιλότητες TB και NSB. Το ραδιοσημασμένο πρόσδεμα μόνο θα πρέπει να παρασκευάζεται σε διαφορετικό τρυβλίο.

(**) Εάν για τον διαχωρισμό του DCC χρησιμοποιείται φυγοκέντρηση, τα 50 μl υπερκείμενου υγρού θα πρέπει να μετρώνται με LSC προκειμένου να αποφεύγεται η μόλυνση του DCC.

19. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας για τον προσδιορισμό της συνολικής δέσμευσης και της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (22°C έως 28°C) επί δύο ώρες.

Μέτρηση της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης

20. Μετά την περίοδο επώασης διάρκειας δύο ωρών, η δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη θα πρέπει να διαχωρίζεται από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη διά της προσθήκης 100 μl παγόψυχρου εναιωρήματος DCC 0,4 %. Στη συνέχεια, τα τρυβλία θα πρέπει να τοποθετούνται στον πάγο επί 10 λεπτά και το μείγμα αντίδρασης και το εναιώρημα DCC θα πρέπει να διηθούνται, μέσω μεταφοράς σε φίλτρο τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, για την αφαίρεση του DCC. Στη συνέχεια, 100 μl του διηθήματος θα πρέπει να προστίθενται στο υγρό σπινθηρισμού σε φιαλίδια LSC για τον προσδιορισμό των διασπάσεων ανά λεπτό (dpm) ανά φιαλίδιο.

21. Εναλλακτικά, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο φίλτρο τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, η αφαίρεση του DCC μπορεί να γίνει μέσω φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, 50 μl υπερκείμενου υγρού που περιέχει τη δεσμευμένη στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλη λαμβάνονται με εξαιρετική προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των κοιλοτήτων από την επαφή με τον DCC, και χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

22. Η συνθήκη «ραδιοσημασμένο πρόσδεμα μόνο» χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των διασπάσεων ανά λεπτό (dpm) της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης που προστίθεται στις κοιλότητες δοκιμασίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας θα πρέπει να πραγματοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή. Οι εν λόγω κοιλότητες δεν θα πρέπει να επωάζονται ούτε να υποβάλλονται σε αγωγή με το εναιώρημα DCC, αλλά το περιεχόμενό τους θα πρέπει να χορηγείται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού. Οι μετρήσεις αυτές δείχνουν την ποσότητα της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, σε dpm, που προστέθηκε σε κάθε σύνολο κοιλοτήτων για τη συνολική δέσμευση και τη μη ειδική δέσμευση.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

23. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης μετρά τη δέσμευση μιας μεμονωμένης συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για κάθε συγκέντρωση σε μία σειρά δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία παράλληλα πανομοιότυπα δείγματα. Επιπλέον, για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εκτελούνται τρεις μη παράλληλες σειρές δοκιμών. Η δοκιμασία θα πρέπει να οργανώνεται σε ένα ή περισσότερα τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων.

Μάρτυρες

24. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας, σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνεται παράλληλος διαλύτης και μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία και μη δεσμευόμενη ουσία). Σε ένα τρυβλίο στη διάρκεια κάθε σειράς δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (ασθενώς δεσμευόμενη και μη δεσμευόμενη ουσία). Όλα τα υπόλοιπα τρυβλία θα πρέπει να περιέχουν i) υψηλή (μέγιστη εκτόπιση, δηλαδή σχεδόν πλήρη εκτόπιση του ραδιοσημασμένου προσδέματος) και μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, ii) μάρτυρα με διαλύτη και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων εις τριπλούν. Οι διαδικασίες για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και των διαλυμάτων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, hrERα και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών περιγράφονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο CERI (2).

Μάρτυρας με διαλύτη:

25. Ο μάρτυρας με διαλύτη δείχνει ότι ο διαλύτης δεν αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής και, επίσης, μετρά τη συνολική δέσμευση (TB). Ο προτιμώμενος διαλύτης είναι το DMSO. Εναλλακτικά, εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή στο DMSO, μπορεί να χρησιμοποιείται αιθανόλη. Η συγκέντρωση του DMSO στις τελικές κοιλότητες δοκιμασίας θα πρέπει να είναι 2,05 % και μπορεί να αυξηθεί μέχρι και σε 2,5 % εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις DMSO άνω του 2,5 %, λόγω του ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις διαλύτη παρεμποδίζουν τη δοκιμασία. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε DMSO, αλλά είναι διαλυτές σε αιθανόλη, μπορεί να χρησιμοποιείται στη δοκιμασία 2 % αιθανόλης κατά μέγιστο χωρίς να υπάρχει παρεμπόδιση.

Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα:

26. Ο μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα (BC) δεν θα πρέπει να περιέχει ούτε διαλύτη ούτε υπό δοκιμή χημική ουσία, αλλά όλα τα υπόλοιπα στοιχεία της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας.

Ισχυρώς δεσμευόμενη ουσία (οιστρογόνο αναφοράς)

27. Η 17β-οιστραδιόλη (CAS 50-28-2) είναι το ενδογενές πρόσδεμα και δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στον ER υποτύπου α. Θα πρέπει να καταρτίζεται πρότυπη καμπύλη με χρήση 17β-οιστραδιόλης για κάθε δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrERα, προκειμένου να είναι δυνατή η αξιολόγηση της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας στο ίδιο εργαστήριο. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης σε DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας, με τις τελικές συγκεντρώσεις στις κοιλότητες δοκιμασίας προς χρήση για την πρότυπη καμπύλη, στα εξής διαστήματα: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Η υψηλότερη συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης (1 μM) θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης. Παρότι αποτελεί επίσης μέρος της πρότυπης καμπύλης, η συγκεκριμένη συγκέντρωση διακρίνεται από την ένδειξη «NSB» στον πίνακα 4.

Ασθενώς δεσμευόμενη ουσία

28. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται μια ασθενώς δεσμευόμενη ουσία [νορεθυνοδρέλη (CAS68-23-5) ή, εναλλακτικά, νορεθινδρόνη (CAS 68-22-4)] προκειμένου να καταδεικνύεται η ευαισθησία κάθε πειράματος και να παρέχεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας με την πάροδο του χρόνου στο πλαίσιο διεξαγωγής της δοκιμασίας. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας σε DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας, με τις τελικές συγκεντρώσεις στις κοιλότητες δοκιμασίας ως ακολούθως: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} και 10^{-9} M.

Μη δεσμευόμενη ουσία

29. Ως αρνητικός μάρτυρας (μη δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να χρησιμοποιείται το οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο (OTES, CAS 2943-75-1). Έτσι εξασφαλίζεται ότι η δοκιμασία, όπως εκτελείται, μπορεί να ανιχνεύσει τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν δεσμεύονται στον hrERα. Θα πρέπει να παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα της μη δεσμευόμενης ουσίας σε DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας, με τις τελικές συγκεντρώσεις στις κοιλότητες δοκιμασίας ως ακολούθως: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Ως εναλλακτική μη δεσμευόμενη ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί το φθαλικό δι-n-βουτύλιο (DBP, CAS 84-72-2), αλλά μόνο σε συγκεντρώσεις έως 10^{-4} M. Η μέγιστη διαλυτότητα του DBP στη δοκιμασία έχει καταδειχθεί ότι είναι 10^{-4} M.

Συγκέντρωση hrERα

30. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ποσότητα υποδοχέα από την οποία προκύπτει ειδική δέσμευση 40±10 % (βλ. παραγράφους 12-13 του προσαρτήματος 3). Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να παρασκευάζεται μέσω αραίωσης του λειτουργικού hrERα σε παγόψυχρο ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας ακριβώς πριν τη χρήση.

[^{3}H]17β-οιστραδιόλη

31. Η τελική συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στις κοιλότητες δοκιμασίας θα πρέπει να είναι 0,5 nM.

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

32. Καταρχάς, είναι απαραίτητο να διεξάγεται δοκιμή διαλυτότητας για τον προσδιορισμό του ορίου διαλυτότητας για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον προσδιορισμό του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων προς χρήση κατά τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου δοκιμής. Το όριο διαλυτότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να προσδιορίζεται αρχικά στον διαλύτη και, στη συνέχεια, να επιβεβαιώνεται περαιτέρω υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Η υπό δοκιμή τελική συγκέντρωση στη δοκιμασία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 mM. Οι δοκιμές προσδιορισμού εύρους περιλαμβάνουν μάρτυρα με διαλύτη και τουλάχιστον 8 λογαριθμικές, διαδοχικές αραιώσεις, που ξεκινούν από τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (π.χ. 1 mM ή χαμηλότερη, με βάση το όριο διαλυτότητας), και καταγραφή της παρουσίας θολερότητας ή ιζήματος (βλ. επίσης παράγραφο 35 του προσαρτήματος 3). Αφού προσδιοριστεί το εύρος συγκεντρώσεων για τις δοκιμές, θα πρέπει να ελέγχεται υπό δοκιμή χημική ουσία με χρήση 8 λογαριθμικών συγκεντρώσεων διατεταγμένων σε κατάλληλα διαστήματα, όπως έχουν καθοριστεί στην προηγούμενη δοκιμή προσδιορισμού εύρους. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται στο δεύτερο και το τρίτο πείραμα θα πρέπει να προσαρμόζονται περαιτέρω κατά περίπτωση, με σκοπό τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, εφόσον απαιτείται.

33. Οι αραιώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρασκευάζονται στον κατάλληλο διαλύτη (βλ. παράγραφο 25 του προσαρτήματος 3). Εάν η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν είναι διαλυτή ούτε σε DMSO ούτε σε αιθανόλη, και η προσθήκη περισσότερου διαλύτη θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύτη στον τελικό σωλήνα πάνω από το αποδεκτό όριο, επιτρέπεται η μείωση της υψηλότερης συγκέντρωσης έως την επόμενη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να προστεθεί μία επιπλέον συγκέντρωση στο χαμηλό άκρο της σειράς συγκεντρώσεων. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της σειράς θα πρέπει να παραμείνουν αμετάβλητες.

34. Τα διαλύματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά όταν προστίθενται στην κοιλότητα δοκιμασίας, καθότι η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να σχηματίσει ίζημα κατά την προσθήκη της στην κοιλότητα δοκιμασίας. Τα δεδομένα για όλες τις κοιλότητες που περιέχουν ίζημα θα πρέπει να αποκλείονται από την προσαρμογή της καμπύλης, και θα πρέπει να καταγράφεται ο λόγος του αποκλεισμού τους.

35. Εάν υπάρχουν ήδη διαθέσιμες πληροφορίες από άλλες πηγές που παρέχουν τον λογάριθμο (IC_{50}) μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ίσως είναι σκόπιμο τα διαστήματα των αραιώσεων να διαμορφωθούν με γεωμετρικό τρόπο πιο κοντά γύρω από τον αναμενόμενο λογάριθμο (IC_{50}) (δηλ. 0,5 λογαριθμικές μονάδες). Τα τελικά αποτελέσματα θα πρέπει να εμφανίζουν επαρκή διασπορά συγκεντρώσεων εκατέρωθεν του λογάριθμου (IC_{50}), περιλαμβανομένης της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής, κατά τρόπον ώστε να είναι εφικτός ο επαρκής χαρακτηρισμός της καμπύλης δέσμευσης.

Οργάνωση τρυβλίων δοκιμασίας

36. Θα πρέπει να προετοιμάζονται επισημασμένα τρυβλία μικροτιτλοδότησης για εξαπλές επωάσεις, για τον μάρτυρα με διαλύτη, την υψηλότερη συγκέντρωση του οιστρογόνου αναφοράς (E2) που χρησιμεύει επίσης ως δείκτης μη ειδικής δέσμευσης (NSB), και τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα, και για τριπλές επωάσεις για καθεμία από τις οκτώ συγκεντρώσεις του μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας (οκτυλοτριαιθοξυσιλάνιο), τις επτά χαμηλότερες συγκεντρώσεις για το οιστρογόνο αναφοράς (E2), τις οκτώ συγκεντρώσεις της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας (νορεθυνοδρέλη ή νορεθινδρόνη), και τις οκτώ συγκεντρώσεις κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας (TC). Ένα παράδειγμα διαγράμματος διάταξης τρυβλίων για τις πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης που αφορούν το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες παρέχεται στον πίνακα 4 παρακάτω. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται πρόσθετα τρυβλία μικροτιτλοδότησης, τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνουν μάρτυρες τρυβλίων [δηλαδή i) μια υψηλή (μέγιστη εκτόπιση) και μία μέτρια (περίπου ίση με την IC_{50}) συγκέντρωση E2 και ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, εις τριπλούν, ii) μάρτυρα με διαλύτη (ως συνολική δέσμευση) και μη ειδική δέσμευση, καθένα εκ των οποίων σε έξι επαναλήψεις (πίνακας 5). Παράδειγμα φύλλου εργασίας διάταξης τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης με χρήση τριών άγνωστων υπό δοκιμή χημικών ουσιών παρέχεται στο προσάρτημα 3.3. Οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στο φύλλο εργασίας καθώς και στους πίνακες 4 και 5 αφορούν τις τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε κάθε κοιλότητα δοκιμασίας. Η μέγιστη συγκέντρωση για την E2 θα πρέπει να είναι 1×10^{-7} M, ενώ όσον αφορά την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία στο τρυβλίο 1. Η συγκέντρωση IC_{50} θα πρέπει να καθορίζεται από το εργαστήριο βάσει της βάσης ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες. Η τιμή αναμένεται να είναι παρεμφερής με την τιμή που παρατηρήθηκε στις μελέτες επικύρωσης (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 4

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης [1] [2]**, πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τους μάρτυρες (τρυβλίο 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα και θετικός μάρτυρας (E2)			Ασθενώς θετική (Νορεθυνοδρέλη)			Αρνητικός μάρτυρας (OTES)			TB και NSB		
A	Τυφλό (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (μάρτυρας με διαλύτη) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
Γ	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
Δ	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			Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα		
ΣΤ	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
Z	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Τυφλό (για ραδιοσήμανση) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Παράδειγμα διάταξης για το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης προτύπων που πρέπει να χρησιμοποιείται με κάθε πείραμα.
(2) Επισημαίνεται ότι αυτό το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης διαμορφώνεται με χρήση των αραιώσεων που δημιουργούνται στο τρυβλίο αραίωσης που περιγράφεται για τα πρότυπα στις προηγούμενες ενότητες.
Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)
(*) πραγματικό τυφλό, μη χρησιμοποιούμενη κοιλότητα
(**) τυφλό, δεν χρησιμοποιείται κατά την επώαση, αλλά χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της συνολικής προστιθέμενης ραδιενέργειας.

Πίνακας 5

Διάταξη τρυβλίου μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης, πρόσθετα τρυβλία για υπό δοκιμή χημικές (TC) και μάρτυρες τρυβλίου

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Υπό δοκιμή χημική ουσία 1 (TC-1)			Υπό δοκιμή χημική ουσία 2 (TC-2)			Υπό δοκιμή χημική ουσία 3 (TC-3)			Μάρτυρες		
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})		
Γ	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$M)		
Δ	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)		
ΣΤ	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
Z	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (μάρτυρας με διαλύτη)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Στο παράδειγμα, η ασθενώς δεσμευόμενη ουσία είναι η νορεθυνοδρέλη (NE)

Ολοκλήρωση της δοκιμασίας ανταγωνιστικής δέσμευσης

37. Με εξαίρεση τις κοιλότητες για τη συνολική δέσμευση και τα τυφλά (για ραδιοσήμανση), όπως φαίνεται στον πίνακα 6, θα πρέπει να τοποθετούνται 50 μl του ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε κάθε κοιλότητα και θα πρέπει να αναμιγνύονται με 10 μl του μάρτυρα με διαλύτη, του οιστρογόνου αναφοράς (E2), της ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας, της μη δεσμευόμενης ουσίας και των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, αντίστοιχα, και 10 μl διαλύματος [^{3}H]17β-οιστραδιόλης 5 nM. Στη συνέχεια, σε κάθε τρυβλίο προστίθενται και αναμιγνύονται ήπια 30 μl παγόψυχρου διαλύματος υποδοχέα. Το διάλυμα hrERα θα πρέπει να είναι το τελευταίο αντιδραστήριο που προστίθεται. Τα τρυβλία μικροτιτλοδότησης δοκιμασίας θα πρέπει να επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (22° έως 28°C) επί 2 ώρες.

Πίνακας 6

'Ογκος στοιχείων δοκιμασίας για τη δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrER, τρυβλία μικροτιτλοδότησης

Στάδια παρασκευής		Άλλες κοιλότητες εκτός των κοιλοτήτων TB	Κοιλότητες TB	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)
Όγκος στοιχείων για τις παραπάνω κοιλότητες αντίδρασης και σειρά προσθήκης	Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου	50 μl	60 μl	90 μl
	Μη ραδιοσημασμένη E2, ασθενώς δεσμευόμενη ουσία, μη δεσμευόμενη ουσία, διαλύτης και υπό δοκιμή χημικές ουσίες (*)	10 μl	—	—
	[3H]17β-οιστραδιόλη ώστε να προκύπτει τελική συγκέντρωση 0,5 nM (δηλ. 5 nM)	10 μl	10 μl	10 μl
	συγκέντρωση hrERα όπως καθορίστηκε (βλ. παραγράφους 12-13)	30 μl	30 μl	—
Συνολικός όγκος σε κάθε κοιλότητα δοκιμασίας		100 μl	100 μl	100 μl

(*) κατάλληλα παρασκευασμένα για επίτευξη τελικής συγκέντρωσης εντός της αποδεκτής συγκέντρωσης διαλύτη

38. Στη συνέχεια, θα πρέπει να πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, μετά τον διαχωρισμό της δεσμευμένης στον hrERα [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από την ελεύθερη [^{3}H]17β-οιστραδιόλη, διά της προσθήκης 100 μl παγόψυχρου εναιωρήματος DCC σε κάθε κοιλότητα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 21-23 του προσαρτήματος 3 για τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

39. Οι κοιλότητες G10-12 και H10-12 [που προσδιορίζονται ως «τυφλό (για ραδιοσήμανση)» στον πίνακα 4] αντιπροσωπεύουν τις dpm της [^{3}H]-ραδιοσημασμένης οιστραδιόλης σε 10 μl. Η ποσότητα των 10 μl θα πρέπει να προστίθεται απευθείας στο υγρό σπινθηρισμού.

Κριτήρια αποδοχής

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

40. Η καμπύλη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να φθάνει σε ένα πλατώ όταν χρησιμοποιούνται αυξανόμενες συγκεντρώσεις [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, γεγονός που υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με το πρόσδεμα.

41. Η ειδική δέσμευση σε 0,5 nM [^{3}H]17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του αποδεκτού φάσματος 30 % έως 50 % της μέσης μετρηθείσας συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε στη διάρκεια των σειρών δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί και η δοκιμασία κορεσμού να επαναληφθεί.

42. Από τα δεδομένα θα πρέπει να προκύπτει γραμμικό διάγραμμα Scatchard.

43. Η μη ειδική δέσμευση δεν θα πρέπει να είναι υπέρμετρη. Η τιμή της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να αντιστοιχεί κατά κανόνα σε <35 % της συνολικής δέσμευσης. Ωστόσο, ο λόγος μπορεί περιστασιακά να υπερβαίνει το εν λόγω όριο, όταν μετρώνται ιδιαίτερα χαμηλές dpm για τη χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης.

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

44. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη ραδιοσημασμένης 17β-οιστραδιόλης θα πρέπει να εκτοπίζουν την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη από τον υποδοχέα κατά τρόπο που συνάδει με ανταγωνιστική δέσμευση μίας θέσης.

45. Η τιμή IC_{50} για το οιστρογόνο αναφοράς (δηλ. την 17β-οιστραδιόλη) θα πρέπει να είναι κατά προσέγγιση ίση με τη γραμμομοριακή συγκέντρωση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης συν την Kd που προσδιορίζεται από τη δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού.

46. Η συνολική ειδική δέσμευση θα πρέπει να εμπίπτει σταθερά εντός του αποδεκτού φάσματος 40 ± 10 % όταν η μέση μετρηθείσα συγκέντρωση συνολικής ραδιενέργειας που προστέθηκε σε κάθε κοιλότητα ήταν 0,5 nM στη διάρκεια όλων των σειρών δοκιμών. Περιστασιακές ελαφρές αποκλίσεις εκτός του εν λόγω φάσματος είναι αποδεκτές, αλλά εάν οι σειρές δοκιμών βρίσκονται μονίμως εκτός του φάσματος ή μια συγκεκριμένη σειρά δοκιμών βρίσκεται αρκετά έξω από αυτό, η συγκέντρωση πρωτεΐνης θα πρέπει να προσαρμοστεί.

47. Ο διαλύτης δεν θα πρέπει να αλλοιώνει την ευαισθησία ή την αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα του μάρτυρα με διαλύτη (κοιλότητες TB) συγκρίνονται με τον μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα προκειμένου να επαληθευτεί ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν επηρεάζει το σύστημα δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα της συνολικής δέσμευσης (TB) και του μάρτυρα με ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμα, εάν δεν υπάρχει επίδραση του διαλύτη στη δοκιμασία.

48. Η μη δεσμευόμενη ουσία δεν θα πρέπει να εκτοπίζει ποσοστό άνω του 25 % της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης από τον hrERα, όταν ελέγχεται σε συγκέντρωση έως 10^{-3} M (OTES) ή 10^{-4} M (DBP).

49. Για το οιστρογόνο αναφοράς και δύο ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες (π.χ. νορεθυνοδρέλη, νορεθινδρόνη) αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων με χρήση δεδομένων από τη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας δέσμευσης hrER CERI (παράρτημα N της παραπομπής 2). Παρέχονται διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τη μέση τιμή +/- SD (n) για όλες τις σειρές δοκιμών μάρτυρα στα τέσσερα εργαστήρια που συμμετείχαν στη μελέτη επικύρωσης. Υπολογίστηκαν διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης (δηλ. μέγιστη τιμή, ελάχιστη τιμή, κλίση Hill και $logIC_{50}$) για το οιστρογόνο αναφοράς και τις ασθενώς δεσμευόμενες ουσίες, και για το log_{10}RBA των ασθενώς δεσμευόμενων ουσιών σε σχέση με το οιστρογόνο αναφοράς. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι αναμενόμενες κλίμακες τιμών για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια επιδόσεων. Στην πράξη, η κλίμακα τιμών της IC_{50} μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς με βάση την Kd του σκευάσματος υποδοχέα που προκύπτει πειραματικά και τη συγκέντρωση προσδέματος που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία.

50. Δεν αναπτύχθηκαν κριτήρια επιδόσεων για τις παραμέτρους προσαρμογής της καμπύλης για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες λόγω του ευρέος φάσματος των πιθανών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και του φάσματος δυνητικών συγγενειών και εκβάσεων (π.χ. πλήρης καμπύλη, μερική καμπύλη, καμία προσαρμογή καμπύλης). Ωστόσο, η εξέταση των αποτελεσμάτων από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με βάση την επαγγελματική κρίση. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκές εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να προσδιορίζεται με σαφήνεια η μέγιστη τιμή (π.χ. 90 - 100 % δέσμευσης) της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Η μεταβλητότητα μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας καθώς και μεταξύ των 3 μη παράλληλων σειρών δοκιμών θα πρέπει να είναι εντός εύλογων ορίων και να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Οι μάρτυρες από κάθε σειρά δοκιμών για μια υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να προσεγγίζουν τα μέτρα επιδόσεων που αναφέρονται για τη συγκεκριμένη δοκιμασία CERI και πρέπει να είναι σύμφωνοι με τα ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες από το συγκεκριμένο εργαστήριο.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Δοκιμασία δέσμευσης κορεσμού

51. Μετράται τόσο η συνολική όσο και η μη ειδική δέσμευση. Από τις τιμές αυτές υπολογίζεται η ειδική δέσμευση αυξανόμενων συγκεντρώσεων [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπό συνθήκες ισορροπίας, με αφαίρεση της μη ειδικής δέσμευσης από τη συνολική δέσμευση. Ένα διάγραμμα της ειδικής δέσμευσης έναντι της συγκέντρωσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης αναμένεται ότι θα φθάνει σε πλατώ όσον αφορά τη μέγιστη ειδική δέσμευση, το οποίο υποδεικνύει τον κορεσμό του hrERα με την [^{3}H]17β-οιστραδιόλη. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων θα πρέπει να τεκμηριώνει τη δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης σε μία μοναδική θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας. Η μη ειδική, η συνολική και η ειδική δέσμευση θα πρέπει να παρουσιάζονται σε καμπύλη δέσμευσης κορεσμού. Στο πλαίσιο περαιτέρω ανάλυσης των εν λόγω δεδομένων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης (π.χ. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995), με τελική παρουσίαση των δεδομένων υπό μορφή ανάλυσης Scatchard.

52. Η ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να προσδιορίζει τις Bmax και Kd αποκλειστικά από τα δεδομένα συνολικής δέσμευσης, βάσει της παραδοχής ότι η μη ειδική δέσμευση είναι γραμμική, εκτός εάν αιτιολογείται η χρήση διαφορετικής μεθόδου. Επιπλέον, κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Θα πρέπει να αναφέρεται η επιλεγμένη μέθοδος για την εύρωστη παλινδρόμηση. Κατά τον προσδιορισμό των Bmax και Kd από δεδομένα δέσμευσης κορεσμού, θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος (π.χ. με χρήση της μεθόδου Swillens 1995).

Δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης

53. Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης χαράσσεται ως ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης έναντι της συγκέντρωσης (μονάδες log10) του ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει το 50 % της μέγιστης ειδικής δέσμευσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης είναι η τιμή IC_{50}.

54. Οι εκτιμήσεις των τιμών λογάριθμου (IC_{50}) για τους θετικούς μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς και ασθενώς δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων (π.χ. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995). Κατά την προσαρμογή των εν λόγω καμπυλών, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή, η κλίση και ο λογάριθμος (IC_{50}) θα πρέπει, γενικά, να μην περιορίζονται. Κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος. Μετά την αρχική ανάλυση, κάθε καμπύλη δέσμευσης θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη προσαρμογή στο μοντέλο. Η σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία θα πρέπει να υπολογίζεται ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για τη 17β-οιστραδιόλη. Τα αποτελέσματα από τους θετικούς μάρτυρες και τον μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση των μέτρων των επιδόσεων δοκιμασίας των παραγράφων 44-49 του παρόντος προσαρτήματος 3.

55. Τα δεδομένα για το σύνολο των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να αναλύονται με χρήση κλιμακωτής προσέγγισης ώστε να διασφαλίζεται η ορθή ανάλυσή τους και η σωστή ταξινόμηση κάθε καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Συνιστάται κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία να υποβάλλεται αρχικά σε τυποποιημένη ανάλυση δεδομένων πανομοιότυπη με την ανάλυση που χρησιμοποιείται για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (βλ. παράγραφο 54 του παρόντος προσαρτήματος 3). Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να γίνεται τεχνική επανεξέταση των παραμέτρων προσαρμογής της καμπύλης και να εξετάζεται οπτικά η ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης για κάθε σειρά δοκιμών. Εάν, κατά την τεχνική επανεξέταση, παρατηρηθεί εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση του ποσοστού της ειδικά δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των τεχνικών πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση υπό δοκιμή χημικής ουσίας, και συμφωνία των παραμέτρων προσαρμογής μεταξύ των τριών σειρών δοκιμών, αυτό αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ότι η δοκιμασία και οι αναλύσεις δεδομένων διεξήχθησαν ορθά.

Ερμηνεία των δεδομένων

56. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται δεσμευόμενη στον hrERα εάν είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 50 % (σχήμα 1).

57. Υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, μια υπό δοκιμή χημική ουσία θεωρείται μη δεσμευόμενη στον hrERα εάν:

— είναι εφικτή η προσαρμογή μιας καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %, ή

— δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης και το χαμηλότερο μη εξομαλυμένο μέσο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.

58. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θεωρούνται αμφίβολες εάν δεν πληρούται καμία από τις ανωτέρω προϋποθέσεις (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 και 51 %).

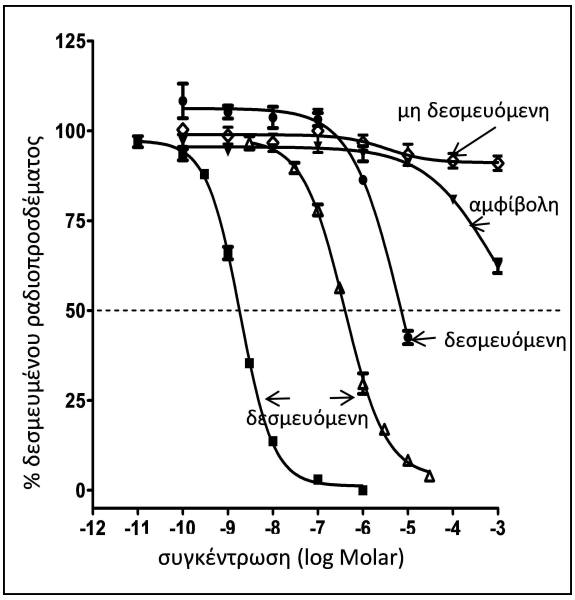
Πίνακας 7

Κριτήρια ταξινόμησης βάσει της καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης για υπό δοκιμή χημική ουσία

Ταξινόμηση	Κριτήρια
Δεσμευόμενη[α]	Είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης. Το **χαμηλότερο σημείο της καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων είναι χαμηλότερο από 50 %.**
Μη δεσμευόμενη[β]	Εάν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης εντός της κλίμακας των δεδομένων υπερβαίνει το 75 %**. Εάν δεν είναι εφικτή η προσαρμογή καμπύλης δέσμευσης, το **χαμηλότερο μη εξομαλυμένο εκατοστιαίο ποσοστό δέσμευσης μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης στα δεδομένα υπερβαίνει το 75 %.**
Αμφίβολη[γ]	Οποιαδήποτε ελέγξιμη σειρά δοκιμών η οποία δεν αντιστοιχεί ούτε σε δεσμευόμενη ούτε σε μη δεσμευόμενη ουσία (π.χ. το χαμηλότερο σημείο της προσαρμοσμένης καμπύλης απόκρισης βρίσκεται μεταξύ 76 – 51 %).

Σχήμα 1

Παραδείγματα ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης



59. Πολλές σειρές δοκιμών που διεξάγονται σε ένα εργαστήριο για υπό δοκιμή χημική ουσία συνδυάζονται διά της απόδοσης αριθμητικών τιμών σε κάθε σειρά δοκιμών και διά της εξαγωγής του μέσου όρου των σειρών δοκιμών, όπως φαίνεται στον πίνακα 8. Τα αποτελέσματα των συνδυασμένων σειρών δοκιμών σε κάθε εργαστήριο συγκρίνονται με την αναμενόμενη ταξινόμηση για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πίνακας 8

Μέθοδος ταξινόμησης υπό δοκιμή χημικής ουσίας με χρήση πολλών σειρών δοκιμών σε ένα εργαστήριο

Για την απόδοση τιμής σε κάθε σειρά δοκιμών:

Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	2
Αμφίβολη	1
Μη δεσμευόμενη	0

Για την ταξινόμηση του μέσου όρου αριθμητικών τιμών στις σειρές δοκιμών:

Ταξινόμηση	**Αριθμητική τιμή**
Δεσμευόμενη	Μέσος όρος ≥ 1,5
Αμφίβολη	0,5 ≤ μέσος όρος < 1,5
Μη δεσμευόμενη	Μέσος όρος < 0,5

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

60. Βλ. παράγραφο 24 της ενότητας «ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ hrER» της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 3.1

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΡΩΝ

[^{3}H]E2: 17β-οιστραδιόλη ραδιοσημασμένη με τρίτιο

DCC: επιχρισμένος με δεξτράνη ενεργός άνθρακας

E_2: μη ραδιοσημασμένη 17β-οιστραδιόλη (αδρανής)

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, με 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % γλυκερόλη, 0,2 mM λευπεπτίνης, 1 mM διθειοθρεϊτόλης και 10 mg/ml αλβουμίνης βόειου ορού

hrERα: ανασυνδυασμένος ανθρώπινος υποδοχέας οιστρογόνων α (περιοχή δέσμευσης προσδέματος)

Πανομοιότυπο δείγμα: μία από πολλές κοιλότητες με το ίδιο περιεχόμενο στις ίδιες συγκεντρώσεις, οι οποίες υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή στο πλαίσιο μεμονωμένης σειράς δοκιμών. Στο παρόν πρωτόκολλο, κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υποβάλλεται σε δοκιμή εις τριπλούν· δηλαδή υπάρχουν τρία πανομοιότυπα δείγματα που υποβάλλονται ταυτόχρονα σε δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Σειρά δοκιμών: πλήρης σειρά ταυτόχρονα εξεταζόμενων κοιλοτήτων δοκιμασίας τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, που παρέχει όλες τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον χαρακτηρισμό της δέσμευσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον hrERα (δηλαδή συνολική [^{3}H]17β-οιστραδιόλη που προστίθεται στην κοιλότητα δοκιμασίας, μέγιστη δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης στον hrERα, μη ειδική δέσμευση, και συνολική δέσμευση σε διάφορες συγκεντρώσεις υπό δοκιμή χημικής ουσίας). Μια σειρά δοκιμών μπορεί να περιλαμβάνει ακόμη και μία μόνο κοιλότητα δοκιμασίας (πανομοιότυπο δείγμα) ανά συγκέντρωση αλλά, δεδομένου ότι στο παρόν πρωτόκολλο απαιτείται η διεξαγωγή της δοκιμασίας εις τριπλούν, μία σειρά δοκιμών περιλαμβάνει τρεις κοιλότητες δοκιμασίας ανά συγκέντρωση. Επιπλέον, στο παρόν πρωτόκολλο απαιτούνται τρεις ανεξάρτητες (δηλ. μη παράλληλες) σειρές δοκιμών ανά χημική ουσία.

Προσάρτημα 3.2

ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Τρυβλίο	**Θέση**	**Πανομοιότυπο δείγμα**	**Τύπος κοιλότητας**	**Κωδικός κοιλότητας**	**Κωδικός συγκέντρωσης**	**Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**	**Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)**	**Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)**	**Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)**	**Όγκος από το τρυβλίο αφαίωσης (μL)**	**Τελικός όγκος (μl)**	**Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)**
S	A1	1	Τυφλό	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Τυφλό	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Τυφλό	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο φραίωσης (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	D3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	μη ραδιοσημασμένο E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	μη ραδιοσημασμένη E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	A4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο φραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	E5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	νορεθυνοδρέλη	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	νορεθυνοδρέλη	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	νορεθυνοδρέλη	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	νορεθυνοδρέλη	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

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
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

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
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	OTES8D-BP7	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	συνολική δέσμευση	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο αφαίωσης (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	B11	5	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Μάρτυρας με ρυθμιστικό διάλυμα	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H1	—	90	—	10	—	100	—

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
S	G11 (*)	2	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Τυφλό (για ραδιοσήμανση)	Ραδιοσημασμένο	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Άγνωστο 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Άγνωστο 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Άγνωστο 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Άγνωστο 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Άγνωστο 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Άγνωστο 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Άγνωστο 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Άγνωστο 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Άγνωστο 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	D1	1	Άγνωστο 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Άγνωστο 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Άγνωστο 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Άγνωστο 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Άγνωστο 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Άγνωστο 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Άγνωστο 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Άγνωστο 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Άγνωστο 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Άγνωστο 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Άγνωστο 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Άγνωστο 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Άγνωστο 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Άγνωστο 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	H3	3	Άγνωστο 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Άγνωστο 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Άγνωστο 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Άγνωστο 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Άγνωστο 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Άγνωστο 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Άγνωστο 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Άγνωστο 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Άγνωστο 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Άγνωστο 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Άγνωστο 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Άγνωστο 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Άγνωστο 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Άγνωστο 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	E5	2	Άγνωστο 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Άγνωστο 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Άγνωστο 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Άγνωστο 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Άγνωστο 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Άγνωστο 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Άγνωστο 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Άγνωστο 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Άγνωστο 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Άγνωστο 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Άγνωστο 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Άγνωστο 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Άγνωστο 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Άγνωστο 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	B7	1	Άγνωστο 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Άγνωστο 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Άγνωστο 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Άγνωστο 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Άγνωστο 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Άγνωστο 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Άγνωστο 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Άγνωστο 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Άγνωστο 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Άγνωστο 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Άγνωστο 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Άγνωστο 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Άγνωστο 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Άγνωστο 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	F9	3	Άγνωστο 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Άγνωστο 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Άγνωστο 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Άγνωστο 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Άγνωστο 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Άγνωστο 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Άγνωστο 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Μάρτυρας E2 (μέγ.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Μάρτυρας E2 (μέγ.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Μάρτυρας E2 (μέγ.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Μάρτυρας E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Μάρτυρας E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Μάρτυρας E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (µl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (µL)	Όγκος από το τρυβλίο αφαίωσης (µL)	Τελικός όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	C10	1	Μάρτυρας NE (μέγ.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Μάρτυρας NE (μέγ.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Μάρτυρας NE (μέγ.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Μάρτυρας NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Μάρτυρας NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Μάρτυρας NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	μη ραδιοσημασμένη E2 (υψηλό)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Τρυβλίο	Θέση	Πανομοιότυπο δείγμα	Τύπος κοιλότητας	Κωδικός κοιλότητας	Κωδικός συγκέντρωσης	Αρχική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)	Αποθεματικό διάλυμα hrER (ml)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (μl)	Όγκος ιχνηθέτη (σημασμένης E2) (μL)	Όγκος από το τρυβλίο αραίωσης (μL)	Τελικός όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση ανταγωνιστή (M)
P1	G10	1	συνολική δέσμευση	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	συνολική δέσμευση	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	συνολική δέσμευση	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	συνολική δέσμευση	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	συνολική δέσμευση	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	συνολική δέσμευση	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Επισημαίνεται ότι οι «ραδιοσημασμένες» κοιλότητες είναι κενές κατά την επώαση. Τα 10 μl προστίθενται μόνο για τη μέτρηση του σπινθηρισμού.

Προσάρτημα 4

ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ HRER

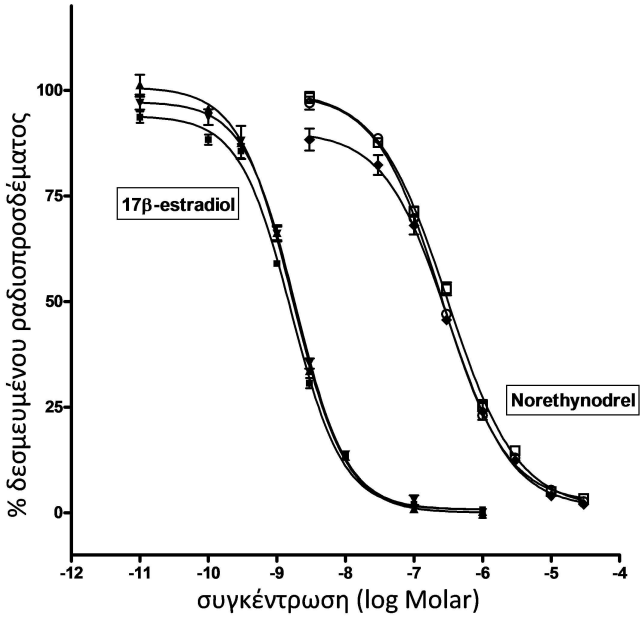
1. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμευσης hrERα μετρά τη δέσμευση μιας μεμονωμένης συγκέντρωσης [^{3}H]17β- οιστραδιόλης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης χαράσσεται ως ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης έναντι της συγκέντρωσης (μονάδες log10) του ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει το 50 % της μέγιστης ειδικής δέσμευσης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης είναι η IC_{50}.

Ανάλυση δεδομένων για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία (1)

2. Τα δεδομένα από τις σειρές δοκιμών μάρτυρα (δηλ. η εκατοστιαία ειδική δέσμευση [^{3}H]17β-οιστραδιόλης και η λογαριθμική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας) μετασχηματίζονται για περαιτέρω ανάλυση. Οι εκτιμήσεις των τιμών $\log(IC_{50})$ για τους θετικούς μάρτυρες (οιστρογόνο αναφοράς και ασθενώς δεσμευόμενη ουσία) θα πρέπει να προσδιορίζονται με χρήση λογισμικού μη γραμμικής προσαρμογής καμπύλης κατάλληλου για την προσαρμογή εξίσωσης Hill τεσσάρων παραμέτρων (π.χ. BioSoft, GraphPad Prism) (2). Κατά την προσαρμογή των καμπυλών, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή, η κλίση και ο λογάριθμος (IC_{50}) μπορούν κατά κανόνα να αφεθούν χωρίς περιορισμό. Κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης προσαρμογής, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανάλυση εύρωστης παλινδρόμησης, εκτός εάν παρέχονται οι λόγοι για τη μη χρήση της. Θα πρέπει να αναφέρεται η επιλεγμένη μέθοδος για την εύρωστη παλινδρόμηση. Για τις δοκιμασίες hrER FW ή CERI δεν χρειάζεται διόρθωση ως προς την εξάντληση του προσδέματος, αλλά μπορεί να εξεταστεί ως ενδεχόμενο, εάν χρειαστεί. Μετά την αρχική ανάλυση, κάθε καμπύλη δέσμευσης θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη προσαρμογή στο μοντέλο. Η σχετική συγγένεια δέσμευσης (RBA) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία μπορεί να υπολογιστεί ως ποσοστό του λογάριθμου (IC_{50}) για την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία σε σχέση με τον λογάριθμο (IC_{50}) για τη 17β-οιστραδιόλη. Τα αποτελέσματα για τους θετικούς μάρτυρες και τον μάρτυρα μη δεσμευόμενης ουσίας θα πρέπει να αξιολογούνται με βάση τα μέτρα επιδόσεων της δοκιμασίας και τα κριτήρια αποδοχής που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (παράγραφος 20), προσάρτημα 2 (δοκιμασία FW, παράγραφοι 41-51) και προσάρτημα 3 (δοκιμασία CERI, παράγραφοι 41-51). Παραδείγματα 3 σειρών δοκιμών για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία φαίνονται στο σχήμα 1.

Σχήμα 1

Παραδείγματα των καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης για το οιστρογόνο αναφοράς και τον μάρτυρα ασθενώς δεσμευόμενης ουσίας



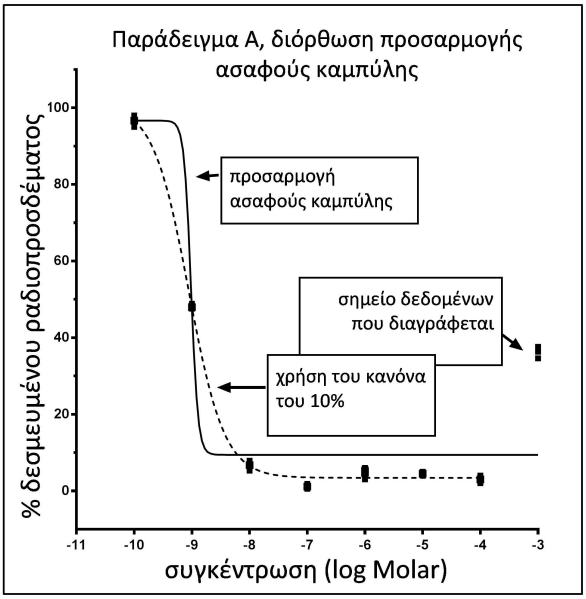
Ανάλυση δεδομένων για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες

3. Τα δεδομένα για το σύνολο των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να αναλύονται με χρήση κλιμακωτής προσέγγισης ώστε να διασφαλίζεται η ορθή ανάλυσή τους και η σωστή ταξινόμηση κάθε καμπύλης ανταγωνιστικής δέσμευσης. Κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται αρχικά σε τυποποιημένη ανάλυση δεδομένων πανομοιότυπη με την ανάλυση που χρησιμοποιείται για το οιστρογόνο αναφοράς και την ασθενώς δεσμευόμενη ουσία. Μετά την αρχική ανάλυση, θα πρέπει να γίνεται τεχνική επανεξέταση των παραμέτρων προσαρμογής της καμπύλης και να εξετάζεται οπτικά η ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων δέσμευσης στην προκύπτουσα καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης για κάθε σειρά δοκιμών. Εάν, κατά την τεχνική επανεξέταση, παρατηρηθεί εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση του ποσοστού της ειδικά δεσμευμένης [^{3}H]17β-οιστραδιόλης, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των τεχνικών πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε συγκέντρωση χημικής ουσίας, και συμφωνία των παραμέτρων προσαρμογής μεταξύ των τριών σειρών δοκιμών, αυτό αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ότι η δοκιμασία και οι αναλύσεις δεδομένων διεξήχθησαν ορθά. Η επανεξέταση των αποτελεσμάτων από κάθε σειρά δοκιμών για υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να βασίζεται σε επαγγελματική κρίση, και τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως δεσμευόμενη ή μη δεσμευόμενη θα πρέπει να είναι επιστημονικά τεκμηριωμένα.

4. Περιστασιακά, μπορεί να υπάρχουν παραδείγματα δεδομένων που χρήζουν μεγαλύτερης προσοχής προκειμένου να αναλυθούν και να ερμηνευτούν δεόντως τα δεδομένα δέσμευσης hrER. Σε προηγούμενες μελέτες είχαν παρουσιαστεί περιπτώσεις στις οποίες η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων ανταγωνιστικής δέσμευσης υποδοχέα περιπλέκεται λόγω ανόδου της εκατοστιαίας ειδικής δέσμευσης κατά τις δοκιμές χημικών ουσιών στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (σχήμα 2). Πρόκειται για γνωστό ζήτημα που προκύπτει όταν χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα για μια σειρά δοκιμασιών ανταγωνιστικής δέσμευσης υποδοχέα (3). Σε αυτές τις περιπτώσεις, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση απόκριση, αλλά καθώς η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσεγγίζει το όριο διαλυτότητας, η εκτόπιση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης παύει να μειώνεται. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα δεδομένα για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις υποδεικνύουν ότι η δοκιμασία έχει φθάσει στο βιολογικό όριό της. Για παράδειγμα, το φαινόμενο αυτό συνδέεται πολλές φορές με τη χημική αδιαλυτότητα και κατακρήμνιση σε υψηλές συγκεντρώσεις, ή μπορεί επίσης να αντικατοπτρίζει την υπέρβαση της ικανότητας του επιχρισμένου με δεξτράνη ενεργού άνθρακα να παγιδεύει το αδέσμευτο ραδιοσημασμένο πρόσδεμα κατά τη διαδικασία διαχωρισμού στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών. Η συμπερίληψη αυτού του είδους των σημείων δεδομένων κατά την προσαρμογή δεδομένων ανταγωνιστικής δέσμευσης σε σιγμοειδή καμπύλη μπορεί ενίοτε να οδηγήσει σε εσφαλμένη ταξινόμηση του δυναμικού δέσμευσης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον ER (σχήμα 2). Για την αποφυγή σφάλματος, το πρωτόκολλο για τις δοκιμασίες δέσμευσης hrER FW και CERI περιλαμβάνει τη δυνατότητα αποκλεισμού σημείων δεδομένων από τις αναλύσεις σε περιπτώσεις κατά τις οποίες ο μέσος όρος των πανομοιότυπων δειγμάτων για την εκατοστιαία ειδική δέσμευση της [^{3}H]17β-οιστραδιόλης υπερβαίνει κατά 10 % ή περισσότερο τη μέση τιμή που παρατηρείται σε χαμηλότερη συγκέντρωση (ο λεγόμενος «κανόνας του 10 %»). Ο κανόνας αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά για μια ορισμένη καμπύλη και τα δεδομένα που απομένουν πρέπει να καλύπτουν τουλάχιστον 6 συγκεντρώσεις προκειμένου να είναι εφικτή η σωστή ταξινόμηση της καμπύλης.

Σχήμα 2

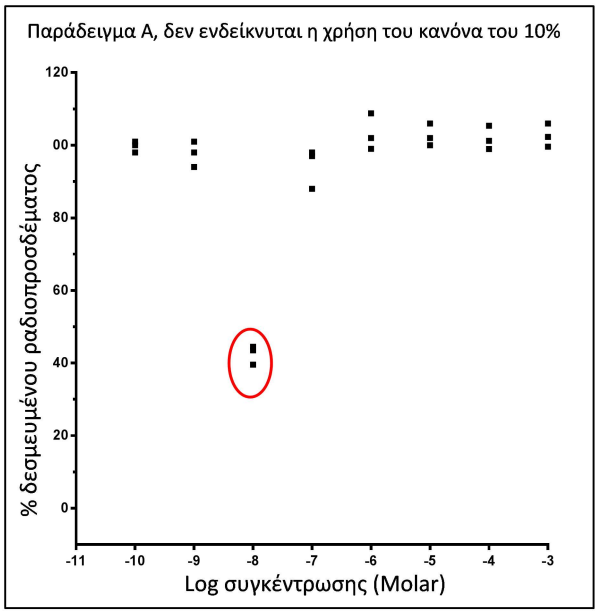
Παραδείγματα καμπυλών ανταγωνιστικής δέσμευσης με και χωρίς τη χρήση του κανόνα του 10 %

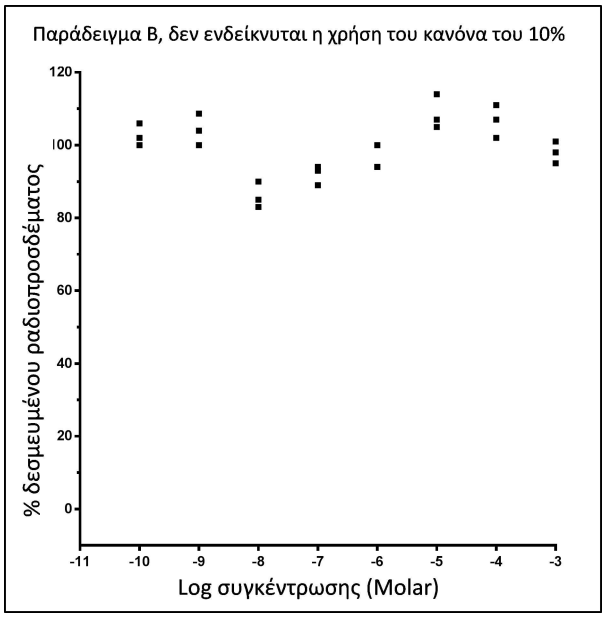


5. Η ορθή χρήση του κανόνα του 10 % για τη διόρθωση τέτοιων καμπυλών θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά, και συνιστάται να εφαρμόζεται μόνο σε εκείνες τις περιπτώσεις στις οποίες υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για ουσία δεσμευόμενη στον hrER. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τη μελέτη επικύρωσης της δοκιμασίας hrER FW, παρατηρήθηκε ότι ο κανόνας του 10 % είχε ενίοτε μια ακούσια και απρόβλεπτη συνέπεια. Οι χημικές ουσίες που δεν αλληλεπιδρούσαν με τον υποδοχέα (αληθείς μη δεσμευόμενες ουσίες) εμφάνιζαν συχνά μεταβλητότητα γύρω από τη δέσμευση ραδιοσημασμένου προσδέματος 100 % η οποία ήταν μεγαλύτερη από το 10 % σε όλες τις συγκεντρώσεις που υποβάλλονταν σε δοκιμή. Εάν η χαμηλότερη τιμή συνέβαινε να βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, τα δεδομένα από όλες τις υψηλότερες συγκεντρώσεις θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποκλειστούν από την ανάλυση εάν εφαρμοζόταν ο κανόνας του 10 %, παρότι οι συγκεντρώσεις αυτές θα ήταν χρήσιμες για τον χαρακτηρισμό της χημικής ουσίας ως μη δεσμευόμενης. Στο σχήμα 3 φαίνονται παραδείγματα στα οποία δεν αρμόζει η χρήση του κανόνα του 10 %.

Σχήμα 3

Παραδείγματα δεδομένων ανταγωνιστικής δέσμευσης στα οποία δεν αρμόζει η χρήση του κανόνα του 10 %





Παραπομπές

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα),* Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΟ ΒΑΣΙΚΟ ΣΥΜΒΑΝ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΔΥΣΜΕΝΟΥΣ ΕΚΒΑΣΗΣ (AOP) ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέθοδος δοκιμών που βασίζεται στο βασικό συμβάν της ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων

1. Ευαισθητοποιητικές του δέρματος ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες, όταν έρχονται επαφή με το δέρμα, προκαλούν αλλεργική αντίδραση όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (GHS του ΟΗΕ) (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1272/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP) ([1]). Υπάρχει γενική συμφωνία για τα βασικά υποκείμενα βιολογικά συμβάντα στη δερματική ευαισθητοποίηση. Οι υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τους χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς που συνδέονται με τη δερματική ευαισθητοποίηση έχουν συνοψιστεί με τη μορφή μιας πορείας δυσμενούς έκβασης (Adverse Outcome Pathway, AOP) στο πλαίσιο του προγράμματος AOP του ΟΟΣΑ (2) – από το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι τα ενδιάμεσα συμβάντα και τη δυσμενή επίδραση, δηλαδή την αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το μοριακό εναρκτήριο συμβάν (δηλ. το πρώτο βασικό συμβάν) είναι η ομοιοπολική δέσμευση ηλεκτρονιόφιλων ουσιών σε πυρηνόφιλα κέντρα των πρωτεϊνών του δέρματος. Το δεύτερο βασικό συμβάν στην εν λόγω AOP σημειώνεται στα κερατινοκύτταρα και περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που συνδέονται με συγκεκριμένες πορείες κυτταρικής σηματοδότησης, όπως εκείνες που εξαρτώνται από το στοιχείο απόκρισης στα αντιοξειδωτικά/ηλεκτρονιόφιλα (Antioxidant Response Element, ARE). Το τρίτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DC), που συνήθως αξιολογείται με βάση την έκφραση ειδικών δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας, χημειοκινών και κυτταροκινών. Το τέταρτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων Τ, που αξιολογείται έμμεσα με τη δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων σε ποντικό (LLNA) (3).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 442E του ΟΟΣΑ (2017). Περιγράφει *in vitro* δοκιμασίες που αφορούν τους μηχανισμούς που περιγράφονται σε σχέση με το βασικό συμβάν για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων της AOP για την ευαισθητοποίηση του δέρματος (2). Η μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δοκιμές που προορίζονται για την υποστήριξη της διάκρισης ανάμεσα σε ευαισθητοποιητικές και μη ευαισθητοποιητικές του δέρματος ουσίες, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP.

   Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι οι ακόλουθες:

   — δοκιμή ενεργοποίησης ανθρώπινης κυτταρικής σειράς (h-CLAT)

   — δοκιμή ενεργοποίησης κυτταρικής σειράς U937 (U-SENS™)

   — δοκιμασία γονιδίου αναφοράς ιντερλευκίνης 8 (δοκιμασία IL-8 Luc)

3. Οι δοκιμές που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και στην αντίστοιχη TG του ΟΟΣΑ ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των δεδομένων και ως προς τις μετρούμενες ενδείξεις, αλλά μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις εθνικές απαιτήσεις για αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με το βασικό συμβάν για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων της AOP για την ευαισθητοποίηση του δέρματος, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008

Ιστορικό και αρχές των δοκιμών που περιλαμβάνονται στη μέθοδο δοκιμών με βάση το βασικό συμβάν

4. Η αξιολόγηση της δερματικής ευαισθητοποίησης περιλαμβάνει συνήθως τη χρήση πειραματόζωων. Στις κλασικές μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιούνται ινδικά χοιρίδια, όπως η δοκιμή Magnusson Kligman με μεγιστοποίηση σε ινδικά χοιρίδια (GPMT) και η δοκιμή Buehler (μέθοδος δοκιμών B.6) (4), αξιολογούνται τόσο το στάδιο επαγωγής όσο και το στάδιο πρόκλησης δερματικής ευαισθητοποίησης. Οι δοκιμές σε ποντικό, η LLNA (μέθοδος δοκιμών B.42) (3) και οι δύο τροποποιήσεις της χωρίς τη χρήση ραδιενέργειας, η LLNA: DA (μέθοδος δοκιμών B.50) (5) και η LLNA: BrdU-ELISA (μέθοδος δοκιμών B.51) (6), αξιολογούν αποκλειστικά την επαγωγική απόκριση και έχουν επίσης κριθεί αποδεκτές, δεδομένου ότι προσφέρουν ένα πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων, σε συνδυασμό με την αντικειμενική μέτρηση του επαγωγικού σταδίου της δερματικής ευαισθητοποίησης.

5. Πρόσφατα εγκρίθηκαν μέθοδοι δοκιμών μηχανιστικής βάσης *in chemico* και *in vitro* που αφορούν το πρώτο βασικό συμβάν [μέθοδος δοκιμών B.59, Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστικότητας (7)] και το δεύτερο βασικό συμβάν [μέθοδος δοκιμών B.60, Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης (8)] της AOP ευαισθητοποίησης του δέρματος για την υποστήριξη της αξιολόγησης του δυναμικού επικινδυνότητας των χημικών ουσιών για ευαισθητοποίηση του δέρματος.

6. Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών προσδιορίζουν ποσοτικά είτε τη μεταβολή στην έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων έπειτα από έκθεση σε ευαισθητοποιητικά (π.χ. CD54, CD86) είτε τις μεταβολές στην έκφραση της IL-8, μιας κυτταροκίνης που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι τα ευαισθητοποιητικά του δέρματος επάγουν την έκφραση δεικτών της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι CD40, CD54, CD80, CD83 και CD86, επιπροσθέτως προς την επαγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1β και TNF-α, και αρκετών χημειοκινών, περιλαμβανομένης της IL-8 (CXCL8) και της CCL3 (9) (10) (11) (12), που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (2).

7. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων αντιπροσωπεύει ένα μόνο βασικό συμβάν της AOP ευαισθητοποίησης του δέρματος (2) (13), οι πληροφορίες που παράγονται από δοκιμές που μετρούν μόνο δείκτες ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων μπορεί να μην επαρκούν για την εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την παρουσία ή την απουσία δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης των χημικών ουσιών. Ως εκ τούτου, προτείνεται η χρήση των δεδομένων που παράγονται με τις δοκιμές της παρούσας μεθόδου δοκιμών για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ/κανονισμός CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος, όταν χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA), σε συνδυασμό με άλλες συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. που προκύπτουν από *in vitro* δοκιμασίες που αφορούν άλλα βασικά συμβάντα της AOP ευαισθητοποίησης του δέρματος καθώς και μεθόδους χωρίς δοκιμές, περιλαμβανομένης της σύγκρισης με χημικώς ανάλογες ουσίες (13). Παραδείγματα της χρήσης των δεδομένων που παράγονται με τις εν λόγω δοκιμές στο πλαίσιο καθορισμένων προσεγγίσεων, δηλαδή τυποποιημένων προσεγγίσεων τόσο σε σχέση με το σύνολο των χρησιμοποιούμενων πηγών πληροφοριών όσο και στο πλαίσιο της διαδικασίας που εφαρμόζεται στα δεδομένα για την πραγματοποίηση προβλέψεων, έχουν δημοσιευτεί (13) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμα στοιχεία στο πλαίσιο της IATA.

8. Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν καθαυτές, ούτε για την ταξινόμηση ευαισθητοποιητικών του δέρματος στις υποκατηγορίες 1A και 1B, όπως ορίζονται στο GHS του ΟΗΕ / στον κανονισμό CLP, για τις αρχές που εφαρμόζουν τις εν λόγω προαιρετικές υποκατηγορίες, ούτε για την πρόβλεψη της ισχύος δράσης κατά τη λήψη αποφάσεων αξιολόγησης της ασφάλειας. Εντούτοις, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με τις παρούσες μεθόδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έχουν για την ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας στην κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP.

9. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται στη δοκιμή [1] και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα των δοκιμών για τον έλεγχο μονοσυστατικών ουσιών, πολυσυστατικών ουσιών και/ή μειγμάτων. Επί του παρόντος, υπάρχουν περιορισμένες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την εφαρμοσιμότητα των δοκιμών σε πολυσυστατικές ουσίες/μείγματα (14) (15). Οι δοκιμές είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμες στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Ωστόσο, πριν από τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν –και, εάν ναι, για ποιον λόγο– μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό [2]. Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Επιπλέον, κατά τον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών ή μειγμάτων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή παρεμπόδιση των παρατηρούμενων αποκρίσεων από κυτταροτοξικά συστατικά.

---

[1] Τον Ιούνιο του 2013, η κοινή συνεδρίαση του ΟΟΣΑ συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ.

[2] Η διατύπωση αυτή προτάθηκε και εγκρίθηκε κατά τη συνεδρίαση του WNT του Απριλίου 2014.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων.

(4) Κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος.

(5) Κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων: DA.

(6) Κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων: BrdU-ELISA.

(7) Κεφάλαιο B.59 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος in chemico: Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστικότητας (DPRA).

(8) Κεφάλαιο B.60 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος *in vitro*: Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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. Sci. 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.

Προσάρτημα 1

ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ (H-CLAT)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η h-CLAT χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στην έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) (δείκτες CD86 και CD54), στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1, κατόπιν έκθεσης σε ευαισθητοποιητικά (1)(2). Στη συνέχεια, τα μετρηθέντα επίπεδα έκφρασης των δεικτών CD86 και CD54 χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.

2. Η h-CLAT έχει αξιολογηθεί σε μελέτη επικύρωσης του εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα (EURL ECVAM) και σε επακόλουθη ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους από τη Συμβουλευτική Επιστημονική Επιτροπή EURL ECVAM (ESAC). Αφού έλαβε υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία και τις απόψεις των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, το EURL ECVAM (3) συνέστησε τη χρήση της h-CLAT στο πλαίσιο ΙΑΤΑ για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση του κινδύνου. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων h-CLAT σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. Διαπιστώθηκε ότι η h-CLAT μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στη χρήση τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η δοκιμή είναι της τάξης του 80 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά (3)(12). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (13) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (14) υποδεικνύουν συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορίας 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 85 % (N=142), με ευαισθησία 93 % (94/101) και ειδικότητα 66 % (27/41) [βάσει εκ νέου ανάλυσης του EURL ECVAM (12) στο πλαίσιο της οποίας ελήφθησαν υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα και δεν ελήφθησαν υπόψη τα αρνητικά αποτελέσματα για τις χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4]. Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με την h-CLAT αφορούν πιθανότατα χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) παρά ουσίες που εμφανίζουν υψηλή ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1A κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (4)(13)(15). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της μεθόδου h-CLAT ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ως προς την ευαισθητοποίηση του δέρματος. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την h-CLAT ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η μέθοδος δοκιμών h-CLAT είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως προσδιορίζονται σε μελέτες *in vivo*) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (3)(14)(15). Η μέθοδος δοκιμών h-CLAT είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή εναιώρημα στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη/φορέα σε διαφορετικές φάσεις) σε κατάλληλο διαλύτη/φορέα (βλ. παράγραφο 14). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 τείνουν να δώσουν ψευδοαρνητικά αποτελέσματα (14). Ως εκ τούτου, τα αρνητικά αποτελέσματα με υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Αντιθέτως, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 μπορούν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως ευαισθητοποιητικού. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της χρησιμοποιούμενης κυτταρικής σειράς (16) και λόγω των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτένια (δηλ. οι ουσίες που απαιτούν ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) και τα αβιοτικά προαπτένια (δηλ. οι ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση), και ιδίως όσα χαρακτηρίζονται από χαμηλή ταχύτητα οξείδωσης, μπορεί επίσης να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα στην h-CLAT (15). Παρότι οι φθορίζουσες ουσίες μπορούν να αξιολογηθούν με την h-CLAT (17), οι ισχυρά φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος με την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) ή το ιωδιούχο προπίδιο (PI) παρεμποδίζουν την κυτταρομετρική ανίχνευση ροής και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν σωστά με χρήση συζευγμένων με FITC αντισωμάτων ή PI. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα ή άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα, εφόσον μπορεί να καταδειχθεί ότι παρέχουν ανάλογα αποτελέσματα με τα σημασμένα με FITC αντισώματα (βλ. παράγραφο 24) ή το PI (βλ. παράγραφο 18) π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1-2. Υπό το πρίσμα των ανωτέρω, τα αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών h-CLAT δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες χημικών ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

5. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος h-CLAT υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (4)(5)(9), όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της h-CLAT θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.

6. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η μέθοδος h-CLAT είναι μια *in vitro* δοκιμασία με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι μεταβολές της έκφρασης κάποιων δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας (CD86 και CD54) σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας, στα κύτταρα THP-1, μετά από έκθεση 24 ωρών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Τα εν λόγω επιφανειακά μόρια αποτελούν τυπικούς δείκτες της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων THP-1 και μπορούν να μιμούνται την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, η οποία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προδιέγερση των Τ κυττάρων. Οι μεταβολές της έκφρασης επιφανειακών δεικτών μετρώνται με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση των κυττάρων με αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα. Ταυτόχρονα, διεξάγεται επίσης μέτρηση της κυτταροτοξικότητας προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνεται η έκφραση των επιφανειακών δεικτών σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Η σχετική ένταση φθορισμού των επιφανειακών δεικτών σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα υπολογίζεται και χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 26) για να υποστηριχθεί η διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

8. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1.2. Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 20-22), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9. Η παρούσα δοκιμή βασίζεται στο πρωτόκολλο αριθ. 158 της υπηρεσίας βάσης δεδομένων h-CLAT για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των πειραμάτων σε ζώα (DB-ALM) (18), το οποίο είναι αντίστοιχο του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης που συντονίστηκε από το EURL ECVAM. Συνιστάται να χρησιμοποιείται αυτό το πρωτόκολλο κατά την εφαρμογή και χρήση της μεθόδου h-CLAT στο εργαστήριο. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για τη μέθοδο h-CLAT, η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια: *δοκιμασία προσδιορισμού δόσης* και *μέτρηση έκφρασης CD86/CD54*.

Προπαρασκευή των κυττάρων

10. Για την εφαρμογή της μεθόδου h-CLAT θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1. Συνιστάται τα κύτταρα (TIB-202™) να λαμβάνονται από επαρκώς εξειδικευμένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection.

11. Τα κύτταρα THP-1 καλλιεργούνται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2 σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 συμπληρωμένο με 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), 0,05 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Η χρήση πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μπορεί να παραλειφθεί. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, οι χρήστες θα πρέπει να βεβαιώνονται ότι η απουσία αντιβιοτικών από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα, π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1.2. Σε κάθε περίπτωση, για τον περιορισμό του κινδύνου μόλυνσης στο ελάχιστο, θα πρέπει να ακολουθούνται οι ορθές πρακτικές καλλιέργειας κυττάρων, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο κυττάρων. Τα κύτταρα THP-1 εμβολιάζονται συνήθως κάθε 2-3 ημέρες σε πυκνότητα 0,1 έως 0,2 × 10^6 κύτταρα/ml. Θα πρέπει να διατηρούνται σε πυκνότητες από 0,1 έως 1,0 × 10^6 κύτταρα/ml. Πριν από τη χρήση τους στις δοκιμές, θα πρέπει να ελέγχεται εάν τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια, μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστικότητας. Ο έλεγχος δραστικότητας των κυττάρων θα πρέπει να διενεργείται με χρήση των θετικών μαρτύρων 2,4-δινιτροχλωροβενζόλιο (DNCB) (αριθ. CAS 97-00-7, καθαρότητα ≥ 99 %) και θειικό νικέλιο ($NiSO_4$) (αριθ. CAS 10101-97-0, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (αριθ. CAS 50-21-5, ≥ καθαρότητα 85 %), δύο εβδομάδες μετά την απόψυξη. Αμφότερα τα DNCB και $NiSO_4$ θα πρέπει να επάγουν θετική απόκριση και των δύο δεικτών κυτταρικής επιφάνειας CD86 και CD54, ενώ το LA θα πρέπει να επάγει αρνητική απόκριση και των δύο δεικτών. Για τη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κύτταρα που έχουν υποβληθεί επιτυχώς στον έλεγχο δραστικότητας. Τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται έως δύο μήνες μετά την απόψυξη. Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 30. Ο έλεγχος δραστικότητας θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 20-24.

12. Για τη δοκιμή, κύτταρα THP-1 εμβολιάζονται σε πυκνότητα είτε 0,1 × 10^6 κύτταρα/ml είτε 0,2 × 10^6 κύτταρα/ml και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 72 ώρες ή επί 48 ώρες αντίστοιχα. Είναι σημαντικό η πυκνότητα των κυττάρων στη φιάλη καλλιέργειας αμέσως μετά την περίοδο προκαλλιέργειας να είναι κατά το δυνατόν συνεπής σε κάθε πείραμα (με χρήση μίας από τις δύο συνθήκες προκαλλιέργειας που περιγράφονται ανωτέρω), διότι η πυκνότητα των κυττάρων στη φιάλη καλλιέργειας αμέσως μετά την προκαλλιέργεια μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των CD86/CD54 που επάγεται από τα αλλεργιογόνα (19). Την ημέρα της δοκιμής, κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από τη φιάλη καλλιέργειας επαναιωρούνται με πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα 2 × 10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλίο επίπεδης βάσης 24 κοιλοτήτων (500 μl, 1 × 10^6 κύτταρα/κοιλότητα) ή τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (80 μl, 1,6 × 10^5 κύτταρα/κοιλότητα).

Δοκιμασία προσδιορισμού δόσης

13. Διεξάγεται *δοκιμασία προσδιορισμού δόσης* για τον προσδιορισμό της CV75, η οποία είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που δίνει κυτταρική βιωσιμότητα (CV) 75 % σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα. Η τιμή CV75 χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη μέτρηση της έκφρασης των *CD86/CD54* (βλ. παραγράφους 20-24).

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

14. Η παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για τη μέθοδο h-CLAT, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς (βλ. επίσης παράγραφο 4) σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο, ως πρώτη επιλογή, ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, καθαρότητας ≥ 99 %), ως δεύτερη επιλογή σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή ή δεν διασπείρεται σταθερώς στους δύο προηγούμενους διαλύτες/φορείς, σε τελικές συγκεντρώσεις 100 mg/ml (σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 500 mg/ml (σε DMSO). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες/φορείς, πέραν των όσων περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον η χρήση τους τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον τελικό διαλύτη/φορέα.

15. Ξεκινώντας από αποθεματικά διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών 100 mg/ml (σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 500 mg/ml (σε DMSO), γίνονται οι εξής αραιώσεις:

— για διαλύτη/φορέα αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο: παρασκευάζονται οκτώ αποθεματικά διαλύματα (οκτώ συγκεντρώσεις), με διαδοχικές αραιώσεις 2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Στη συνέχεια, αυτά τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται περαιτέρω 50x σε θρεπτικό μέσο (διαλύματα εργασίας). Εάν η ανώτερη τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο των 1 000 μg/ml είναι μη τοξική, η μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί με νέα δοκιμή κυτταροτοξικότητας. Η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml για υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλυμένες ή σταθερώς διεσπαρμένες σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο.

— για διαλύτη/φορέα DMSO: παρασκευάζονται οκτώ αποθεματικά διαλύματα (οκτώ συγκεντρώσεις), με διαδοχικές αραιώσεις 2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Στη συνέχεια, αυτά τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται 250x σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (διαλύματα εργασίας). Η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 μg/ml, ακόμη κι αν είναι μη τοξική.

Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικά για την έκθεση, με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος εργασίας στον όγκο του εναιωρήματος κυττάρων THP-1 στο τρυβλίο (βλ. επίσης παράγραφο 17) ώστε να πραγματοποιηθεί νέα αραίωση 2x (η τελική κλίμακα συγκεντρώσεων στο τρυβλίο είναι συνήθως 7,81–1 000 μg/ml).

16. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT είναι θρεπτικό μέσο καλλιέργειας [για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερά (βλ. παράγραφο 4) είτε σε θρεπτικό μέσο είτε σε αλατούχο διάλυμα] ή DMSO (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερά σε DMSO) που υποβάλλεται σε δοκιμή σε μία τελική συγκέντρωση 0,2 % στο τρυβλίο. Υποβάλλεται στην ίδια αραίωση που περιγράφεται για τα διαλύματα εργασίας στην παράγραφο 15.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ή τα διαλύματα εργασίας που περιγράφονται στις παραγράφους 15 και 16 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο τρυβλίο επίπεδης βάσης 24 ή 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 12). Στη συνέχεια, τα υπό αγωγή τρυβλία επωάζονται επί 24±0,5 ώρες στους 37°C με 5 % CO_2. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με στεγανοποίηση του τρυβλίου πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (20).

Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI)

18. Μετά από 24±0,5 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται στα σωληνάρια δειγμάτων και συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης. Τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται και τα εναπομείναντα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου με 200 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή 600 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) φωσφορικού αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 0,1 % αλβουμίνης βόειου ορού (ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης). 200 μl κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρονται σε τρυβλίο στρογγυλής βάσης 96 κοιλοτήτων (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή σε μικροσωληνάριο (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) και εκπλένονται δύο φορές με 200 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή 600 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης. Τέλος, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (π.χ. 400 μl) και προστίθεται διάλυμα PI (π.χ. 20 μl) (για παράδειγμα, η τελική συγκέντρωση του PI είναι 0,625 μg/ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, όπως 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD), κυανό του τρυπανίου ή άλλοι δείκτες, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι εναλλακτικές χρώσεις αποδίδουν παρεμφερή με το PI αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1.2.

Μέτρηση κυτταροτοξικότητας μέσω κυτταρομετρίας ροής και εκτίμηση της τιμής CV75

19. Η πρόσληψη του PI αναλύεται με χρήση κυτταρομετρίας ροής με τον δίαυλο καταγραφής FL-3. Καταγράφονται συνολικά 10 000 ζώντα κύτταρα (αρνητικά για PI). Η κυτταρική βιωσιμότητα μπορεί να υπολογίζεται με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης από το πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρόμετρου. Όταν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλή, θα πρέπει να καταγράφονται έως 30 000 κύτταρα, περιλαμβανομένων των νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, μπορούν να καταγράφονται δεδομένα επί ένα λεπτό μετά την έναρξη της ανάλυσης.

$$\textit{βιωσιμότητα} = \frac{\textit{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\textit{συνολικός αριθμός μετρηθέντων κυττάρων}} \times 100$$

Η τιμή CV75 (βλ. παράγραφο 13), δηλαδή η συγκέντρωση από την οποία προκύπτει 75 % επιβίωση κυττάρων THP-1 (25 % κυτταροτοξικότητα), υπολογίζεται μέσω λογαριθμικής-γραμμικής παρεκβολής με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

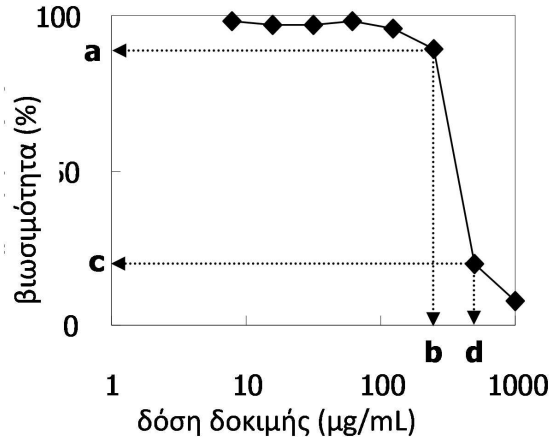
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

όπου:

a είναι η ελάχιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 75 %

c είναι η μέγιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω του 75 %

b και d είναι οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν την τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας a και c αντίστοιχα



Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής CV75, εφόσον αποδεικνύεται ότι δεν έχουν επιπτώσεις στα αποτελέσματα (π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

Μέτρηση έκφρασης των CD86/CD54

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

20. Χρησιμοποιείται ο κατάλληλος διαλύτης/φορέας (αλατούχο διάλυμα, θρεπτικό μέσο ή DMSO, βλ. παράγραφο 14) για τη διάλυση ή τη σταθερή διασπορά των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες αραιώνονται πρώτα στη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο 100πλάσιο (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή το 500πλάσιο (για DMSO) της τιμής 1,2 × CV75 που προσδιορίστηκε στη δοκιμασία προσδιορισμού δόσης (βλ. παράγραφο 19). Εάν δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός της τιμής CV75 (εάν δηλαδή δεν παρατηρείται επαρκής κυτταροτοξικότητα στη δοκιμασία προσδιορισμού δόσης), ως αρχική συγκέντρωση θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη διαλυτή ή σταθερώς διασπειρόμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που παρασκευάζεται με κάθε διαλύτη/φορέα. Επισημαίνεται ότι η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml (σε περίπτωση αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού μέσου) ή τα 1 000 μg/ml (σε περίπτωση DMSO). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 1,2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα προκειμένου να σχηματιστούν τα αποθεματικά διαλύματα [οκτώ συγκεντρώσεις από 100×1,2 × CV75 έως 100×0,335 × CV75 (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή από 500×1,2 × CV75 έως 500×0,335 × CV75 (για DMSO)] που θα υποβληθούν σε δοκιμή με τη μέθοδο h-CLAT (βλ. πρωτόκολλο DB-ALM αριθ. 158 για ένα παράδειγμα δοσολογικού σχήματος). Στη συνέχεια, τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται περαιτέρω 50x (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 250x (για DMSO) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (διαλύματα εργασίας). Αυτά τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικά για την έκθεση με έναν περαιτέρω τελικό συντελεστή αραίωσης 2x στο τρυβλίο. Εάν τα αποτελέσματα δεν πληρούν τα κριτήρια αποδοχής που περιγράφονται στις παραγράφους 29 και 30 αναφορικά με την κυτταρική βιωσιμότητα, η δοκιμασία προσδιορισμού δόσης μπορεί να επαναληφθεί για τον προσδιορισμό της τιμής CV75 με μεγαλύτερη ακρίβεια. Επισημαίνεται ότι για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο τρυβλία 24 κοιλοτήτων.

21. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα παρασκευάζεται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στην παράγραφο 16. Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT είναι το DNCB (βλ. παράγραφο 11), για τον οποίο παρασκευάζονται αποθεματικά διαλύματα σε DMSO, τα οποία αραιώνονται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στην παράγραφο 20. Το DNCB θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 σε μία τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο (συνήθως 4,0 μg/ml). Για την επίτευξη συγκέντρωσης DNCB 4,0 μg/ml στο τρυβλίο, παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα DNCB 2 mg/ml σε DMSO, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω 250x με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας 8 μg/ml. Εναλλακτικά, η τιμή CV75 του DNCB, η οποία προσδιορίζεται σε κάθε εγκατάσταση δοκιμών, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως η συγκέντρωση θετικού μάρτυρα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών. Για τους θετικούς μάρτυρες, η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml (σε περίπτωση αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού μέσου) ή τα 1 000 μg/ml (σε περίπτωση DMSO). Τα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών είναι τα ίδια με τα κριτήρια που περιγράφονται για την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 29), με εξαίρεση το τελευταίο κριτήριο αποδοχής, δεδομένου ότι ο θετικός μάρτυρας υποβάλλεται σε δοκιμή σε μία μοναδική συγκέντρωση.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

22. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα, για την επίτευξη πρόβλεψης απαιτείται η διεξαγωγή ενός πειράματος. Κάθε πείραμα περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 (βλ. παραγράφους 26-28). Κάθε ανεξάρτητη σειρά δοκιμών διεξάγεται σε διαφορετική ημέρα, ή την ίδια ημέρα υπό την προϋπόθεση ότι για κάθε σειρά δοκιμών: α) παρασκευάζονται ανεξάρτητα πρόσφατα αποθεματικά διαλύματα και διαλύματα εργασίας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και διαλύματα αντισωμάτων, και β) χρησιμοποιούνται ανεξαρτήτως συλλεχθέντα κύτταρα (δηλ. τα κύτταρα συλλέγονται από διαφορετικές φιάλες καλλιέργειας)· ωστόσο, τα κύτταρα μπορούν να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες και οι μάρτυρες που παρασκευάζονται ως διαλύματα εργασίας (500 μl) αναμιγνύονται με 500 μl εναιωρηθέντων κυττάρων ($1x10^6$ κύτταρα) σε αναλογία 1:1, και τα κύτταρα επωάζονται επί 24±0,5 ώρες, σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στις παραγράφους 20 και 21. Σε κάθε σειρά δοκιμών αρκεί μία μοναδική δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του μάρτυρα, αφού μια πρόβλεψη λαμβάνεται από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών.

Χρώση και ανάλυση κυττάρων

23. Μετά από 24±0,5 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται από το τρυβλίο 24 κοιλοτήτων σε σωληνάρια δειγμάτων, συλλέγονται με φυγοκέντρηση και, στη συνέχεια, εκπλένονται δύο φορές με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης (μπορούν να γίνουν και άλλες πλύσεις εάν χρειάζεται). Μετά την έκπλυση, τα κύτταρα παρεμποδίζονται με 600 μl παρεμποδιστικού διαλύματος [ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης που περιέχει 0,01 % κ.ό. σφαιρίνη (κλάσμα Cohn II, III, ανθρώπινο, SIGMA, #G2388-10G ή ισοδύναμο)] και επωάζονται στους 4°C επί 15 λεπτά. Μετά την παρεμπόδιση, τα κύτταρα διαχωρίζονται σε τρία κλάσματα 180 μl σε τρυβλίο στρογγυλής βάσης 96 κοιλοτήτων ή μικροσωληνάριο.

24. Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται χρώση των κυττάρων με 50 μl σημασμένου με FITC αντισώματος αντι-CD86 ή αντι-CD54 ή αντισώματος ποντικού IgG1 (ισοτύπου) στους 4°C επί 30 λεπτά. Τα αντισώματα που περιγράφονται στο πρωτόκολλο h-CLAT DB-ALM αριθ. 158 (18) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από αραίωση 3:25 κ.ό. [γιατον

CD86 (BD-PharMingen, #555657, κλώνος: Fun-1)] ή 3:50 κ.ό. [για τον CD54 (DAKO, #F7143, κλώνος: 6.5B5) και το IgG1 (DAKO, #X0927)] με ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης. Οι εν λόγω συντελεστές αραίωσης αντισωμάτων καθορίστηκαν από τους φορείς ανάπτυξης της δοκιμής ως οι συντελεστές που παρέχουν τον βέλτιστο λόγο σήματος προς θόρυβο. Με βάση την εμπειρία των φορέων ανάπτυξης της δοκιμής, η ένταση του φθορισμού των αντισωμάτων είναι συνήθως παρεμφερής μεταξύ των διαφόρων παρτίδων. Ωστόσο, οι χρήστες μπορούν να εξετάσουν το ενδεχόμενο να τιτλοδοτήσουν τα αντισώματα υπό τις συνθήκες του δικού τους εργαστηρίου προκειμένου να καθορίσουν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις προς χρήση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα αντι-CD86 και/ή αντι-CD54, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδουν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των συζευγμένων με FITC αντισωμάτων, για παράδειγμα, μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1.2. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αλλαγή του κλώνου ή του προμηθευτή των αντισωμάτων, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο h-CLAT DB-ALM αριθ. 158 (18), μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Αφού εκπλυθούν δύο φορές με 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (π.χ. 400 μl) και προστίθεται το διάλυμα PI (π.χ. 20 μl για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 0,625 μg/ml) ή άλλο διάλυμα δείκτη κυτταροτοξικότητας (βλ. παράγραφος 18). Τα επίπεδα έκφρασης των CD86 και CD54 αναλύονται με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

25. Η έκφραση των CD86 και CD54 αναλύεται με κυτταρομετρία ροής με τον δίαυλο καταγραφής FL-1. Με βάση τον γεωμετρικό μέσο όρο έντασης φθορισμού (MFI), υπολογίζεται η σχετική ένταση φθορισμού (RFI) των CD86 και CD54 για τα κύτταρα θετικού μάρτυρα (ctrl) και τα υπό αγωγή με τη χημική ουσία κύτταρα σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$RFI = \frac{MFI\ κυττάρων\ υπό\ αγωγή - MFI\ κυττάρων\ ισοτυπικού\ μάρτυρα\ υπό\ αγωγή}{MFI\ κυττάρων/μάρτυρα\ φορέα/διαλύτη - MFI\ κυττάρων/ισοτυπικού\ μάρτυρα\ φορέα/διαλύτη} \times 100$$

Η κυτταρική βιωσιμότητα από τα κύτταρα ισοτυπικού μάρτυρα (ctrl) [που υποβάλλονται σε χρώση με αντισώματα IgG1 (ισοτύπου) ποντικού] υπολογίζεται επίσης σύμφωνα με την εξίσωση που περιγράφεται στην παράγραφο 19.

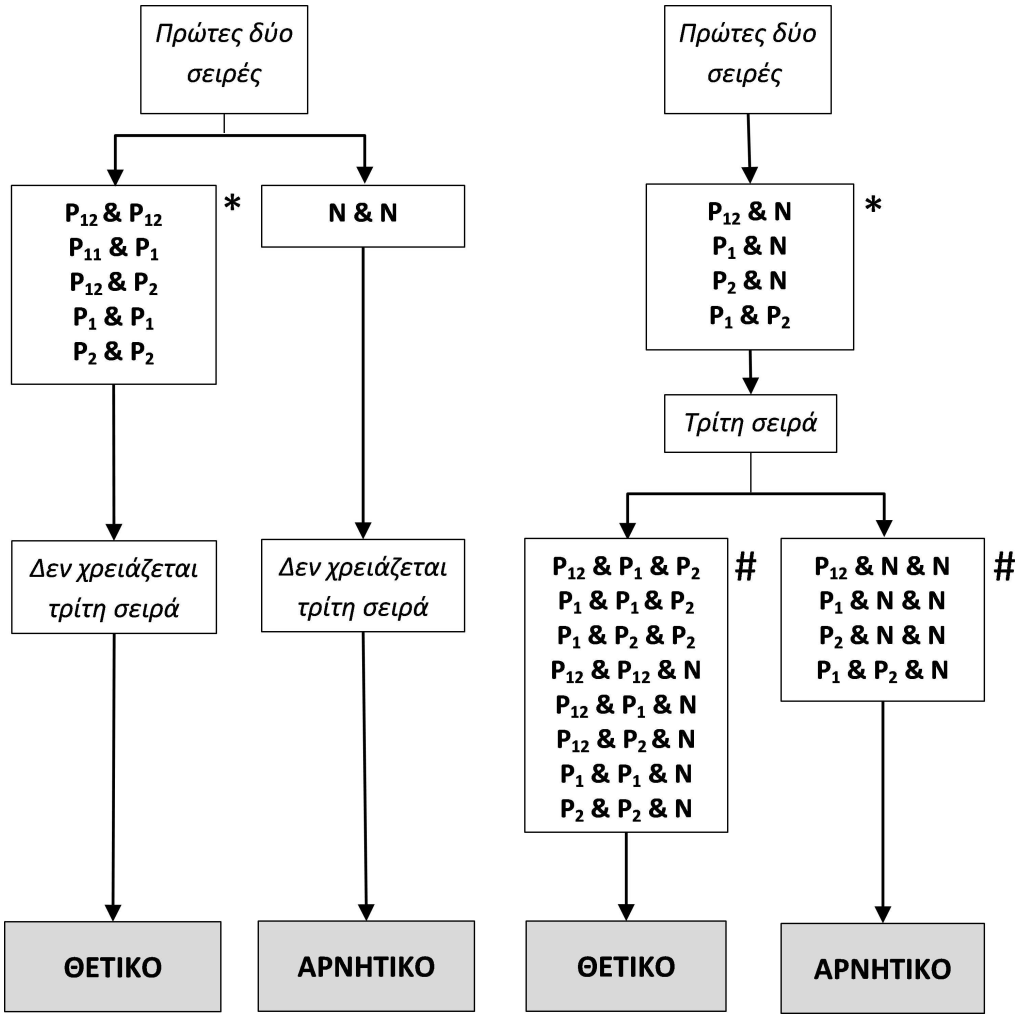
Μοντέλο πρόβλεψης

26. Για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία ελέγχεται σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για να προκύψει μία συγκεκριμένη πρόβλεψη (ΘΕΤΙΚΗ ή ΑΡΝΗΤΙΚΗ). Μια πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ εφόσον πληρούται τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες προϋποθέσεις σε 2 από 2 ή τουλάχιστον σε 2 από 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών, διαφορετικά η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ (σχήμα 1):

— η RFI του CD86 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 150 % σε οποιαδήποτε ελεγχθείσα συγκέντρωση (με κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 50 %),

— η RFI του CD54 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 200 % σε οποιαδήποτε ελεγχθείσα συγκέντρωση (με κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 50 %).

27. Με βάση τα παραπάνω, εάν οι πρώτες δύο σειρές δοκιμών είναι αμφότερες θετικές για τον CD54 και/ή είναι αμφότερες θετικές για τον CD54, η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών. Παρομοίως, εάν οι πρώτες δύο σειρές δοκιμών είναι αρνητικές και για τους δύο δείκτες, η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ (λαμβανομένων δεόντως υπόψη των πληροφοριών στην παράγραφο 30) χωρίς να χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών. Εάν, ωστόσο, οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών δε συμφωνούν για τουλάχιστον έναν από τους δείκτες (CD54 ή CD86), τότε χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών και η τελική πρόβλεψη προκύπτει κατά πλειοψηφία (2 στις 3). Από αυτή την άποψη, θα πρέπει να επισημανθεί ότι εάν διεξάγονται δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών, εκ των οποίων η μία είναι θετική μόνο για τον CD86 (στο εξής αναφερόμενη ως P_1) και η άλλη είναι θετική μόνο για τον CD54 (στο εξής αναφερόμενη ως P_2), απαιτείται η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Εάν η εν λόγω τρίτη σειρά δοκιμών είναι αρνητική και για τους δύο δείκτες (στο εξής αναφερόμενη ως N), η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ. Από την άλλη πλευρά, εάν η τρίτη σειρά δοκιμών είναι θετική για οποιονδήποτε από τους δύο δείκτες (P_1 ή P_2) ή και για τους δύο δείκτες (στο εξής αναφερόμενη ως P_{12}), η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ.



Σχήμα 1: Μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT. Οι προβλέψεις βάσει της μεθόδου h-CLAT θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής.

P_1: σειρά δοκιμών με θετικό μόνο τον CD86· P_2: σειρά δοκιμών με θετικό μόνο τον CD54· P_{12}: σειρά δοκιμών με θετικούς αμφότερους τους CD86 και CD54· N: σειρά δοκιμών χωρίς θετικό ούτε τον CD86 ούτε τον CD54.

* Σε αυτά τα πλαίσια παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών, ανεξαρτήτως της σειράς με την οποία μπορεί να λαμβάνονται.

Σε αυτά τα πλαίσια παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τρεις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο προηγούμενο πλαίσιο, χωρίς, ωστόσο, να αντικατοπτρίζουν τη σειρά με την οποία μπορεί να λαμβάνονται.

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες η πρόβλεψη είναι ΘΕΤΙΚΗ με την h-CLAT, μπορούν να προσδιορίζονται, προαιρετικά, δύο τιμές αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (EC), η τιμή EC150 για τον CD86 και η τιμή EC200 για τον CD54, δηλ. η συγκέντρωση στην οποία οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες επήγαγαν RFI 150 ή 200. Οι εν λόγω τιμές EC μπορούν δυνητικά να συμβάλουν στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (9) όταν χρησιμοποιούνται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA (4) (5) (6) (7) (8). Μπορούν να υπολογιστούν βάσει των ακόλουθων εξισώσεων:

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

όπου:

A_{conc} είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

B_{conc} είναι η υψηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

A_{RFI} είναι η RFI στη χαμηλότερη συγκέντρωση με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

B_{RFI} είναι η RFI στην υψηλότερη συγκέντρωση με RFI < 150 (CD86) ή 200 (CD54)

Για τον υπολογισμό των τιμών των EC150 και EC200 με μεγαλύτερη ακρίβεια, ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή τριών ανεξάρτητων σειρών δοκιμών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54. Στη συνέχεια, οι τελικές τιμές EC150 και EC200 προσδιορίζονται ως η διάμεση τιμή των EC που υπολογίστηκαν από τις τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που μόνο δύο από τις τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών πληρούν τα κριτήρια θετικότητας (βλ. παραγράφους 26-27), υιοθετείται η υψηλότερη EC150 ή EC200 από τις δύο υπολογισθείσες τιμές.

Κριτήρια αποδοχής

29. Όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος h-CLAT, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής (22) (27).

— Οι κυτταρικές βιωσιμότητες του θρεπτικού μέσου και των μαρτύρων με διαλύτη/φορέα θα πρέπει να υπερβαίνουν το 90 %.

— Στον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα, οι τιμές RFI αμφότερων των CD86 και CD54 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα κριτήρια χαρακτηρισμού ως θετικών (CD86 RFI ≥ 150 % και CD54 RFI ≥ 200 %). Οι τιμές RFI του μάρτυρα με διαλύτη/φορέα υπολογίζονται με χρήση του τύπου που περιγράφεται στην παράγραφο 25 [το «MFI χημικής ουσίας» θα πρέπει να αντικατασταθεί από το «MFI διαλύτη/φορέα», και το «MFI διαλύτη/φορέα» θα πρέπει να αντικατασταθεί από το «MFI μάρτυρα (θρεπτικού μέσου)»].

— Για τους μάρτυρες θρεπτικού μέσου και διαλύτη/φορέα, ο λόγος MFI τόσο του CD86 όσο και του CD54 προς τον ισοτυπικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι > 105 %.

— Στον θετικό μάρτυρα (DNCB), οι τιμές RFI για τους CD86 και CD54 θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια θετικότητας (CD86 RFI ≥ 150 και CD54 RFI ≥ 200), και η κυτταρική βιωσιμότητα θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 %.

— Για την υπό δοκιμή χημική ουσία, η κυτταρική βιωσιμότητα θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 % σε τουλάχιστον τέσσερις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις σε κάθε σειρά δοκιμών.

30. Αρνητικά αποτελέσματα είναι αποδεκτά μόνο για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κυτταρική βιωσιμότητα κάτω από 90 % στην υψηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση (δηλ. 1,2 × CV75, σύμφωνα με το σχήμα διαδοχικών αραιώσεων που περιγράφεται στην παράγραφο 20). Εάν η κυτταρική βιωσιμότητα σε 1,2 × CV75 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 90 %, το αρνητικό αποτέλεσμα θα πρέπει να απορρίπτεται. Σε αυτή την περίπτωση, συνιστάται η βελτιστοποίηση των επιλεγμένων δόσεων μέσω επανάληψης του προσδιορισμού της CV75. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όταν ως μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιούνται τα 5 000 μg/ml σε αλατούχο διάλυμα (ή σε θρεπτικό μέσο ή άλλους διαλύτες/φορείς), τα 1 000 μg/ml σε DMSO ή η υψηλότερη διαλυτή συγκέντρωση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι αποδεκτό ακόμη κι αν η κυτταρική βιωσιμότητα υπερβαίνει το 90 %.

Έκθεση δοκιμής

31. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, Log Kow, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Έλεγχοι

Θετικός μάρτυρας

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, Log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη/φορέα

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλου διαλύτη/φορέα εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— περιγραφή της χρησιμοποιηθείσας δοκιμής,

— κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (π.χ. μοντέλο), περιλαμβανομένων των χρησιμοποιηθέντων οργάνων, σφαιρίνης, αντισωμάτων και δεικτών κυτταροτοξικότητας,

— η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου να διεξάγει τη δοκιμή μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας, και η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της διεξαγωγής της δοκιμής, π.χ. ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες και/ή ιστορικά δεδομένα ελέγχων δραστικότητας.

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

— κυτταρική βιωσιμότητα, τιμές MFI και RFI που ελήφθησαν με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές RFI που ελήφθησαν με τον θετικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα όλων των ελεγχθεισών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός σειρών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χρόνος εφαρμογής και έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο),

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— δεδομένα υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένης της CV75 (κατά περίπτωση), των επιμέρους γεωμετρικών τιμών MFI, RFI, των τιμών κυτταρικής βιωσιμότητας, των τιμών EC150/EC200 (κατά περίπτωση) που υπολογίστηκαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά δοκιμών, και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης,

— περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

— εξέταση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη μέθοδο δοκιμών h-CLAT,

— εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμής στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: 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.

(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). Διαθέσιμο στη διεύθυνση: 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 Accessible at: 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. Sci. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Μέρος 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No 168. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Προσάρτημα 1.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (22).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV75: η εκτιμώμενη συγκέντρωση που παρουσιάζει κυτταρική βιωσιμότητα 75 %.

EC150: οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν την τιμή RFI 150 για την έκφραση του CD86

EC200: οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν την τιμή RFI 200 για την έκφραση του CD54

Κυτταρομετρία ροής: κυτταρομετρική τεχνική κατά την οποία κύτταρα εναιωρημένα εντός υγρού διασχίζουν ένα-ένα την εστία μιας φωτεινής δέσμης διέγερσης, η οποία σκεδάζεται με τρόπους χαρακτηριστικούς των κυττάρων και των συστατικών τους· τα κύτταρα σημαίνονται συχνά με φθορίζοντες δείκτες οι οποίοι πρώτα απορροφούν και κατόπιν επανεκπέμπουν το φως σε διαφορετική συχνότητα.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μάρτυρας θρεπτικού μέσου: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Σχετική ένταση φθορισμού (RFI): οι σχετικές τιμές του γεωμετρικού μέσου όρου έντασης φθορισμού (MFI) σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή σε με υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με την MFI σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με διαλύτη/φορέα.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (21).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (21).

Σειρά δοκιμών: η σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (21).

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 0,1 % αλβουμίνη βόειου ορού.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (21).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (23).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη δοκιμή: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (21).

Προσάρτημα 1.2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της μεθόδου h-CLAT για τις 10 συνιστώμενες ουσίες του πίνακα 1, καθώς και τιμές CV75, EC150 και EC200 εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για τουλάχιστον 8 από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Αυτές οι ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων από τις πηγές κινδύνου δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι εμπορικά διαθέσιμες, και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη μέθοδο h-CLAT. Επίσης, για τη μέθοδο h-CLAT υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (3) (14).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη μέθοδο h-CLAT

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Πρόβλεψη *in vivo* (1)	CV75 Πεδίο τιμών αναφοράς σε μg/ml (2)	Αποτελέσματα h-CLAT για τον CD86 (πεδίο τιμών αναφοράς EC150 σε μg/ml) (2)	Αποτελέσματα h-CLAT για τον CD54 (πεδίο τιμών αναφοράς EC200 σε μg/ml) (2)
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	2-12	Θετικό (0,5-10)	Θετικό (0,5-15)
4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	5-95	Θετικό (<40)	Αρνητικό (>1,5) (3)
Θειικό νικέλιο	10101-97-0	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	30-500	Θετικό (<100)	Θετικό (10-100)
2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	30-400	Αρνητικό (>10) (3)	Θετικό (10-140)
R(+)-Λεμονένιο	5989-27-5	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	>20	Αρνητικό (>5) (3)	Θετικό (<250)
Ιμιδαζολιδινυλουρία	39236-46-9	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	25-100	Θετικό (20-90)	Θετικό (20-75)
Ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	>5 000	Αρνητικό (>5 000)	Αρνητικό (>5 000)
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	>5 000	Αρνητικό (>5 000)	Αρνητικό (>5 000)
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	1500-5 000	Αρνητικό (>5 000)	Αρνητικό (>5 000)
4-Αμινοβενζοϊκό οξύ	150-13-0	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	>1 000	Αρνητικό (>1 000)	Αρνητικό (>1 000)

Συντομογραφίες: Αριθμός CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

(1) Η πρόβλεψη για την επικινδυνότητα *in vivo* (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (3) (14). Η *in vivo* ισχύς συνάγεται με εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (24).

(2) Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (13) (25).

(3) Καθώς τα ιστορικά αποτελέσματα για τον εν λόγω δείκτη είναι στην πλειονότητά τους αρνητικά, αναμένεται, κατά βάση, αρνητικό αποτέλεσμα. Το παρεχόμενο πεδίο τιμών καθορίστηκε με βάση τα ελάχιστα ιστορικά θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, η τιμή EC θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός του αναφερθέντος πεδίου τιμών αναφοράς.

Προσάρτημα 2

ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ U937 (U-SENS™)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η δοκιμή U-SENS™ χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στην έκφραση ενός δείκτη της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέεται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) (τον δείκτη CD86), στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος, κατόπιν έκθεσης σε ευαισθητοποιητικά (1). Στη συνέχεια, τα μετρηθέντα επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD86 στην κυτταρική σειρά U937 χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.

2. Η δοκιμή U-SENS™ έχει αξιολογηθεί στο πλαίσιο μελέτης επικύρωσης (2) που συντόνισε η L'Oreal, και υποβλήθηκε σε επακόλουθη αξιολόγηση από ομοτίμους από τη Συμβουλευτική Επιστημονική Επιτροπή (ESAC) του εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα (EURL ECVAM) (3). Αφού έλαβε υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία και τις απόψεις των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, το EURL ECVAM (4) συνέστησε τη χρήση της U-SENS™ στο πλαίσιο ΙΑΤΑ για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση της επικινδυνότητας. Στο έγγραφο καθοδήγησης για την αναφορά των δομημένων προσεγγίσεων αναφορικά με την ολοκλήρωση δεδομένων και τις επιμέρους πηγές πληροφοριών των ΙΑΤΑ για την ευαισθητοποίηση του δέρματος, ο ΟΟΣΑ εξετάζει σειρά περιπτωσιολογικών μελετών που περιγράφουν διάφορες στρατηγικές δοκιμών και μοντέλων πρόβλεψης. Μία από τις διαφορετικές καθορισμένες προσεγγίσεις βασίζεται στη δοκιμασία U-SENS (5). Παραδείγματα της χρήσης των δεδομένων της U-SENS™ σε συνδυασμό με άλλες πληροφορίες, περιλαμβανομένων των ιστορικών δεδομένων και των υπαρχόντων έγκυρων δεδομένων για τον άνθρωπο (6), έχουν επίσης αναφερθεί σε άλλες δημοσιευμένες εργασίες (4) (5) (7).

3. Διαπιστώθηκε ότι η δοκιμή U-SENS™ μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στη χρήση τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η δοκιμή είναι της τάξης του 90 % και του 84 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά, αντίστοιχα (8). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (8) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (1) υποδεικνύουν συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 86 % (N=166), με ευαισθησία 91 % (118/129) και ειδικότητα 65 % (24/37). Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα για τον άνθρωπο, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 77 % (N=101), με ευαισθησία 100 % (58/58) και ειδικότητα 47 % (20/43). Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με την U-SENS™ σε σύγκριση με την LLNA είναι πιθανότερο να προκύπτουν με χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1Β κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) παρά με χημικές ουσίες που εμφανίζουν υψηλή ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1Α κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (1) (8) (9). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της δοκιμής U-SENS™ ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποίησης του δέρματος. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την U-SENS™ ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Βάσει των επί του παρόντος διαθέσιμων δεδομένων, διαπιστώθηκε ότι η δοκιμή U-SENS™ μπορεί να εφαρμόζεται σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες (περιλαμβανομένων των συστατικών καλλυντικών προϊόντων, π.χ. συντηρητικών, επιφανειοδραστικών, δραστικών ουσιών, χρωστικών) που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, φυσικοχημικών ιδιοτήτων, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως καθορίζονται στις *in vivo* μελέτες) καθώς και το φάσμα μηχανισμών αντίδρασης που είναι γνωστό ότι συνδέονται με την ευαισθητοποίηση του δέρματος (δηλ. δέκτης Michael, σχηματισμός βάσης Schiff, παράγοντας μεταφοράς ακυλίου, πυρηνόφιλη διμοριακή υποκατάσταση [SN2], ή πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Η δοκιμή U-SENS™ είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή εναιώρημα στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη/φορέα σε διαφορετικές φάσεις) σε κατάλληλο διαλύτη/φορέα (βλ. παράγραφο 13). Οι χημικές ουσίες του συνόλου δεδομένων που είχαν χαρακτηριστεί αβιοτικά προαπτένια (δηλαδή ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση) ή μεταβολικά προαπτένια (δηλαδή ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) προβλέφθηκαν σωστά με τη δοκιμή U-SENS™ (1) (10). Ουσίες που προκαλούν ρήξη της μεμβράνης μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδοθετικά αποτελέσματα λόγω μη ειδικής αύξησης της έκφρασης τουCD86,

καθώς 3 από τα 7 ψευδοθετικά αποτελέσματα σε σχέση με την *in vivo* ταξινόμηση αναφοράς αφορούσαν επιφανειοδραστικές ουσίες (1). Δεδομένων των παραπάνω, τα θετικά αποτελέσματα με επιφανειοδραστικές ουσίες θα πρέπει να εξετάζονται με επιφύλαξη, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα με τέτοιες ουσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως μη ευαισθητοποιητικής. Παρότι οι φθορίζουσες ουσίες μπορούν να αξιολογηθούν με την U-SENS™ (1), οι ισχυρά φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος με την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) ή το ιωδιούχο προπίδιο (PI) παρεμποδίζουν την ανίχνευση με κυτταρομετρία ροής και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν σωστά με χρήση συζευγμένων με FITC αντισωμάτων (δυνητικά ψευδοαρνητικά) ή PI (μη μετρήσιμη βιωσιμότητα). Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα ή άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα, εφόσον μπορεί να καταδειχθεί ότι παρέχουν ανάλογα αποτελέσματα με τα σημασμένα με FITC αντισώματα ή το PI (βλ. παράγραφο 18), π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Υπό το πρίσμα των ανωτέρω, τα θετικά αποτελέσματα με επιφανειοδραστικές ουσίες και τα αρνητικά αποτελέσματα με ισχυρά φθορίζουσες ουσίες θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η δοκιμή U-SENS™ δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η δοκιμή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

5. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος U-SENS™ υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος, όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της U-SENS™ θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.

6. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή U-SENS™ είναι μια *in vitro* δοκιμασία με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι μεταβολές της έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος, στα κύτταρα U937, μετά από έκθεση 45±3 ωρών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Ο επιφανειακός δείκτης CD86 αποτελεί τυπικό δείκτη ενεργοποίησης των U937. Ο δείκτης CD86 είναι γνωστό ότι αποτελεί συνδιεγερτικό μόριο που μπορεί να μιμείται τη μονοκυτταρική ενεργοποίηση, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στην προδιέγερση των Τ κυττάρων. Οι μεταβολές της έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 μετρώνται με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση των κυττάρων συνήθως με αντισώματα σημασμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC). Ταυτόχρονα, διεξάγεται επίσης μέτρηση της κυτταροτοξικότητας (π.χ. με χρήση PI) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνεται η έκφραση του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Ο δείκτης διέγερσης (S.I.) του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 υπολογίζεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 19) για να υποστηριχθεί η διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

8. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2 σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές *in vitro* μεθόδων (11). Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 15-16), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9. Η παρούσα δοκιμή βασίζεται στο πρωτόκολλο αριθ. 183 της υπηρεσίας βάσης δεδομένων U-SENS™ για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των πειραμάτων σε ζώα (DB-ALM) (12). Κατά την καθιέρωση και τη χρήση της δοκιμής U-SENS™ στο εργαστήριο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP). Μπορεί να χρησιμοποιείται αυτοματοποιημένο σύστημα για τη διεξαγωγή της U-SENS™, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι παράγει ανάλογα αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για τη δοκιμή U-SENS™.

Προπαρασκευή των κυττάρων

10. Για τη διεξαγωγή της δοκιμής U-SENS™ θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος U937 (13). Τα κύτταρα (κλώνος CRL1593.2) θα πρέπει να λαμβάνονται από επαρκώς εξειδικευμένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection.

11. Τα κύτταρα U937 καλλιεργούνται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με ύγρανση και 5 % CO_2 σε θρεπτικό μέσο RPMI-1 640, συμπληρωμένο με 10 % ορού εμβρύων μόσχων (FCS), 2 mM L-γλουταμίνης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης (πλήρες θρεπτικό μέσο). Τα κύτταρα U937 ανακαλλιεργούνται συνήθως κάθε 2-3 ημέρες σε πυκνότητα 1,5 έως 3 × 10^5 κύτταρα/ml αντίστοιχα. Η κυτταρική πυκνότητα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 × 10^6 κύτταρα/ml και η κυτταρική βιωσιμότητα που μετράται με αποκλεισμό της χρωστικής Trypan Blue θα πρέπει να είναι ≥ 90 % (δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται κατά την πρώτη ανακαλλιέργεια μετά την απόψυξη). Πριν από τη χρήση τους στη δοκιμή, θα πρέπει να ελέγχεται εάν κάθε παρτίδα κυττάρων, FCS ή αντισωμάτων πληροί τα κριτήρια μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστικότητας. Ο έλεγχος δραστικότητας των κυττάρων θα πρέπει να διενεργείται με χρήση του θετικού μάρτυρα, του πικρυλοσουλφονικού οξέος (2,4,6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ: TNBS) (αριθ. CAS 2 508-19-2, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (αριθ. CAS 50-21-5, καθαρότητα ≥ 85 %), τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα μετά την απόψυξη. Για τον έλεγχο δραστικότητας, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή έξι τελικές συγκεντρώσεις για καθέναν από τους 2 μάρτυρες (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml και LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). Το TNBS διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο θα πρέπει να δίνει θετική απόκριση του CD86 σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση (π.χ. όταν μια θετική συγκέντρωση, CD86 S.I. ≥ 150, ακολουθείται από συγκέντρωση με αυξανόμενο S.I του CD86), και το LA διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο θα πρέπει να δίνει αρνητική απόκριση του CD86 (βλ. παράγραφο 21). Για τη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο η παρτίδα κυττάρων που έχει υποβληθεί επιτυχώς 2 φορές στον έλεγχο δραστικότητας. Τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται έως επτά εβδομάδες μετά την απόψυξη. Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 21. Ο έλεγχος δραστικότητας θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 18-22.

12. Όσον αφορά τη δοκιμή, τα κύτταρα U937 εμβολιάζονται σε πυκνότητα είτε 3 × 10^5 κύτταρα/ml είτε 6 × 10^5 κύτταρα/ml, και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 2 ημέρες ή επί 1 ημέρα αντίστοιχα. Μπορούν να εφαρμοστούν και συνθήκες προκαλλιέργειας διαφορετικές από εκείνες που περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον αυτό τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά και εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδουν ανάλογα αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Την ημέρα της δοκιμής, κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από την φιάλη καλλιέργειας εναιωρούνται εκ νέου με πρόσφατα παρασκευασθέν θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα 5 × 10^5 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων με 100 μl (τελική κυτταρική πυκνότητα 0,5 × 10^5 κύτταρα/κοιλότητα).

Προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

13. Πριν από τη δοκιμή διεξάγεται αξιολόγηση της διαλυτότητας. Για αυτόν τον σκοπό, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε συγκέντρωση 50 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο, ως πρώτη επιλογή, ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, καθαρότητα ≥ 99 %), ως δεύτερη επιλογή διαλύτη/φορέα εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή στον διαλύτη/φορέα πλήρους θρεπτικού μέσου. Για τη δοκιμή, η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται σε τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο, εφόσον είναι διαλυτή στον συγκεκριμένο διαλύτη/φορέα. Εάν η χημική ουσία είναι διαλυτή μόνο σε DMSO, διαλύεται σε συγκέντρωση 50 mg/ml. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες/φορείς, πέραν των όσων περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον η χρήση τους τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον τελικό διαλύτη/φορέα.

14. Η προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Λόγω του ότι δεν διεξάγεται δοκιμασία προσδιορισμού δόσης, για την πρώτη σειρά δοκιμών θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή 6 τελικές συγκεντρώσεις (1, 10, 20, 50, 100 και 200 μg/ml) στον αντίστοιχο διαλύτη/φορέα, είτε σε πλήρες θρεπτικό μέσο είτε σε DMSO 0,4 % σε θρεπτικό μέσο. Για τις επόμενες σειρές δοκιμών, ξεκινώντας από τα 0,4 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο ή τα 50 mg/ml σε DMSO, παρασκευάζονται διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, τουλάχιστον 4 διαλύματα εργασίας (δηλ. τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις), με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικώς για την αγωγή, με προσθήκη ίσου όγκου εναιωρήματος κυττάρων U937 (βλ. παράγραφο 11 ανωτέρω) στον όγκο του διαλύματος εργασίας στο τρυβλίο ώστε να πραγματοποιηθεί νέα αραίωση 2x (12). Οι συγκεντρώσεις (τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις) για κάθε επόμενη σειρά δοκιμών επιλέγονται με βάση τα επιμέρους αποτελέσματα όλων των προηγούμενων σειρών δοκιμών (8). Οι χρησιμοποιήσιμες τελικές συγκεντρώσεις είναι 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 και 200 μg/ml. Η μέγιστη τελική συγκέντρωση είναι 200 μg/ml. Στην περίπτωση που παρατηρηθεί θετική τιμή του CD86 στο 1 μg/ml, αξιολογείται συγκέντρωση 0,1 μg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που δεν επάγει CD86 άνω του θετικού ορίου. Για κάθε σειρά δοκιμών, υπολογίζεται η EC150 (συγκέντρωση στην οποία μια υπό δοκιμή χημική ουσία φθάνει το θετικό όριο CD86του

150 %, βλ. παράγραφο 19), εφόσον παρατηρηθεί θετική απόκριση του CD86 που σχετίζεται με τη συγκέντρωση. Σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία επάγει θετική απόκριση του CD86 που δεν σχετίζεται με τη συγκέντρωση, μπορεί να μην είναι σκόπιμο να υπολογίζεται η EC150, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο U-SENS™ DB-ALM αριθ. 183 (12). Για κάθε σειρά δοκιμών, υπολογίζεται η CV70 (συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία φθάνει το όριο κυτταροτοξικότητας του 70 %, βλ. παράγραφο 19), όποτε αυτό είναι εφικτό (12). Για τη διερεύνηση της επίδρασης της απόκρισης βάσει συγκέντρωσης λόγω αύξησης του CD86, οποιεσδήποτε από τις κατάλληλες συγκεντρώσεις θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες μεταξύ της EC150 (ή της υψηλότερης αρνητικής μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης του CD86) και της CV70 (ή της υψηλότερης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης, δηλαδή 200 μg/ml). Θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις ανά σειρά δοκιμών, με τουλάχιστον 2 εξ αυτών να είναι κοινές με την προηγούμενη σειρά/-ές δοκιμών, για λόγους σύγκρισης.

15. Ο διαλύτης/φορέας που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™ είναι πλήρες θρεπτικό μέσο (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε πλήρες θρεπτικό μέσο) (βλ. παράγραφο 4) ή DMSO 0,4 % σε πλήρες θρεπτικό μέσο (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε DMSO).

16. Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™ είναι TNBS (βλ. παράγραφο 11), παρασκευαζόμενο σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Το TNBS θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της έκφρασης του CD86 σε μία τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο (50 μg/ml) που δίδει κυτταρική βιωσιμότητα > 70 %. Για την επίτευξη συγκέντρωσης TNBS 50 μg/ml στο τρυβλίο, παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα TNBS 1 M (δηλ. 293 mg/ml) σε πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω 2 930x με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας 100 μg/ml. Ως αρνητικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται γαλακτικό οξύ (LA, CAS 50-21-5) σε 200 μg/ml διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο (από αποθεματικό διάλυμα 0,4 mg/ml). Σε κάθε τρυβλίο κάθε σειράς δοκιμών, παρασκευάζονται τρία πανομοιότυπα δείγματα μάρτυρα πλήρους θρεπτικού μέσου χωρίς αγωγή, μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και αρνητικών και θετικών μαρτύρων (12). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών. Τα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών είναι τα ίδια με εκείνα που περιγράφονται για την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 12).

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα ή τα διαλύματα εργασίας που περιγράφονται στις παραγράφους 14-16 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 12). Στη συνέχεια, τα υπό αγωγή τρυβλία επωάζονται επί 45±3 ώρες στους 37°C με 5 % CO_2. Πριν από την επώαση, τα τρυβλία καλύπτονται με ημιπερατή μεμβράνη ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και η διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των κυττάρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (12).

Χρώση των κυττάρων

18. Μετά από 45±3 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται στο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης σχήματος V και συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης. Η παρεμπόδιση λόγω διαλυτότητας ορίζεται ως παρουσία κρυστάλλων ή σταγόνων ορατών στο μικροσκόπιο μετά την πάροδο 45 ± 3 ωρών από την αγωγή (πριν από τη χρώση των κυττάρων). Τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται και τα εναπομείναντα κύτταρα εκπλένονται μία φορά με 100 μl παγόψυχρου αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) που περιέχει 5 % ορού εμβρύων μόσχων (ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης). Μετά τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης και υποβάλλονται σε χρώση με 5 μl (π.χ. 0,25 μg) σημασμένων με FITC αντισωμάτων αντι-CD86 ή αντισωμάτων IgG1 (ισοτύπου) ποντικού σε θερμοκρασία 4°C επί 30 λεπτά, προστατευμένα από το φως. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα αντισώματα που περιγράφονται στο πρωτόκολλο U-SENS™ DB-ALM αριθ. 183 (12) (για τον CD86: BD-PharMingen #5556 57, κλώνος: Fun-1 ή Caltag/Invitrogen # MHCD8601, κλώνος: BU63, και για το IgG1: BD-PharMingen #5557 48, ή Caltag/Invitrogen # GM4992). Με βάση την εμπειρία των φορέων ανάπτυξης της δοκιμής, η ένταση του φθορισμού των αντισωμάτων είναι συνήθως παρεμφερής μεταξύ των διαφόρων παρτίδων. Για τη δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλος κλώνος ή προμηθευτής των αντισωμάτων που υποβλήθηκαν επιτυχώς στον έλεγχο δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11). Ωστόσο, οι χρήστες μπορούν να εξετάσουν το ενδεχόμενο να τιτλοδοτήσουν τα αντισώματα υπό τις συνθήκες του δικού τους εργαστηρίου προκειμένου να καθορίσουν τη βέλτιστη συγκέντρωση προς χρήση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και άλλο σύστημα ανίχνευσης, π.χ. σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα αντι-CD86, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδει ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των συζευγμένων με FITC αντισωμάτων, για παράδειγμα, μέσω δοκιμών των ουσιώνελέγχου

ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Μετά από έκπλυση δύο φορές με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος και μία φορά με 100 μl παγόψυχρου PBS, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε παγόψυχρο PBS (π.χ. 125 μl για δείγματα που αναλύονται με μη αυτόματο τρόπο, σωληνάριο προς σωληνάριο, ή 50 μl όταν χρησιμοποιείται τρυβλίο αυτόματης δειγματοληψίας) και προστίθεται διάλυμα PI (τελική συγκέντρωση 3 μg/ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, όπως 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD) ή Trypan Blue, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι εναλλακτικές χρώσεις αποδίδουν αποτελέσματα παρεμφερή με το PI, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2.

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

19. Το επίπεδο έκφρασης του CD86 και η κυτταρική βιωσιμότητα αναλύονται με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα κύτταρα αναπαρίστανται σε στικτόγραμμα μεγέθους (FSC) και κοκκίωσης (SSC) ρυθμισμένου σε λογαριθμική κλίμακα προκειμένου να προσδιοριστεί με σαφήνεια ο πληθυσμός σε ένα πρώτο παράθυρο επιλογής R1 και να εξαλειφθούν τα κατάλοιπα κυττάρων. Για κάθε κοιλότητα καταγράφεται συνολικός στόχος 10 000 κυττάρων στο παράθυρο επιλογής R1. Τα κύτταρα από το ίδιο παράθυρο επιλογής R1 αναπαρίστανται σε στικτόγραμμα FL3 ή FL4 / SSC. Τα βιώσιμα κύτταρα ανιχνεύονται με την τοποθέτηση δεύτερου παραθύρου επιλογής R2 για την επιλογή του πληθυσμού των αρνητικών στο ιωδιούχο προπίδιο κυττάρων (δίαυλος FL3 ή FL4). Η κυτταρική βιωσιμότητα μπορεί να υπολογίζεται με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης από το πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρόμετρου. Όταν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλή, μπορούν να καταγράφονται έως 20 000 κύτταρα, περιλαμβανομένων των νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, μπορούν να καταγράφονται δεδομένα επί ένα λεπτό μετά την έναρξη της ανάλυσης.

$$βιωσιμότητα = \frac{αριθμός\ ζωντανών\ κυττάρων}{αριθμός\ ζωντανών\ κυττάρων} \times 100$$

Στη συνέχεια, μετράται το ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων μεταξύ των εν λόγω βιώσιμων κυττάρων που επιλέγονται στο παράθυρο επιλογής R2 (εντός του R1). Η έκφραση κυτταρικής επιφάνειας του CD86 αναλύεται σε στικτόγραμμα FL1 / SSC με επιλογή των βιώσιμων κυττάρων (R2).

Για τις κοιλότητες πλήρους θρεπτικού μέσου/IgG1, ο δείκτης ανάλυσης ορίζεται κοντά στον βασικό πληθυσμό ούτως ώστε οι μάρτυρες με πλήρες θρεπτικό μέσο να έχουν IgG1 εντός της ζώνης στόχου 0,6 έως 0,9 %.

Η παρεμπόδιση λόγω χρώματος ορίζεται ως μετατόπιση του στικτογράμματος της σημασμένης με FITC IgG1 (S.I. γεωμετρικού μέσου IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Ο δείκτης διέγερσης (S.I.) του CD86 για τα κύτταρα μάρτυρες (χωρίς αγωγή ή σε DMSO 0,4 %) και τα υποβληθέντα σε αγωγή κύτταρα υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:.

$$S.I. = \frac{\%\ κυττάρων\ CD86^{+} υπό\ αγωγή - \%\ κυττάρων\ IgG1^{+} υπό\ αγωγή}{\%\ κυττάρων\ CD86^{+} μάρτυρα - \%\ κυττάρων\ IgG1^{+} μάρτυρα} \times 100$$

% των κυττάρων μάρτυρα χωρίς αγωγή $IgG1^{+}$: αναφέρεται ως ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων IgG1 που ορίζεται με τον δείκτη ανάλυσης (αποδεκτό εύρος ≥ 0,6 % και < 1,5 %, βλ. παράγραφο 22) μεταξύ των βιώσιμων κυττάρων χωρίς αγωγή.

% των κυττάρων μάρτυρα / κυττάρων χωρίς αγωγή $IgG1^{+}/CD86^{+}$: αναφέρεται ως ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων IgG1/CD86 που μετρώνται χωρίς μετακίνηση του δείκτη ανάλυσης μεταξύ των βιώσιμων κυττάρων μάρτυρα / κυττάρων χωρίς αγωγή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

20. Στη δοκιμή U-SENS™ υπολογίζονται οι ακόλουθες παράμετροι: Η τιμή CV70, δηλαδή η συγκέντρωση που δίνει 70 % επιβίωση των κυττάρων U937 (30 % κυτταροτοξικότητα), και η τιμή EC150, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες επάγουν δείκτη διέγερσης (S.I.) CD86 150 %.

Η CV70 υπολογίζεται με λογαριθμική-γραμμική παρεκβολή με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

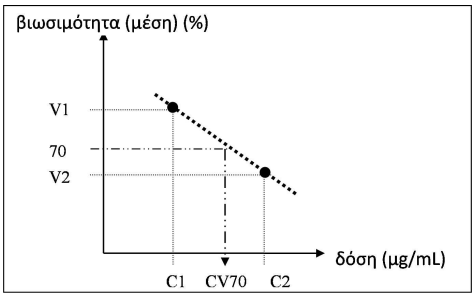
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

όπου:

V1 είναι η ελάχιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 70 %

V2 είναι η μέγιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω του 70 %

C1 και C2 είναι οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν την τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας V1 και V2 αντίστοιχα



Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής CV70, εφόσον αποδεικνύεται ότι δεν έχουν επιπτώσεις στα αποτελέσματα (π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

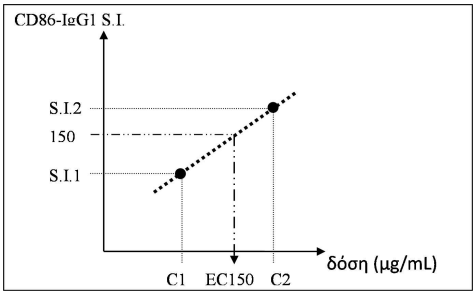
Η EC150 υπολογίζεται με λογαριθμική-γραμμική παρεκβολή με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Όπου:

C1 είναι η υψηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με S.I. του CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με S.I. του CD86 ≥ 150 % (S.I. 2)



Οι τιμές EC150 και CV70 υπολογίζονται

— για κάθε σειρά δοκιμών: οι επιμέρους τιμές EC150 και CV70 χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για τη διερεύνηση της επίδρασης της απόκρισης βάσει συγκέντρωσης από την αύξηση του CD86 (βλ. παράγραφο 14),

— με βάση τις μέσες βιωσιμότητες, προσδιορίζεται η συνολική CV70 (12),

— με βάση τον μέσο S.I. των τιμών CD86, προσδιορίζεται η συνολική EC150 για την υπό δοκιμή χημική ουσία που έχει προβλεφθεί ως ΘΕΤΙΚΗ με τη δοκιμή U-SENS™ (βλ. παράγραφο 21) (12).

Μοντέλο πρόβλεψης

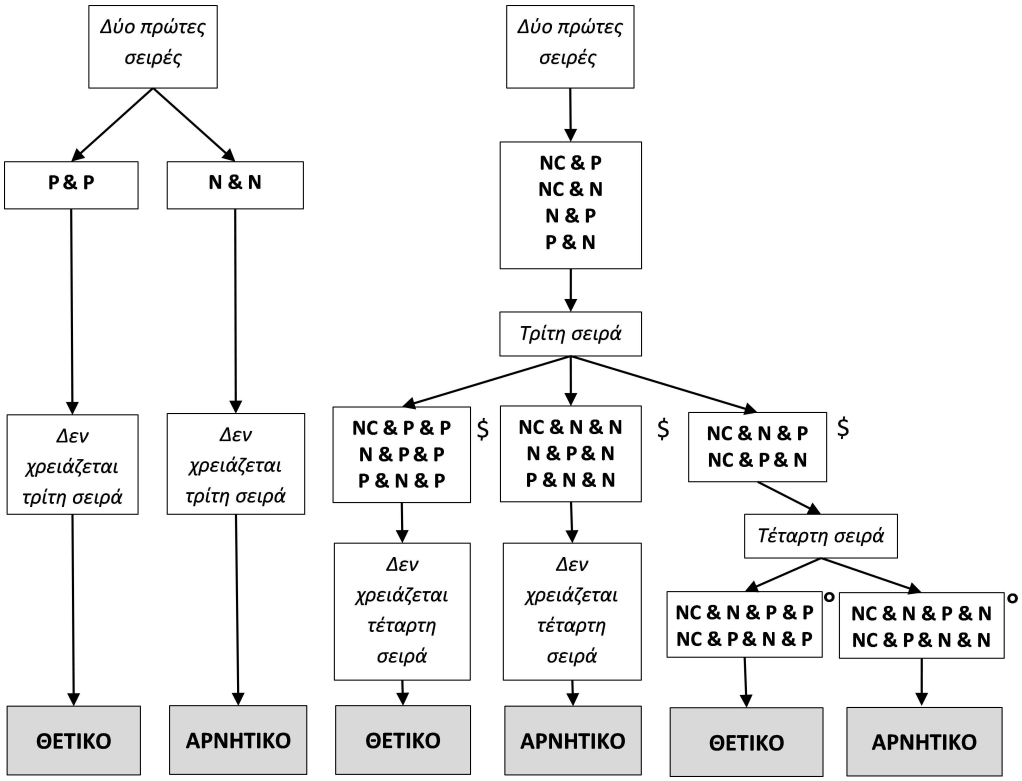
21. Για τη μέτρηση της έκφρασης του CD86, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία ελέγχεται σε τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (που διεξάγονται σε διαφορετική ημέρα) για την πραγματοποίηση μιας μεμονωμένης πρόβλεψης (ΑΡΝΗΤΙΚΗ ή ΘΕΤΙΚΗ).

— Το επιμέρους συμπέρασμα μιας σειράς δοκιμών U-SENS™ θεωρείται αρνητικό (στο εξής αναφέρεται ως Α), εάν ο S.I. του CD86 είναι μικρότερος από 150 % σε όλες τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %) και εάν δεν παρατηρείται καμία παρεμπόδιση (κυτταροτοξικότητα, διαλυτότητα: βλ. παράγραφο 18, ή χρώμα: βλ. παράγραφο 19, ανεξάρτητα από τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις στις οποίες ανιχνεύεται η παρεμπόδιση). Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις: ο S.I. του CD86 είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 150 % και/ή παρατηρούνται παρεμποδίσεις, το επιμέρους συμπέρασμα μιας σειράς δοκιμών U-SENS™ θεωρείται θετικό (στο εξής αναφέρεται ως Θ).

— Μια πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ εάν είναι αρνητικές (Α) τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (σχήμα 1). Εάν οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών είναι και οι δύο αρνητικές (Α), η πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών.

— Μια πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ εάν είναι θετικές (Θ) τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (σχήμα 1). Εάν οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών είναι και οι δύο θετικές (Θ), η πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών.

— Λόγω του ότι δεν διεξάγεται δοκιμασία προσδιορισμού δόσης, υπάρχει μία εξαίρεση σε περίπτωση που, στην πρώτη σειρά δοκιμών, ο S.I. του CD86 είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 150 % μόνο στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση. Τότε, η σειρά δοκιμών θεωρείται ΜΗ ΚΑΤΑΛΗΚΤΙΚΗ (ΜΚ), και θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή πρόσθετες συγκεντρώσεις (μεταξύ της υψηλότερης μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και της χαμηλότερης κυτταροτοξικής συγκέντρωσης - βλ. παράγραφο 20). Σε περίπτωση που μια σειρά δοκιμών χαρακτηριστεί ΜΚ, θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον 2 πρόσθετες σειρές δοκιμών, και μία τέταρτη σε περίπτωση που οι σειρές 2 και 3 δεν συμφωνούν (Α και/ή Θ, ανεξαρτήτως) (σχήμα 1). Οι επακόλουθες σειρές δοκιμών θα θεωρούνται θετικές ακόμη και εάν μία μόνο μη κυτταροτοξική συγκέντρωση δίδει CD86 ίσο ή άνω του 150 %, δεδομένου ότι η τιμή της συγκέντρωσης έχει προσαρμοστεί για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία. Η τελική συγκέντρωση θα βασίζεται στο αποτέλεσμα των τριών ή τεσσάρων επιμέρους σειρών δοκιμών κατά πλειοψηφία (δηλ. 2 από 3 ή 2 από 4) (σχήμα 1).



Σχήμα 1: Το μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™. Οι προβλέψεις βάσει δοκιμής U-SENS™ θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις πληροφορίες στην παράγραφο 4 και στις παραγράφους 7, 8 και 9 της γενικής εισαγωγής.

Ν: δοκιμασία στην οποία δεν παρατηρείται θετικό CD86 ή παρεμπόδιση.

P: δοκιμασία στην οποία παρατηρείται θετικό CD86 και/ή παρεμπόδιση.

NC: μη καταληκτική. Η πρώτη μη καταληκτική σειρά δοκιμών όταν το CD86 είναι θετικό μόνο στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση.

#: εάν χαρακτηριστεί «μη καταληκτική» μόνο η πρώτη σειρά δοκιμών τότε αυτομάτως επιβάλλεται η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών προκειμένου να επιτευχθεί πλειοψηφική αναλογία θετικών (P) ή αρνητικών (N) συμπερασμάτων σε τουλάχιστον 2 από 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών.

$: στα πλαίσια αυτά παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τρεις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο προηγούμενο πλαίσιο.

°: στα πλαίσια αυτά παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τέσσερις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις τρεις πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο προηγούμενο πλαίσιο.

Κριτήρια αποδοχής

22. Όταν χρησιμοποιείται η δοκιμή U-SENS™, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής (12).

— Στο τέλος της περιόδου έκθεσης 45±3 ωρών, η μέση βιωσιμότητα των εις τριπλούν επιστρωμένων κυττάρων U937 χωρίς αγωγή θα πρέπει να είναι > 90 %, χωρίς να παρατηρείται ολίσθηση της έκφρασης CD86. Η βασική έκφραση του CD86 στα κύτταρα U937 χωρίς αγωγή θα πρέπει να είναι ≥ 2 % και ≤ 25 %.

— Όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται DMSO, η εγκυρότητα του μάρτυρα με φορέα DMSO εκτιμάται μέσω υπολογισμού τιμής S.I. για το DMSO σε σύγκριση με τα κύτταρα χωρίς αγωγή, και η μέση βιωσιμότητα των επιστρωμένων εις τριπλούν κυττάρων πρέπει να είναι > 90 %. Ο μάρτυρας με φορέα DMSO είναι έγκυρος εάν η μέση τιμή S.I. του CD86 εις τριπλούν είναι μικρότερη από το 250 % της μέσης τιμής S.I. του CD86 εις τριπλούν των κυττάρων U937 χωρίς αγωγή.

— Οι σειρές δοκιμών θεωρούνται έγκυρες εάν τουλάχιστον δύο από τρεις τιμές IgG1 κυττάρων U937 χωρίς αγωγή είναι ≥ 0,6 % και < 1,5 %.

— Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας (γαλακτικό οξύ) θεωρείται έγκυρος εάν τουλάχιστον δύο από τα τρία πανομοιότυπα δείγματα είναι αρνητικά (S.I. CD86 < 150 %) και χωρίς κυτταροτοξικότητα (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %).

— Ο θετικός μάρτυρας (TNBS) θεωρείται έγκυρος εάν τουλάχιστον δύο από τα τρία πανομοιότυπα δείγματα είναι θετικά (S.I. CD86 < 150 %) και χωρίς κυτταροτοξικότητα (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %).

Έκθεση δοκιμής

23. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη/φορέα

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλου διαλύτη/φορέα εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— περιγραφή της χρησιμοποιούμενης δοκιμής,

— κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (π.χ. μοντέλο), περιλαμβανομένων των χρησιμοποιηθέντων οργάνων, αντισωμάτων και δεικτών κυτταροτοξικότητας,

— η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου να διεξάγει τη δοκιμή μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας, και η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της διεξαγωγής της δοκιμής, π.χ. ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες και/ή ιστορικά δεδομένα ελέγχων δραστικότητας.

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

— κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές S.I. CD86 που ελήφθησαν με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές S.I. που ελήφθησαν με τον θετικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,

— κυτταρική βιωσιμότητα όλων των ελεγχθεισών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός σειρών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χρόνος εφαρμογής και έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο),

— διάρκεια της έκθεσης,

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— δεδομένα υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένης της CV70 (κατά περίπτωση), του S.I., των τιμών κυτταρικής βιωσιμότητας, των τιμών EC150 (κατά περίπτωση) που υπολογίστηκαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά δοκιμών, και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσία σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης,

— περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

— εξέταση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη δοκιμή U-SENS™,

— εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμής στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: 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 EL· doi 10.2 787/8157 37. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [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 EL· doi 10.2 760/5889 55. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [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). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: .[http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/]

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Μέρος 1: Series on Testing and Assessment No. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Προσάρτημα 2.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (15).

Απόκριση συγκέντρωσης CD86: η απόκριση εξαρτάται από τη συγκέντρωση (απόκριση συγκέντρωσης) όταν μια θετική συγκέντρωση (S.I. CD86 ≥ 150) ακολουθείται από συγκέντρωση με αυξανόμενο S.I. CD86.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV70: η εκτιμώμενη συγκέντρωση που παρουσιάζει κυτταρική βιωσιμότητα 70 %.

Ολίσθηση: ολίσθηση υφίσταται όταν i) η διορθωμένη τιμή %$CD86^+$ του πανομοιότυπου δείγματος 3 του μάρτυρα χωρίς αγωγή είναι μικρότερη από το 50 % του μέσου όρου της διορθωμένης τιμής %$CD86^+$ των πανομοιότυπων δειγμάτων 1 και 2 του μάρτυρα χωρίς αγωγή, και όταν ii) η διορθωμένη τιμή %$CD86^+$ του πανομοιότυπου δείγματος 3 του αρνητικού μάρτυρα είναι μικρότερη από το 50 % του μέσου όρου της διορθωμένης τιμής %$CD86^+$ των πανομοιότυπων δειγμάτων 1 και 2 του αρνητικού μάρτυρα.

EC150: οι εκτιμώμενες συγκεντρώσεις που εμφανίζουν S.I. 150 % της έκφρασης του CD86.

Κυτταρομετρία ροής: κυτταρομετρική τεχνική κατά την οποία κύτταρα εναιωρημένα εντός υγρού διασχίζουν ένα-ένα την εστία μιας φωτεινής δέσμης διέγερσης, η οποία σκεδάζεται με τρόπους χαρακτηριστικούς των κυττάρων και των συστατικών τους· τα κύτταρα σημαίνονται συχνά με φθορίζοντες δείκτες οι οποίοι πρώτα απορροφούν και κατόπιν επανεκπέμπουν το φως σε διαφορετική συχνότητα.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού, π.χ. μέσω οξείδωσης.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (14).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (14).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και με θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (14).

S.I.: δείκτης διέγερσης. Οι σχετικές τιμές του γεωμετρικού μέσου όρου έντασης φθορισμού σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με διαλύτη/φορέα.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας της δοκιμής με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμής (14).

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 5 % ορού εμβρύων μόσχων.

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας δοκιμής.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (16).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη δοκιμή: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (14).

Προσάρτημα 2.2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της δοκιμής U-SENS™ για τις 10 συνιστώμενες ουσίες στον πίνακα 1, καθώς και τιμές CV70 και EC150 εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για 8 τουλάχιστον από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Αυτές οι ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων από τις πηγές κινδύνου δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη δοκιμή U-SENS™. Επίσης, για τη δοκιμή U-SENS™ υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (1) (8).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη δοκιμή U-SENS™

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	*Πρόβλεψη* in vivo [1]	U-SENS Διαλύτης/φορέας	U-SENS Πεδίο τιμών αναφοράς CV70 σε μg/ml [2]	U-SENS Πεδίο τιμών αναφοράς EC150 σε μg/ml [2]
4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο [3]	<30	Θετικό (≤10)
Πικρυλοσουλφονικό οξύ	2508-19-2	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>50	Θετικό (≤50)
Μηλεϊνικό διαιθύλιο	141-05-9.	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	DMSO	10-100	Θετικό (≤20)
Ρεσορκινόλη	108-46-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>100	Θετικό (≤50)
Κινναμωμική αλκοόλη	104-54-1	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	DMSO	>100	Θετικό (10-100)
4-Αλλυλανισόλη	140-67-0	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	DMSO	>100	Θετικό (<200)
Σακχαρίνη	81-07-2	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	DMSO	>200	Αρνητικό (>200)
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>200	Αρνητικό (>200)
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>200	Αρνητικό (>200)
Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	DMSO	>200	Αρνητικό (>200)

Συντομογραφίες: Αριθμός CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

(1) Η πρόβλεψη για την επικινδυνότητα *in vivo* (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (1) (8). Η *in vivo* ισχύς προκύπτει με χρήση των κριτηρίων που προτείνει το ECETOC (17).

(2) Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (1) (8).

(3) Πλήρες θρεπτικό μέσο: θρεπτικό μέσο RPMI-1640, συμπληρωμένο με 10 % ορού εμβρύων μόσχων, 2 mM L-γλουταμίνης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης (8).

Προσάρτημα 3

IN VITRO ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ IL-8 LUC

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Σε αντίθεση με τις δοκιμασίες που αναλύουν την έκφραση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας, η δοκιμασία IL8-Luc προσδιορίζει ποσοτικά τις αλλαγές στην έκφραση της IL-8, μιας κυτταροκίνης που συνδέεται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DC). Στην κυτταρική σειρά έκφρασης γονιδίου αναφοράς IL-8 που προέκυψε από την THP-1 (THP-G8, που δημιουργήθηκε από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά οξείας μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1), η έκφραση της IL-8 μετράται μετά από έκθεση σε ευαισθητοποιητικές ουσίες (1). Στη συνέχεια, η έκφραση της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.

2. Η δοκιμασία IL-8 Luc έχει αξιολογηθεί στο πλαίσιο μελέτης επικύρωσης (2) που διεξήγαγε το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM), το ιαπωνικό **Υπουργείο Οικονομίας, Εμπορίου και Βιομηχανίας** (METI), και η Ιαπωνική Εταιρεία Εναλλακτικών Μεθόδων προς τα Πειράματα σε Ζώα (JSAAE), και η οποία υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους (3) υπό την αιγίδα του JaCVAM και του ιαπωνικού Υπουργείου Υγείας, Εργασίας και Κοινωνικής Πρόνοιας (MHLW), με την υποστήριξη της **Διεθνούς Συνεργασίας για τις Εναλλακτικές Μεθόδους Δοκιμών** (ICATM). Λαμβανομένου υπόψη του συνόλου των διαθέσιμων στοιχείων και των απόψεων των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, η δοκιμασία IL-8 Luc θεωρείται χρήσιμη στο πλαίσιο IATA για τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση επικινδυνότητας. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων δοκιμασίας IL-8 Luc σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (4) (5) (6).

3. Η δοκιμασία IL-8 Luc αποδείχθηκε ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στην κυτταροκαλλιέργεια και τη μέτρηση λουσιφεράσης. Η αναπαραγωγιμότητα εντός και μεταξύ των εργαστηρίων ήταν 87,7 % και 87,5 %, αντίστοιχα (2). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (2) και άλλες δημοσιευμένες εργασίες (1) (6) δείχνουν ότι, σε σύγκριση με την LLNA, με τη δοκιμασία IL-8 Luc 118 από τις 143 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 25 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας IL-8 Luc όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών (καμία κατηγορία κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) είναι 86 % (101/118), με ευαισθησία 96 % (92/96) και ειδικότητα 41 % (9/22). Με εξαίρεση τις ουσίες που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής όπως περιγράφεται κατωτέρω (παράγραφος 5), με τη δοκιμασία IL-8 Luc 113 από τις 136 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 23 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας IL-8 Luc είναι 89 % (101/113), με ευαισθησία 96 % (92/96) και ειδικότητα 53 % (9/17). Με χρήση δεδομένων για τον άνθρωπο από τους Urbisch et al. (7), με τη δοκιμασία IL-8 Luc 76 από τις 90 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 14 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας είναι 80 % (61/76), η ευαισθησία 93 % (54/58) και η ειδικότητα 39 % (7/18). Με εξαίρεση τις ουσίες που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής της, με τη δοκιμασία IL-8 Luc 71 από τις 84 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 13 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας είναι 86 % (61/71) με ευαισθησία 93 % (54/58) και ειδικότητα 54 % (7/13). Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με τη δοκιμασία IL-8 Luc αφορούν πιθανότατα χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) παρά ουσίες με υψηλή ισχύ (υποκατηγορία 1A κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP) (6). Συνολικά, τα στοιχεία υποστηρίζουν τον ρόλο της δοκιμασίας IL-8 Luc στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποίησης του δέρματος. Οι τιμές ορθότητας που παρέχονται για τη δοκιμασία IL-8 Luc ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η δοκιμασία IL-8 Luc είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως προσδιορίζονται σε μελέτες *in vivo*) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (2) (6).

5. Παρότι στη δοκιμασία IL-8 Luc χρησιμοποιείται ως διαλύτης το X-VIVO™ 15, με τη δοκιμασία IL-8 Luc αξιολογήθηκαν σωστά χημικές ουσίες με Log K_{ow} >3,5 καθώς και χημικές ουσίες με διαλυτότητα γύρω στα 100 μg/ml, όπως υπολογίστηκε με το EPI Suite™, ενώ οι επιδόσεις της όσον αφορά την ανίχνευση ευαισθητοποιητικών ουσιών με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα είναι καλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες της δοκιμασίας IL-8 Luc με χρήση διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ως διαλύτη (2). Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε 20 mg/ml ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα ψευδοαρνητικά αποτελέσματα, λόγω της μη διαλυτότητάς τους στο X-VIVO™ 15. Ως εκ τούτου, τα αρνητικά αποτελέσματα για τις εν λόγω χημικές ουσίες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Στη μελέτη επικύρωσης διαπιστώθηκε υψηλό ποσοστό ψευδοαρνητικών αποτελεσμάτων για τους ανυδρίτες. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς (8) και των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτένια (ουσίες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση) και τα αβιοτικά προαπτένια (ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση από τον αέρα) ενδέχεται να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα στη δοκιμασία. Ωστόσο, αν και τα αρνητικά αποτελέσματα για τα μεταβολικά/αβιοτικά προαπτένια για τα οποία υπάρχουν οι σχετικές υπόνοιες θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη, με τη δοκιμασία IL-8 Luc κρίθηκαν σωστά 11 από 11 αβιοτικά προαπτένια, 6/6 μεταβολικά προαπτένια, και 6/8 αβιοτικά/μεταβολικά προαπτένια στο σύνολο δεδομένων της δοκιμασίας IL-8 Luc (2). Με βάση την πρόσφατη ολοκληρωμένη επισκόπηση τριών δοκιμών χωρίς χρήση ζώων (της DPRA, της KeratinoSens™ και της h-CLAT) ως προς την ικανότητά τους να ανιχνεύουν τα αβιοτικά και μεταβολικά προαπτένια (9), και βάσει του γεγονότος ότι τα κύτταρα THP-G8 που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία IL-8 Luc αποτελούν κυτταρική σειρά που προκύπτει από την THP-1 που χρησιμοποιείται στην h-CLAT, η δοκιμασία IL-8 Luc μπορεί επίσης να συμβάλει, σε συνδυασμό με άλλες δοκιμές, στην ενίσχυση της ευαισθησίας των δοκιμών χωρίς χρήση ζώων όσον αφορά την ανίχνευση των αβιοτικών και μεταβολικών προαπτενίων. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα έδωσαν (ψευδο)θετικά αποτελέσματα, ανεξάρτητα από το είδος τους (π.χ. κατιονικές, ανιονικές ή μη ιονικές). Τέλος, οι χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη λουσιφεράση μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση ως προς τη δράση/μέτρησή της, προκαλώντας είτε φαινομενική αναστολή είτε αυξημένη φωταύγεια (10). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ανώτερες του 1 μM παρεμπόδιζαν τα σήματα φωταύγειας σε άλλες δοκιμασίες με λουσιφεράση ως γονίδιο αναφοράς, λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εξετάζεται με προσοχή η έκφραση της λουσιφεράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλούν ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης ανάλογη με εκείνη που οφείλεται στα φυτοοιστρογόνα (11). Με βάση τα παραπάνω, τα επιφανειοδραστικά, οι ανυδρίτες και οι χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη λουσιφεράση δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας δοκιμασίας. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η δοκιμασία IL-8 Luc δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η δοκιμή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

6. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος IL-8 Luc υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Για να προσδιοριστεί το κατά πόσον τα αποτελέσματα της IL-8 Luc μπορούν να συμβάλουν στην εκτίμηση της ισχύος, όταν αυτή πραγματοποιείται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών, απαιτούνται περαιτέρω εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο.

7. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 3.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Στη δοκιμασία IL-8 Luc γίνεται χρήση ανθρώπινης κυτταρικής σειράς μονοκυτταρικής λευχαιμίας, της THP-1, η οποία ελήφθη από τη συλλογή American Type Culture Collection (Manassas, VA, ΗΠΑ). Με χρήση της εν λόγω κυτταρικής σειράς, το τμήμα δερματολογίας της ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου του Tohoku δημιούργησε μια κυτταρική σειρά γονιδίου αναφοράς IL-8 προερχόμενη από την THP-1, την THP-G8, η οποία φέρει τα γονίδια σταθερής λουσιφεράσης πορτοκαλί χρώματος (SLO) και σταθερής λουσιφεράσης κόκκινου χρώματος (SLR) υπό τον έλεγχο των υποκινητών της IL-8 και της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (GAPDH) αντίστοιχα (1). Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της επαγωγής του γονιδίου λουσιφεράσης μέσω ανίχνευσης της φωταύγειας από καθιερωμένα φωταυγή υποστρώματα λουσιφεράσης ως δείκτη της δραστικότητας της IL-8 και της GAPDH στα κύτταρα μετά από έκθεση σε ευαισθητοποιητικές χημικές ουσίες.

9. Το σύστημα δοκιμασίας δύο χρωμάτων περιλαμβάνει λουσιφεράση που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα (SLO, λmax = 580 nm) (12) για τη γονιδιακή έκφραση του υποκινητή IL-8, και λουσιφεράση που εκπέμπει κόκκινο χρώμα (SLR, λmax = 630 nm) (13) για τη γονιδιακή έκφραση του υποκινητή εσωτερικού μάρτυρα, GAPDH. Οι δύο λουσιφεράσες εκπέμπουν διαφορετικά χρώματα όταν αντιδρούν με την d-λουσιφερίνη της πυγολαμπίδας και η φωταύγειά τους μετράται ταυτόχρονα σε αντίδραση ενός σταδίου, μέσω διαχωρισμού του φωτός που εκπέμπεται από το μείγμα της δοκιμασίας με χρήση οπτικού φίλτρου (14) (προσάρτημα 3.2).

10. Τα κύτταρα THP-G8 υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία επί 16 ώρες και, στη συνέχεια, μετράται η δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO (SLO-LA) που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8 και η δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR (SLR-LA) που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH. Προκειμένου να διευκολυνθεί η κατανόηση των συντομογραφιών, τα SLO-LA και SLR-LA αναφέρονται ως IL8LA και GAPLA αντίστοιχα. Στον πίνακα 1 παρέχεται περιγραφή των όρων που σχετίζονται με τη δραστικότητα της λουσιφεράσης στη δοκιμασία IL-8 Luc. Οι μετρηθείσες τιμές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της κανονικοποιημένης IL8LA (nIL8LA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο IL8LA προς GAPLA· της επαγωγής της nIL8LA (Ind-IL8LA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο των αριθμητικών μέσων όρων των εις τετραπλούν μετρηθεισών τιμών της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία προς τις τιμές της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή· και της αναστολής της GAPLA (Inh-GAPLA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο των αριθμητικών μέσων όρων των εις τετραπλούν μετρηθεισών τιμών της GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία προς τις τιμές της GAPLA των κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταροτοξικότητας.

Πίνακας 1

Περιγραφή των όρων που σχετίζονται με τη δράση της λουσιφεράσης στη δοκιμασία IL-8 Luc

Συντομογραφίες	Ορισμός
GAPLA	δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH
IL8LA	δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες / nIL8LA κυττάρων χωρίς αγωγή
Inh-GAPLA	GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες / GAPLA κυττάρων χωρίς αγωγή
CV05	η χαμηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στην οποία η Inh-GAPLA καθίσταται < 0,05.

11. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (PS) (15) που διευκολύνουν την επικύρωση των τροποποιημένων *in vitro* δοκιμών λουσιφεράσης IL-8 που είναι παρεμφερείς με τη δοκιμασία IL-8 Luc και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών 442E του ΟΟΣΑ, ούτως ώστε να τις συμπεριλάβει. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων (Mutual Acceptance of Data/MAD) του ΟΟΣΑ είναι διασφαλισμένη μόνο για δοκιμές που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων, εφόσον αυτές έχουν κριθεί από τον ΟΟΣΑ και έχουν περιληφθεί στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 442E (16).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

12. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 3.3 σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές *in vitro* μεθόδων (17). Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 15) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 21-24), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

13. Υπάρχει διαθέσιμη τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) για τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη διεξαγωγή της (18). Τα εργαστήρια που επιθυμούν να διεξάγουν τη δοκιμή μπορούν ναπρομηθευτούν

την ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά THP-G8 από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία, κατόπιν υπογραφής συμφωνίας μεταφοράς υλικού (ΣΜΥ) σύμφωνα με τις προϋποθέσεις του υποδείγματος του ΟΟΣΑ. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες της δοκιμασίας.

Προπαρασκευή των κυττάρων

14. Για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας IL-8 Luc θα πρέπει να χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά THP-G8 από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία (βλ. παραγράφους 8 και 13). Κατά την παραλαβή, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (2 έως 4 ανακαλλιέργειες) και φυλάσσονται στην κατάψυξη ως ομοιογενές απόθεμα. Τα κύτταρα του αποθέματος αυτού μπορούν να πολλαπλασιάζονται μέχρι και επί 12 ανακαλλιέργειες ή επί 6 εβδομάδες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό είναι το RPMI-1 640 που περιέχει 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνης G, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης και 0,25 μg/ml αμφοτερικίνης B σε αλατούχο διάλυμα 0,85 %) (π.χ. GIBCO αρ. κατ. 15 240-062), 0,15 μg/ml πουρομυκίνης (π.χ. CAS:58-58-2) και 300 μg/ml G418 (π.χ. CAS:108 321-42-2).

15. Πριν από τη χρήση τους στη δοκιμή, θα πρέπει να ελέγχεται εάν τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστικότητας. Ο εν λόγω έλεγχος θα πρέπει να διεξάγεται 1-2 εβδομάδες ή 2-4 ανακαλλιέργειες μετά την απόψυξη, με χρήση του θετικού μάρτυρα 1-βρωμομεθυλο-4-νιτροβενζόλιο (4-NBB) (CAS:100-11-8, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (CAS:50-21-5, καθαρότητα ≥ 85 %). Το 4-NBB θα πρέπει να επάγει θετική απόκριση στην Ind-IL8LA (≥1,4), ενώ το LA θα πρέπει να επάγει αρνητική απόκριση στην Ind-IL8LA (<1,4). Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται μόνο τα κύτταρα που έχουν υποβληθεί επιτυχώς στον έλεγχο δραστικότητας. Ο έλεγχος θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 22-24.

16. Για τη δοκιμή, τα κύτταρα THP-G8 εμβολιάζονται σε πυκνότητα 2 έως 5 × 10^5 κύτταρα/ml και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 48 έως 96 ώρες. Την ημέρα διεξαγωγής της δοκιμής, τα κύτταρα που συλλέγονται από τη φιάλη καλλιέργειας εκπλένονται με RPMI-1 640 που περιέχει 10 % FBS χωρίς αντιβιοτικά και, στη συνέχεια, επαναιωρούνται με RPMI-1 640 που περιέχει 10 % FBS χωρίς αντιβιοτικά σε πυκνότητα 1 × 10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (π.χ. Costar αρ. κατ. 3603) με 50 μl (5 × 10^4 κύτταρα/κοιλότητα).

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Η παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για τη δοκιμασία IL-8 Luc, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε X-VIVO™ 15, ένα θρεπτικό μέσο του εμπορίου χωρίς ορό (Lonza, 04-418Q), σε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml. Προστίθεται X-VIVO™ 15 σε 20 mg της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανεξάρτητα από τη διαλυτότητα της χημικής ουσίας) σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης και συμπληρώνεται μέχρι όγκου 1 ml και, στη συνέχεια, το διάλυμα περιδινείται έντονα και ανακινείται σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα 8 σ.α.λ. επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20°C περίπου. Επιπλέον, σε περίπτωση στερεών χημικών ουσιών που εξακολουθούν να μη διαλύονται, το σωληνάριο υποβάλλεται σε υπερήχηση μέχρις ότου η χημική ουσία διαλυθεί πλήρως ή διασπαρεί σταθερά. Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, το διάλυμα αραιώνεται 5 φορές με X-VIVO™ 15 και χρησιμοποιείται ως αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (4 mg/ml). Για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, το μείγμα περιστρέφεται εκ νέου επί τουλάχιστον 30 λεπτά, και, στη συνέχεια, φυγοκεντρείται στις 15000 σ.α.λ. (≈20000*g*) επί 5 λεπτά· το προκύπτον υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται ως αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η χρήση άλλων διαλυτών, όπως DMSO, νερού, ή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, θα πρέπει να τεκμηριώνεται επιστημονικά. Η αναλυτική διαδικασία για τη διάλυση χημικών ουσιών φαίνεται στο προσάρτημα 3.5. Τα διαλύματα X-VIVO™ 15 που περιγράφονται στις παραγράφους 18-23 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 16).

18. Ο σκοπός της πρώτης σειράς δοκιμών είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και η εξέταση της ισχύος δερματικής ευαισθητοποίησης των χημικών ουσιών. Με χρήση X-VIVO™ 15, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις των αποθεματικών διαλυμάτων X-VIVO™ 15 των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με συντελεστή αραίωσης 2 (βλ. προσάρτημα 3.5) και με χρήση τρυβλίου δοκιμασίας 96 κοιλοτήτων (π.χ. Costar αρ. κατ. EW-01729-03). Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl/κοιλότητα αραιωμένου διαλύματος σε 50 μl του εναιωρήματος κυττάρων σε μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων. Έτσι, για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, οι τελικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών κυμαίνονται από 0,002 έως 2 mg/ml (προσάρτημα 3.5). Για υπό δοκιμή ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml, ορίζονται μόνο συντελεστές αραίωσης από 2 έως 2^{10}, παρότι οι πραγματικές τελικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών παραμένουν αμφίβολες και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση κορεσμού των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15.

19. Σε επακόλουθες σειρές δοκιμών (δεύτερο, τρίτο και τέταρτο πανομοιότυπο δείγμα), το αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 4 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση κυτταρικής βιωσιμότητας 05 (CV05, η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία η Inh-GAPLA καθίσταται < 0,05) στο πρώτο πείραμα. Εάν η Inh-GAPLA δεν μειωθεί κάτω από 0,05 στην υψηλότερη συγκέντρωση κατά την πρώτη σειρά δοκιμών, το αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 παρασκευάζεται στην υψηλότερη συγκέντρωση της πρώτης σειράς δοκιμών. Η συγκέντρωση της CV05 υπολογίζεται διαιρώντας τη συγκέντρωση του αποθεματικού διαλύματος στην πρώτη σειρά δοκιμών με συντελεστή αραίωσης για την CV05 (X) [συντελεστής αραίωσης CV05 (X)· ο συντελεστής αραίωσης που απαιτείται για την αραίωση του αποθεματικού διαλύματος στην CV05] (βλ. προσάρτημα 3.5). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO σε 20 mg/ml, η CV05 προσδιορίζεται βάσει της συγκέντρωσης του αποθεματικού διαλύματος × 1/X. Για τις σειρές δοκιμών 2 έως 4, παρασκευάζεται δεύτερο αποθεματικό διάλυμα ως 4 × CV05 (προσάρτημα 3.5).

20. Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις των δεύτερων αποθεματικών διαλυμάτων X-VIVO™ 15 με συντελεστή αραίωσης 1,5, με χρήση τρυβλίου δοκιμασίας 96 κοιλοτήτων. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl/κοιλότητα αραιωμένου διαλύματος σε 50 μl του εναιωρήματος κυττάρων στο μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων. Κάθε συγκέντρωση κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Στη συνέχεια, τα μείγματα αναμιγνύονται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζονται επί 16 ώρες στους 37°C και με 5 % CO_2 και, κατόπιν, μετράται η δράση της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται κατωτέρω.

21. Ο μάρτυρας με διαλύτη είναι το μείγμα 50 μl/κοιλότητα X-VIVO™ 15 και 50 μl/κοιλότητα εναιωρήματος κυττάρων σε RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS.

22. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι το 4-NBB. Παρασκευάζονται 20 mg 4-NBB σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης των 1,5 ml, στο οποίο προστίθεται έως 1 ml X-VIVO™ 15. Το σωληνάριο περιδινείται έντονα και ανακινείται σε περιστροφικό αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα 8 σ.α.λ. επί τουλάχιστον 30 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση σε 20000g επί 5 λεπτά, το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται κατά 4 φορές με X-VIVO™ 15, και 500 μl του αραιωμένου υπερκείμενου υγρού μεταφέρονται σε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Το αραιωμένο υπερκείμενο υγρό αραιώνεται περαιτέρω με X-VIVO™ 15 κατά 2 και 4 φορές, και 50 μl του διαλύματος προστίθενται σε 50 μl εναιωρήματος κυττάρων THP-G8 στις κοιλότητες μαύρου τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με επίπεδη βάση (προσάρτημα 3.6). Κάθε συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Το τρυβλίο αναδεύεται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζεται σε επωαστήρα CO_2 επί 16 ώρες (37°C, 5 % CO_2) και, στη συνέχεια, μετράται η δράση της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην παράγραφο 29.

23. Ο συνιστώμενος αρνητικός μάρτυρας είναι το LA. Παρασκευάζονται 20 mg LA σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης των 1,5 ml, στο οποίο προστίθεται έως 1 ml X-VIVO™ 15 (20 mg/ml). 20 mg/ml διαλύματος LA αραιώνονται κατά 5 φορές με X-VIVO™ 15 (4 mg/ml) και 500 μl από αυτό το διάλυμα 4 mg/ml μεταφέρονται σε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Αυτό το διάλυμα αραιώνεται κατά 2 φορές με X-VIVO™ 15 και, στη συνέχεια, αραιώνεται και πάλι κατά 2 φορές για να προκύψουν διαλύματα 2 mg/ml και 1 mg/ml. 50 μl από αυτά τα 3 διαλύματα και τον μάρτυρα με φορέα (X-VIVO™ 15) προστίθενται σε 50 μl εναιωρήματος κυττάρων THP-G8 στις κοιλότητες μαύρου τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με επίπεδη βάση. Κάθε συγκέντρωση του αρνητικού μάρτυρα υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Το τρυβλίο αναδεύεται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζεται σε επωαστήρα CO_2 επί 16 ώρες (37°C, 5 % CO_2) και, στη συνέχεια, μετράται η δραστικότητα της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην παράγραφο 29.

24. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών.

25. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με στεγανοποίηση του τρυβλίου πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

26. Για να προκύψει θετική ή αρνητική πρόβλεψη, απαιτείται η διεξαγωγή 2 έως 4 σειρών δοκιμών με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τον μάρτυρα με διαλύτη (βλ. πίνακα 2). Κάθε σειρά δοκιμών πραγματοποιείται διαφορετική ημέρα με πρόσφατο αποθεματικό διάλυμα υπό δοκιμή χημικών ουσιών σε X-VIVO™ 15 και με κύτταρα που έχουν συλλεγεί ανεξάρτητα. Τα κύτταρα μπορούν να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια.

Μετρήσεις της δραστικότητας λουσιφεράσης

27. Η φωταύγεια μετράται με χρήση λουμινόμετρου τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων εξοπλισμένου με οπτικά φίλτρα, π.χ. Phelios (ATTO, Tokyo, Ιαπωνία), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Γερμανία) και η σειρά ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, ΗΠΑ). Το λουμινόμετρο πρέπει να βαθμονομείται για κάθε δοκιμή προκειμένου να διασφαλίζεται η αναπαραγωγιμότητα (19). Για την εν λόγω βαθμονόμηση διατίθενται ανασυνδυασμένες λουσιφεράσες που εκπέμπουν πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα.

28. 100 μl προθερμασμένου αντιδραστηρίου δοκιμασίας Tripluc® Luciferase (Tripluc) μεταφέρονται σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου που περιέχει το εναιώρημα κυττάρων που υποβάλλεται σε αγωγή με ή χωρίς τη χημική ουσία. Το τρυβλίο ανακινείται επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περίπου 20°C. Το τρυβλίο τοποθετείται στο λουμινόμετρο για να μετρηθεί η δραστικότητα της λουσιφεράσης. Μετράται η βιοφωταύγεια επί 3 δευτερόλεπτα, τόσο απουσία (F0) όσο και παρουσία (F1) του οπτικού φίλτρου. Η χρήση εναλλακτικών συνθηκών θα πρέπει να τεκμηριώνεται επιστημονικά, π.χ. ανάλογα με το μοντέλο του χρησιμοποιούμενου λουμινόμετρου.

29. Οι παράμετροι για κάθε συγκέντρωση υπολογίζονται βάσει των μετρούμενων τιμών, π.χ. των IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, του μέσου όρου ±SD της IL8LA, του μέσου όρου ±SD της GAPLA, του μέσου όρου ±SD της nIL8LA, του μέσου όρου ±SD της Ind-IL8LA, του μέσου όρου ±SD της Inh-GAPLA, του διαστήματος εμπιστοσύνης σε επίπεδο 95 % της Ind-IL8LA. Οι ορισμοί των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα παράγραφο παρέχονται στα προσαρτήματα 3.1 και 3.4.

30. Πριν από τη μέτρηση, η διάκριση των χρωμάτων στο πλαίσιο δοκιμασιών με γονίδια αναφοράς πολλών χρωμάτων πραγματοποιείται συνήθως με χρήση συσκευών ανίχνευσης (λουμινόμετρο και συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων) που διαθέτουν οπτικά φίλτρα, όπως φίλτρα αποκοπής (υψιπερατά ή χαμηλοπερατά) ή φίλτρα ζώνης διέλευσης. Πριν από τη δοκιμή, οι συντελεστές περατότητας των φίλτρων για κάθε χρώμα σήματος βιοφωταύγειας θα πρέπει να βαθμονομούνται, σύμφωνα με το προσάρτημα 3.2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

31. Βάσει των κριτηρίων για τη λήψη απόφασης περί θετικής/αρνητικής πρόβλεψης, σε κάθε σειρά δοκιμών απαιτείται:

— μια δοκιμασία πρόβλεψης IL-8 Luc να κρίνεται θετική εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει Ind-IL8LA ≥ 1,4 και το κατώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA είναι ≥ 1,0

— μια δοκιμασία πρόβλεψης IL-8 Luc να κρίνεται αρνητική εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει Ind-IL8LA < 1,4 και/ή το κατώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA είναι < 1,0.

Μοντέλο πρόβλεψης

32. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες από τις οποίες προκύπτουν δύο θετικά αποτελέσματα από την 1η, 2η, 3η ή 4η σειρά δοκιμών χαρακτηρίζονται θετικές, ενώ εκείνες από τις οποίες προκύπτουν τρία αρνητικά αποτελέσματα από την 1η, 2η, 3η ή 4η σειρά δοκιμών χαρακτηρίζονται υποτιθέμενες αρνητικές (πίνακας 2). Μεταξύ των υποτιθέμενων αρνητικών χημικών ουσιών, οι χημικές ουσίες που διαλύονται σε 20 mg/ml X-VIVO™ 15 κρίνονται αρνητικές, ενώ οι χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε 20 mg/ml X-VIVO™ 15 δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (σχήμα 1).

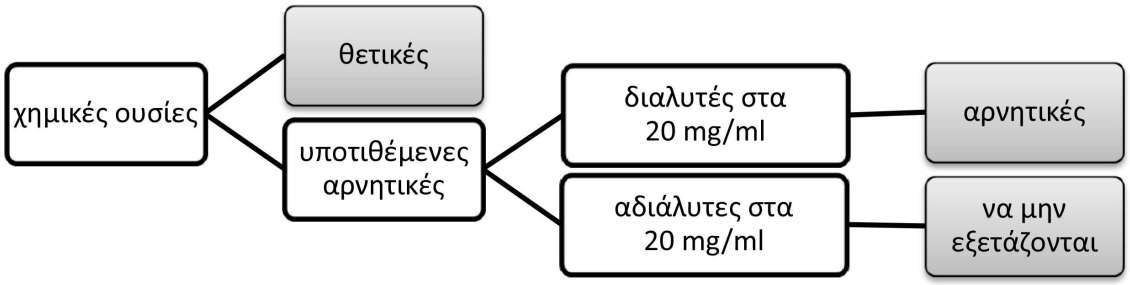
Πίνακας 2

Κριτήρια για τον προσδιορισμό των θετικών και των υποτιθέμενων αρνητικών χημικών ουσιών

1η σειρά δοκιμών	2η σειρά δοκιμών	3η σειρά δοκιμών	4η σειρά δοκιμών	Τελική πρόβλεψη
Θετική	Θετική	–	–	Θετική
	Αρνητική	Θετική	–	Θετική
		Αρνητική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
Αρνητική	Θετική	Θετική	–	Θετική
		Αρνητική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
	Αρνητική	Θετική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
		Αρνητική	–	Υποτιθέμενη αρνητική

Σχήμα 1

Μοντέλο πρόβλεψης για την τελική κρίση



Κριτήρια αποδοχής

33. Όταν χρησιμοποιείται η δοκιμασία IL-8 Luc θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής:

— Η Ind-IL8LA θα πρέπει να υπερβαίνει το 5,0 σε μία τουλάχιστον συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα 4-NBB σε κάθε σειρά δοκιμών.

— Η Ind-IL8LA θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από 1,4 σε όλες τις συγκεντρώσεις του αρνητικού μάρτυρα, του γαλακτικού οξέος, σε κάθε σειρά δοκιμών.

— Δεδομένα από τρυβλία για τα οποία η GAPLA κοιλοτήτων μάρτυρα με κύτταρα και Triplυc αλλά χωρίς χημικές ουσίες είναι μικρότερη από 5 φορές την αντίστοιχη GAPLA κοιλότητας που περιέχει μόνο θρεπτικό μέσο δοκιμής (50 μl/κοιλότητα RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS και 50 μl/κοιλότητα X-VIVO™ 15) θα πρέπει να απορρίπτονται.

— Δεδομένα από τρυβλία για τα οποία η Inh-GAPLA όλων των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ή των χημικών ουσιών μάρτυρα είναι μικρότερη από 0,05 θα πρέπει να απορρίπτονται. Σε αυτήν την περίπτωση, η πρώτη δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, ώστε η υψηλότερη τελική συγκέντρωση της επαναλαμβανόμενης δοκιμής να είναι η χαμηλότερη τελική συγκέντρωση της προηγούμενης δοκιμής.

Έκθεση δοκιμής

34. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

Μονοσυστατική ουσία:

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— διαλυτότητα στο X-VIVO™ 15. Για τις χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές στο X-VIVO™ 15, κατά πόσον παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος ή επίπλευση μετά τη φυγοκέντρηση,

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί X-VIVO™ 15.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

— χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— διαλυτότητα στο X-VIVO™ 15. Για τις χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές στο X-VIVO™ 15, κατά πόσον παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος ή επίπλευση μετά τη φυγοκέντρηση,

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— Συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα.

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί X-VIVO™ 15.

Μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας:

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας:

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

— καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,

— φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλων αρνητικών μαρτύρων εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμες,

— συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

— όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,

— περιγραφή της χρησιμοποιούμενης δοκιμής,

— κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),

— αριθμός παρτίδας και προέλευση του FBS, όνομα προμηθευτή, αριθμός παρτίδας μαύρου τρυβλίου με επίπεδη βάση 96 κοιλοτήτων, και αριθμός παρτίδας αντιδραστηρίου Tripluc,

— αριθμός ανακαλλιεργειών και πυκνότητα κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή,

— μέθοδος καταμέτρησης κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό πριν από τη δοκιμή και τα μέτρα που εφαρμόστηκαν για να εξασφαλιστεί ομοιογενής κατανομή του αριθμού κυττάρων,

— χρησιμοποιούμενο λουμινόμετρο (π.χ. μοντέλο), με τις ρυθμίσεις του οργάνου, χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα λουσιφεράσης και απόδειξη της ενδεδειγμένης ποιότητας των μετρήσεων φωταύγειας με βάση τη δοκιμή ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στο προσάρτημα 3.2,

— διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου όσον αφορά την εφαρμογή της δοκιμής (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή για την απόδειξη της διαχρονικής αναπαραγωγιμότητας των επιδόσεων της δοκιμής.

Διαδικασία δοκιμής

— αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων και σειρών δοκιμών που διεξήχθησαν,

— συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαδικασία εφαρμογής και χρόνος έκθεσης (εάν διαφέρουν από τα συνιστώμενα),

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,

— περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αποδοχής της μελέτης,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

— μετρήσεις της IL8LA και της GAPLA,

— υπολογισμοί για τις nIL8LA, Ind-IL8LA, και Inh-GAPLA,

— το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA,

— γραφική παράσταση των καμπυλών δόσης-απόκρισης για την επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων,

— περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

— εξέταση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας IL-8 Luc,

— εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμασίας στο πλαίσιο IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Διαθέσιμο στη διεύθυνση http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Series on Testing and Assessment No. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Προσάρτημα 3.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (20).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV05: κυτταρική βιωσιμότητα 05, δηλ. η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία οι χημικές ουσίες εμφανίζουν Inh-GAPLA κάτω του 0,05.

FInSLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην Ind-IL8LA. Για τον ορισμό, βλ. Ind-IL8LA.

GAPLA: η δράση της σταθερής λουσιφεράσης κόκκινου χρώματος (SLR) (λmax = 630 nm), η οποία ρυθμίζεται από τον υποκινητή GAPDH και αντιπροσωπεύει την κυτταρική βιωσιμότητα και τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

II-SLR-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην Inh-GAPLA. Για τον ορισμό, βλ. Inh-GAPLA.

IL-8 (ιντερλευκίνη 8): κυτταροκίνη που προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα και η οποία επάγει χημειοταξία των ουδετερόφιλων και των Τ λεμφοκυττάρων.

IL8LA: η δραστικότητα της σταθερής λουσιφεράσης πορτοκαλί χρώματος (SLO) (λmax = 580 nm), η οποία ρυθμίζεται από τον υποκινητή IL-8.

Ind-IL8LA: βαθμός επαγωγής της nIL8LA. Λαμβάνεται με διαίρεση της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες διά της αντίστοιχης μη διεγερμένων κυττάρων THP-G8 και αντιπροσωπεύει την επαγωγή της δραστικότητας του υποκινητή IL-8 από τις χημικές ουσίες.

Inh-GAPLA: αναστολή της GAPLA. Λαμβάνεται με διαίρεση της GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλεται σε αγωγή με χημικές ουσίες διά της GAPLA κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή και αντιπροσωπεύει την κυτταροτοξικότητα των χημικών ουσιών.

'**Οριο ελάχιστης επαγωγής (MIT)**: η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία πληροί τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστεί θετική.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

nIL8LA: η δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8 (IL8LA), κανονικοποιημένη ως προς τη δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH (GAPLA). Αντιπροσωπεύει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8, αφού ληφθεί υπόψη η κυτταρική βιωσιμότητα ή ο αριθμός των κυττάρων.

nSLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην nIL8LA. Για τον ορισμό, βλ. nIL8LA.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (16).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (16).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και με θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (16).

SLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην IL8LA. Για τον ορισμό, βλ. IL8LA.

SLR-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην GAPLA. Για τον ορισμό, βλ. GAPLA.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (16).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά· είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο (TG437).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου.

THP-G8: κυτταρική σειρά με γονίδιο αναφοράς IL-8, που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία IL-8 Luc. Η ανθρώπινη, παρόμοια με μακροφάγα κυτταρική σειρά THP-1 διαμολύνθηκε με τα γονίδια λουσιφεράσης SLO και SLR υπό τον έλεγχο των υποκινητών IL-8 και GAPDH αντίστοιχα.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (21).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό.

Προσάρτημα 3.2

ΑΡΧΗ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ SLO ΚΑΙ SLR

Το σύστημα δοκιμασίας πολλαπλών γονιδίων αναφοράς Triplυc μπορεί να χρησιμοποιηθεί με λουμινόμετρο τύπου τρυβλίων μικροτιτλοδότησης με σύστημα ανίχνευσης πολλών χρωμάτων, το οποίο μπορεί να διαθέτει οπτικό φίλτρο [π.χ. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Το οπτικό φίλτρο που χρησιμοποιείται στη μέτρηση είναι υψιπερατό ή χαμηλοπερατό φίλτρο 600–620 nm, ή φίλτρο ζώνης διέλευσης 600–700 nm.

Μέτρηση λουσιφερασών δύο χρωμάτων με οπτικό φίλτρο.

Στο παρόν παράδειγμα χρησιμοποιείται το Phelios AB-2350 (ATTO). Το λουμινόμετρο αυτό είναι εξοπλισμένο με υψιπερατό φίλτρο 600 nm (R60 HOYA Co., LP 600 nm, φίλτρο 1) για τον διαχωρισμό της φωταύγειας της SLO (λmax = 580 nm) και της SLR (λmax = 630 nm).

Για τον προσδιορισμό των συντελεστών περατότητας πρώτα του LP 600 nm, με χρήση κεκαθαρμένων ενζύμων λουσιφεράσης SLO και SLR: i) μετράται η ένταση βιοφωταύγειας των SLO και SLR χωρίς φίλτρο (F0), ii) μετράται η ένταση βιοφωταύγειας SLO και SLR που διήλθε μέσω LP 600 nm (φίλτρο 1) και iii) υπολογίζονται οι παρακάτω συντελεστές περατότητας του LP 600 nm για τις SLO και SLR.

Συντελεστές περατότητας		Συντομογραφία	Ορισμός
SLO	Συντελεστές περατότητας φίλτρου 1	κO_{R60}	Ο συντελεστής περατότητας του φίλτρου για την SLO
SLR	Συντελεστές περατότητας φίλτρου 1	κR_{R60}	Ο συντελεστής περατότητας του φίλτρου για την SLR

Όταν οι τιμές έντασης των SLO και SLR σε δείγμα δοκιμής ορίζονται ως O και R, αντίστοιχα, i) η ένταση του φωτός χωρίς φίλτρο (όλο το οπτικό φάσμα) F0 και ii) η ένταση του φωτός που διέρχεται διαμέσου του LP 600 nm (φίλτρο 1) F1 περιγράφονται σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Οι τύποι αυτοί μπορούν να αναδιατυπωθούν ως εξής:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τους υπολογισθέντες συντελεστές περατότητας (κO_{R60} και κR_{R60}) και τις μετρηθείσες F0 και F1, μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές των O και R ως εξής:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Υλικά και μέθοδοι για τον προσδιορισμό του συντελεστή περατότητας

1) *Αντιδραστήρια*

Μεμονωμένα κεκαθαρμένα ένζυμα λουσιφεράσης:

Λυοφιλιωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο SLO

Λυοφιλιωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο SLR

(τα οποία, για την εργασία επικύρωσης, ελήφθησαν από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία με την κυτταρική σειρά THP-G8)

Αντιδραστήριο δοκιμασίας:

αντιδραστήριο δοκιμασίας λουσιφεράσης Tripluc® (για παράδειγμα από TOYOBO, αρ. κατ. MRA-301)

Θρεπτικό μέσο: για τη δοκιμασία λουσιφεράσης (30 ml, φυλασσόμενα σε 2 – 8°C)

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο	Απαιτούμενη ποσότητα
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) *Παρασκευή διαλύματος ενζύμου*

Διαλύετε λυοφιλιωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο λουσιφεράσης σε σωληνάριο προσθέτοντας 200 μl Tris/HCl ή Hepes/HCl 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0), συμπληρωμένο με γλυκερίνη 10 % κ.ό., και διαιρείτε το διάλυμα ενζύμου σε κλάσματα 10 μl σε αναλώσιμα σωληνάρια 1,5 ml, τα οποία φυλάσσονται σε καταψύκτη στους -80°C. Το κατεψυγμένο διάλυμα ενζύμου μπορεί να χρησιμοποιείται μέχρι και για 6 μήνες. Κατά τη χρήση, προσθέτετε 1 ml θρεπτικού μέσου για τη δοκιμασία λουσιφεράσης (RPMI-1640 με 10 % FBS) σε κάθε σωληνάριο που περιέχει τα διαλύματα ενζύμου (αραιωμένο διάλυμα ενζύμου) και τα διατηρείτε σε πάγο ώστε να μην αδρανοποιηθούν.

3) *Μέτρηση της βιοφωταύγειας*

Αποψύχετε αντιδραστήριο δοκιμασίας Tripluc® Luciferase (Tripluc) και το διατηρείτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε σε υδατόλουτρο είτε σε θερμοκρασία αέρα περιβάλλοντος. Θέστε σε λειτουργία το λουμινόμετρο 30 λεπτά προτού ξεκινήσετε τη μέτρηση ώστε να σταθεροποιηθεί ο φωτοπολλαπλασιαστής. Μεταφέρετε 100 μl του αραιωμένου διαλύματος ενζύμου σε μαύρο τρυβλίο 96 κοιλοτήτων (επίπεδης βάσης) (το δείγμα αναφοράς SLO στις #B1, #B2, #B3, και το δείγμα αναφοράς SLR στις #D1, #D2, #D3). Στη συνέχεια, με χρήση πολυκάναλης πιπέτας μεταφέρετε 100 μl προθερμασμένου Tripluc σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου που περιέχει το αραιωμένο διάλυμα ενζύμου. Ανακινήστε το τρυβλίο επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 25°C) χρησιμοποιώντας αναδευτήρα τρυβλίων. Αφαιρέστε τις φυσαλίδες από τα διαλύματα σε κοιλότητες, εάν εμφανιστούν. Τοποθετήστε το τρυβλίο στο λουμινόμετρο για να μετρήσετε τη δράση της λουσιφεράσης. Μετράται η βιοφωταύγεια επί 3 δευτερόλεπτα, τόσο απουσία (F0) όσο και παρουσία (F1) του οπτικού φίλτρου.

Ο συντελεστής περατότητας του οπτικού φίλτρου υπολογίζεται ως εξής:

συντελεστής περατότητας (SLO (κO_{R60}))= (#B1 της F1 + #B2 της F1 + #B3 της F1) / (#B1 της F0 + #B2 της F0 + #B3 της F0)

συντελεστής περατότητας (SLR (κR_{R60}))= (#D1 της F1 + #D2 της F1 + #D3 της F1) / (#D1 της F0 + #D2 της F0 + #D3 της F0)

Οι υπολογισθέντες συντελεστές περατότητας χρησιμοποιούνται για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιούνται με χρήση του ίδιου λουμινόμετρου.

Ποιοτικός έλεγχος του εξοπλισμού

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο πρωτόκολλο IL-8 Luc (18).

Προσάρτημα 3.3

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της δοκιμασίας IL-8 Luc για τις 9 συνιστώμενες ουσίες στον πίνακα 1, καθώς και τιμές εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για τουλάχιστον 8 από τις 9 ουσίες ελέγχου ικανότητας (που έχουν επιλεγεί έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν το φάσμα αποκρίσεων για τις πηγές κινδύνου ευαισθητοποίησης του δέρματος). Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη δοκιμασία IL-8 Luc. Επίσης, για τη δοκιμασία IL-8 Luc υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (6) (1).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας στη δοκιμασία IL-8 Luc

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθ. CAS	Κατάσταση	Διαλυτότητα σε X-VIVO 15 στα 20 mg/ml	Πρόβλεψη *in vivo* (1)	Πρόβλεψη IL-8 Luc (2)	Εύρος αναφοράς (μg/ml) (3)	
						CV05 (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7	Στερεό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	Θετική	2,3-3,9	0,5-2,3
Φορμαλδεΰδη	50-00-0	Υγρό	Διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Θετική	9-30	4-9
2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4.	Στερεό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Θετική	250-290	60-250
Αιθυλενοδιαμίνη	107-15-3	Υγρό	Διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Θετική	500-700	0,1-0,4
Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης	97-90-5.	Υγρό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	>2000	0,04-0,1
4-Αλλυλανισόλη (εστραγκόλη)	140-67-0	Υγρό	Μη διαλυτή	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	Θετική	>2000	0,01-0,07
Θειική στρεπτομυκίνη	3810-74-0	Στερεό	Διαλυτή	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	>2000	>2000
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Διαλυτή	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	>2000	>2000
Ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	Διαλυτή	Μη ευαισθητοποιητικό	Αρνητική	>2000	>2000

Συντομογραφίες: Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service
(1) Η ισχύς *in vivo* συνάγεται με την εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (19).
(2) Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (1) (6).
(3) Τα CV_{05} και IL-8 Luc MIT υπολογίστηκαν βάσει της υδατοδιαλυτότητας που προέκυψε από το EPI Suite™.
(4) CV_{05}: η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία οι χημικές ουσίες εμφανίζουν Inh-GAPLA κάτω του 0,05.
(5) MIT: οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις οποίες μια ουσία πληροί τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστεί θετική.

Προσάρτημα 3.4

ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΡΙΣΗΣ

nIL8LA (nSLO-LA)

Μετράται η j-οστή επανάληψη (j = 1-4) της i-οστής συγκέντρωσης (i = 0-11) για τις IL8LA (SLO-LA) και GAPLA (SLR-LA) αντίστοιχα. Η κανονικοποιημένη IL8LA, καλούμενη nIL8LA (nSLO-LA), ορίζεται ως εξής:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Αυτή είναι η βασική μονάδα μέτρησης στην παρούσα δοκιμασία.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Το κύριο μέτρο στην παρούσα δοκιμασία είναι η πολλαπλάσια αύξηση της μέσης nIL8LA (nSLO-LA) για την επανάληψη στην i-οστή συγκέντρωση σε σύγκριση με την αντίστοιχη στη συγκέντρωση 0, Ind-IL8LA. Αυτή η αναλογία αποτυπώνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}\right\}$$

Το κύριο εργαστήριο πρότεινε να αντιστοιχεί τιμή 1,4 σε θετικό αποτέλεσμα για την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η εν λόγω τιμή προέκυψε βάσει έρευνας στα ιστορικά δεδομένα του κύριου εργαστηρίου. Στη συνέχεια, η ομάδα διαχείρισης δεδομένων χρησιμοποίησε την εν λόγω τιμή σε όλες τις φάσεις της μελέτης επικύρωσης. Το κύριο αποτέλεσμα, η Ind-IL8LA, είναι ο λόγος 2 αριθμητικών μέσων όρων, όπως φαίνεται στην εξίσωση.

Διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (95 % CI)

Για να καταδειχθεί η ακρίβεια αυτού του μέτρου κύριου αποτελέσματος, μπορεί να εκτιμηθεί το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (95 % CI) με βάση τον λόγο. Το κατώτερο όριο του 95 % CI ≥ 1 υποδεικνύει ότι η nIL8LA με την i-οστή συγκέντρωση είναι σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη με τον μάρτυρα με διαλύτη. Το 95 % CI μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορους τρόπους. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο που είναι γνωστή ως θεώρημα του Fieller. Το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % βάσει του θεωρήματος λαμβάνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

όπου

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, και $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0,975(\nu)}$ είναι το εκατοστημόριο 97,5 της κεντρικής κατανομής t με τον βαθμό ελευθερίας ν, όπου

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Η Inh-GAPLA είναι ο λόγος της μέσης GAPLA (SLR-LA) για την επανάληψη της i-οστής συγκέντρωσης σε σύγκριση με την αντίστοιχη για τον μάρτυρα με διαλύτη, και αποτυπώνεται με την ακόλουθη εξίσωση

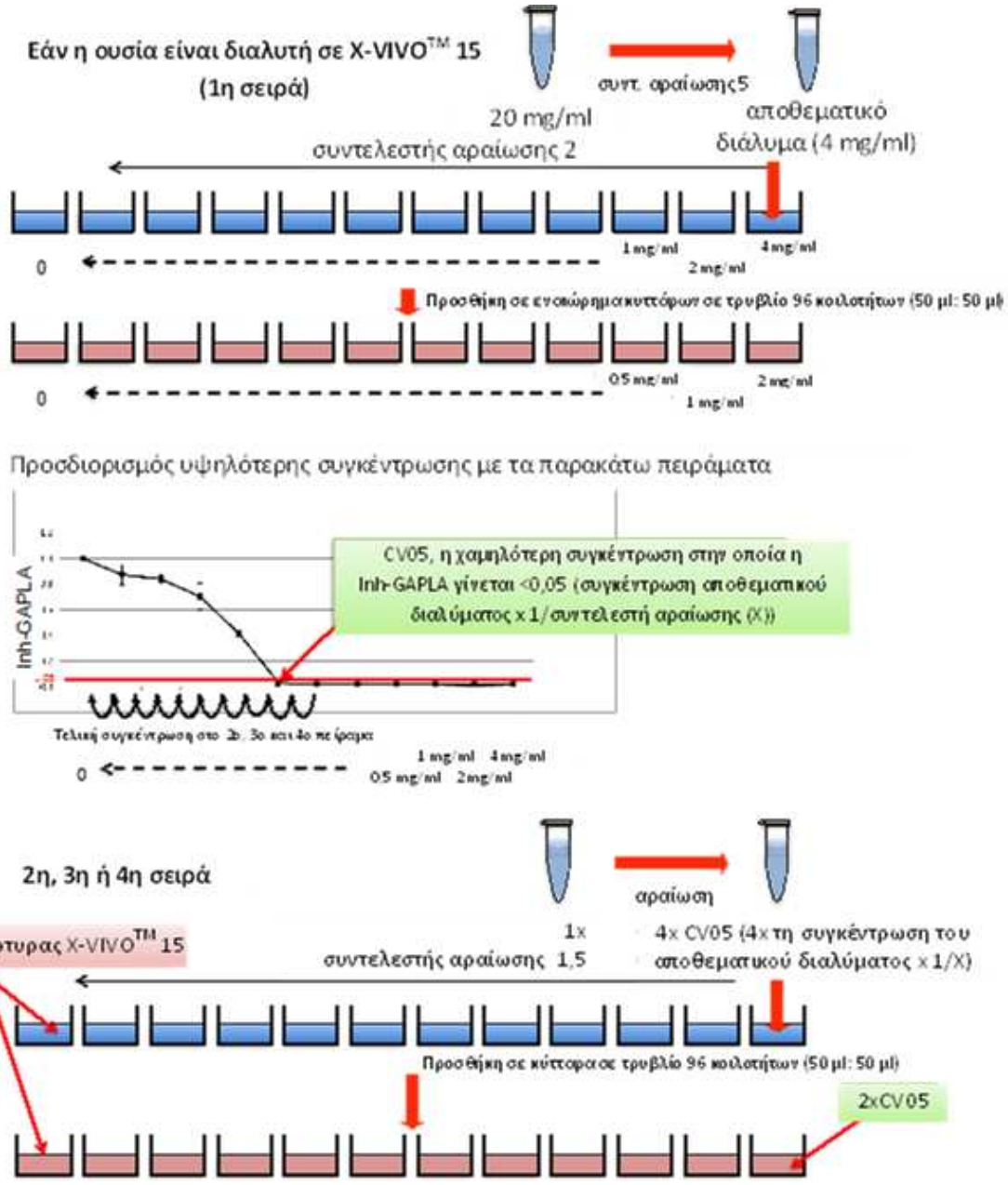
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Δεδομένου ότι GAPLA είναι ο παρονομαστής της nIL8LA, μια εξαιρετικά μικρή τιμή προκαλεί μεγάλη μεταβολή της nIL8LA. Ως εκ τούτου, οι τιμές Ind-IL8LA με εξαιρετικά μικρή τιμή Inh-GAPLA (κάτω από 0,05) μπορεί να θεωρηθούν ότι αντιπροσωπεύουν ανεπαρκή βαθμό ακρίβειας.

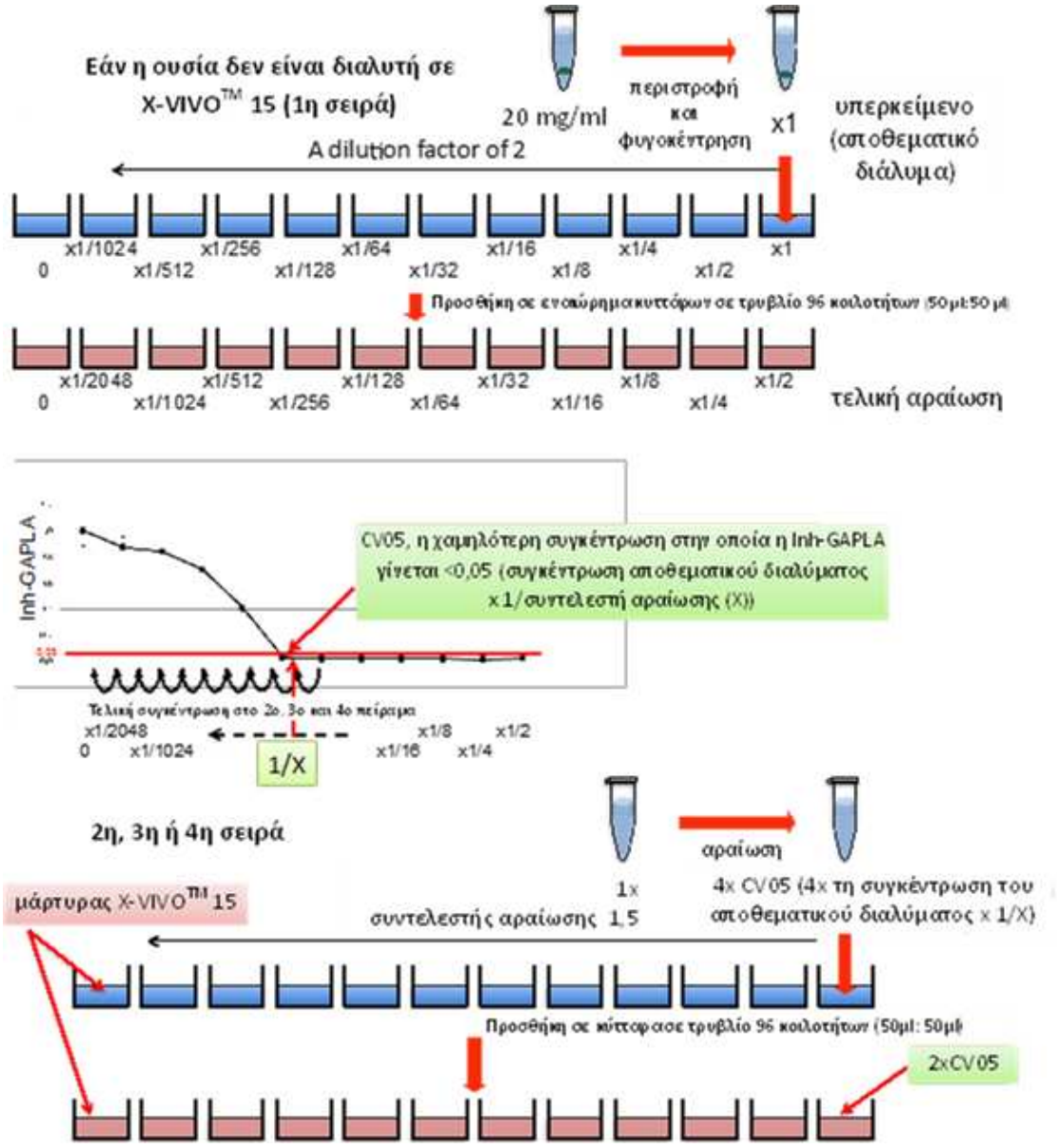
Προσάρτημα 3.5

ΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΛΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ IL-8 LUC

α) Για χημικές ουσίες που διαλύονται σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml

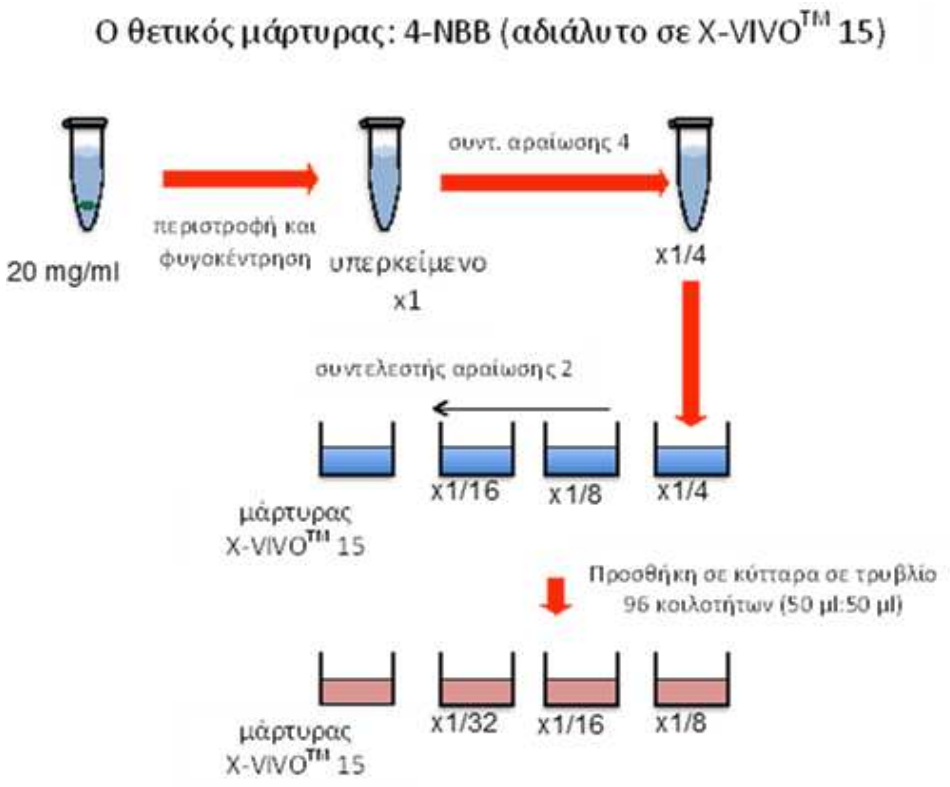


β) Για χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml



Προσάρτημα 3.6

ΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΛΥΣΗ 4-NBB ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ IL-8 LUC



»

9) Στο μέρος Γ προστίθενται τα ακόλουθα κεφάλαια:

«Γ.52 **ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ ΣΤΟ ΡΥΖΟΨΑΡΟ (MEOGRT)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 240 του ΟΟΣΑ (2015). Στην εκτεταμένη δοκιμή στην αναπαραγωγή μίας γενεάς στο ρυζόψαρο (MEOGRT) περιγράφεται μια ολοκληρωμένη μέθοδος δοκιμών που βασίζεται στην έκθεση πολλών γενεών με σκοπό τη συλλογή δεδομένων σχετικά με την επικινδυνότητα για το περιβάλλον και την αξιολόγηση του κινδύνου των χημικών ουσιών, περιλαμβανομένων των χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες (EDC). Στο πλαίσιο της MEOGRT, η έκθεση συνεχίζεται μέχρι την εκκόλαψη (έως δύο εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) στη δεύτερη (F2) γενεά. Για να αιτιολογηθεί η σκοπιμότητα της παράτασης της γενεάς F2 πέραν της εκκόλαψης, θα χρειαστούν περαιτέρω διερευνήσεις· επί του παρόντος, δεν υπάρχουν επαρκείς διαθέσιμες πληροφορίες αναφορικά με τις σχετικές συνθήκες ή τα κριτήρια που δικαιολογούν την παράταση της F2. Ωστόσο, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να επικαιροποιηθεί βάσει νέων στοιχείων και δεδομένων. Για παράδειγμα, η καθοδήγηση σχετικά με την παράταση της γενεάς F2 μέσω αναπαραγωγής μπορεί να είναι χρήσιμη υπό ορισμένες συνθήκες (π.χ. χημικές ουσίες με υψηλό δυναμικό βιοσυγκέντρωσης ή ενδείξεις διαγενεακών επιδράσεων σε άλλες ταξινομικές ομάδες). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των δυνητικών χρόνιων επιδράσεων χημικών ουσιών, περιλαμβανομένων των χημικών ουσιών που είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, στα ψάρια. Στο πλαίσιο της μεθόδου δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στις δυνητικές επιδράσεις που αφορούν τον πληθυσμό (δυσμενείς επιδράσεις στην επιβίωση, την ανάπτυξη, τη σωματική αύξηση και την αναπαραγωγή) με σκοπό τον υπολογισμό μιας συγκέντρωσης μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) ή μιας συγκέντρωσης επίδρασης (ECx), αν και πρέπει να επισημανθεί ότι οι προσεγγίσεις ECx σπάνια είναι κατάλληλες για μεγάλες μελέτες αυτού του τύπου στο πλαίσιο των οποίων η αύξηση του αριθμού των συγκεντρώσεων δοκιμής για να καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός της επιθυμητής ECx μπορεί να είναι πρακτικά δυσχερής, γεγονός που ενδέχεται επίσης να εγείρει σημαντικές ανησυχίες σχετικά με την καλή μεταχείριση των ζώων λόγω του μεγάλου αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων. Για χημικές ουσίες που δεν επιβάλλεται να αξιολογηθούν σε «πολλές γενεές» ή χημικές ουσίες που δεν είναι δυνητικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες, ενδέχεται να υπάρχουν άλλες καταλληλότερες μέθοδοι δοκιμών (1). Το ιαπωνικό ρυζόψαρο είναι το κατάλληλο είδος για χρήση στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής του και της δυνατότητας προσδιορισμού του γενετικού φύλου του (2), στοιχείο κρίσιμης σημασίας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι και παράμετροι παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο αφορούν μόνο το ιαπωνικό ρυζόψαρο. Για άλλα μικρά είδη ψαριών (π.χ. το ζεβρόψαρο), μπορούν να προσαρμοστούν παρεμφερή πρωτόκολλα δοκιμής.

2. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μετρώνται διάφορες βιολογικές παράμετροι. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις δυνητικές επιδράσεις σε σχετικές με τον πληθυσμό παραμέτρους, περιλαμβανομένης της επιβίωσης, της αδρής ανάπτυξης, της σωματικής αύξησης και της αναπαραγωγής. Δευτερευόντως, προκειμένου να συλλεχθούν στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό δράσης αλλά και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με αποτελέσματα από άλλα είδη επιτόπιων και εργαστηριακών μελετών, όταν υπάρχουν εκ των υστέρων στοιχεία που δείχνουν ότι κάποια χημική ουσία δρα ως ενδοκρινικός διαταράκτης (π.χ. ανδρογόνος ή οιστρογόνος δράση σε άλλες δοκιμές και δοκιμασίες), τότε συλλέγονται άλλες χρήσιμες πληροφορίες μέσω μέτρησης του mRNA της λεκιθογενίνης (*vtg*) (ή της πρωτεΐνης της λεκιθογενίνης, VTG), μέσω των φαινοτυπικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου (SSC) που σχετίζονται με το γενετικό φύλο, και μέσω αξιολόγησης της ιστοπαθολογικής εικόνας. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, εάν για μια υπό δοκιμή χημική ουσία ή τους μεταβολίτες της δεν υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, μπορεί να μην είναι απαραίτητη η μέτρηση των εν λόγω δευτερευουσών παραμέτρων και να είναι σκόπιμο να διεξάγονται μελέτες με λιγότερες απαιτήσεις από άποψη πόρων και ζώων (1). Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των χημικών ουσιών που υποβάλλονται σε δοκιμές και των εργαστηρίων που συμμετέχουν στη διαδικασία επικύρωσης αυτής της μάλλον πολύπλοκης δοκιμασίας, αναμένεται ότι όταν θα καταστεί διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών για την εξακρίβωση του αντικτύπου αυτού του νέου σχεδιασμού μελετών, η μέθοδος δοκιμών θα επανεξεταστεί και, εφόσον απαιτείται, θα αναθεωρηθεί υπό το πρίσμα της αποκτηθείσας εμπειρίας. Τα δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο επίπεδο 5 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (3). Η μέθοδος δοκιμών ξεκινά με έκθεση ενήλικων ψαριών (η γενεά F0) στην υπό δοκιμή χημική ουσία κατά τη φάση της αναπαραγωγής. Η έκθεση συνεχίζεται κατά τη φάση της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής της γενεάς F1 και κατά τη φάση της εκκόλαψης της γενεάς F2· ως εκ τούτου, η δοκιμασία επιτρέπει την αξιολόγηση τόσο των δομικών ενδοκρινικών οδών όσο και των οδών ενδοκρινικής ενεργοποίησης. Για την ερμηνεία των σχετικών με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρων, μπορεί να εφαρμόζεται προσέγγιση βάρους της απόδειξης.

4. Η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ατόμων ώστε να διασφαλίζεται επαρκής ικανότητα αξιολόγησης των σχετικών με την αναπαραγωγή παραμέτρων (βλ. προσάρτημα 3) αλλά ταυτόχρονα να χρησιμοποιείται ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ζώων, για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Δεδομένων των μεγάλων αριθμών χρησιμοποιούμενων ζώων, είναι σημαντικό να αξιολογείται ενδελεχώς η ανάγκη διεξαγωγής της δοκιμής σε σχέση με τα υπάρχοντα δεδομένα, τα οποία ενδέχεται να περιλαμβάνουν ήδη συναφείς πληροφορίες σχετικά με πολλές από τις παραμέτρους που εξετάζονται με τη MEOGRT. Ως προς αυτό το θέμα, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο το πλαίσιο δοκιμών τοξικότητας στα ψάρια (Fish Toxicity Testing Framework) του ΟΟΣΑ (1).

5. Η μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί πρωτίστως με σκοπό τη διάκριση των επιδράσεων μιας μεμονωμένης ουσίας. Ωστόσο, εάν απαιτείται η διεξαγωγή δοκιμής σε μείγμα, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η δοκιμή θα δώσει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό.

6. Πριν από την έναρξη της δοκιμής, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ιδίως προκειμένου να παρασκευάζονται σταθερά διαλύματα. Επίσης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναλυτικής μεθόδου επαρκούς ευαισθησίας για την επαλήθευση των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή ξεκινά με την έκθεση σεξουαλικώς ώριμων αρσενικών και θηλυκών (τουλάχιστον 12 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) σε ζεύγη αναπαραγωγής επί 3 εβδομάδες, στη διάρκεια των οποίων η υπό δοκιμή χημική ουσία κατανέμεται στον οργανισμό της γονικής γενεάς (F0) ανάλογα με την τοξικοκινητική συμπεριφορά της. Όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πρώτη ημέρα της τέταρτης εβδομάδας, τα αυγά συλλέγονται για να ξεκινήσει η γενεά F1. Κατά τη φάση της εκτροφής της γενεάς F1 (διάρκειας 15 εβδομάδων συνολικά), αξιολογείται η εκκολαψιμότητα και η επιβίωση. Επιπλέον, πραγματοποιείται δειγματοληψία ψαριών στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση με σκοπό την ανάλυση αναπτυξιακών παραμέτρων και αξιολογείται η ωοτοκία επί τρεις εβδομάδες, από τη 12η μέχρι τη 14η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση. Μετά την τρίτη εβδομάδα αξιολόγησης της αναπαραγωγής δημιουργείται γενεά F2, η οποία και εκτρέφεται μέχρι την ολοκλήρωση της εκκόλαψης.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Ακολούθως παρατίθενται τα κριτήρια που εφαρμόζονται όσον αφορά την εγκυρότητα της δοκιμής:

— η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι ≥ 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής,

— η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 24 και 26 °C. Τυχόν σύντομες αποκλίσεις από τον μέσο όρο σε μεμονωμένα ενυδρεία δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τους 2 °C,

— η μέση γεννητικότητα των μαρτύρων σε καθεμία από τις γενεές (F0 και F1) θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 αυγά ανά ζεύγος ανά ημέρα. Η γονιμότητα του συνόλου των αυγών που παράγονται στη διάρκεια της αξιολόγησης θα πρέπει να υπερβαίνει το 80 %. Επιπλέον, 16 από τα συνιστώμενα 24 ζεύγη αναπαραγωγής μάρτυρες (> 65 %) θα πρέπει να παράγουν πάνω από 20 αυγά ανά ζεύγος ανά ημέρα,

— η εκκολαψιμότητα των αυγών θα πρέπει να είναι ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) στους μάρτυρες (σε καθεμία από τις γενεές F1 και F2),

— η επιβίωση μετά την εκκόλαψη μέχρι την 3η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση και από την 3η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση μέχρι τη λήξη της δοκιμής για τη γενεά F1 (δηλ. τη 15η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση) θα πρέπει να είναι ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) και να είναι ≥ 90 % (κατά μέσο όρο) αντίστοιχα στους μάρτυρες (F1),

— θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία του νερού, παρότι δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, τα πανομοιότυπα δείγματα εντός μιας ορισμένης αγωγής δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν στατιστικές αποκλίσεις μεταξύ τους, και οι ομάδες αγωγής στο πλαίσιο της δοκιμής δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν στατιστικές αποκλίσεις μεταξύ τους (με βάση τις καθημερινές μετρήσεις της θερμοκρασίας, και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι σύντομες αποκλίσεις).

9. Παρότι μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της αναπαραγωγής στις ομάδες υψηλότερης έκθεσης, η αναπαραγωγή τουλάχιστον στην ομάδα με την τρίτη υψηλότερη έκθεση και σε όλες τις ομάδες χαμηλής έκθεσης της F0 θα πρέπει να επαρκεί για την πλήρωση των επωαστήρων εκκόλαψης. Επιπλέον, η επιβίωση των εμβρύων στην ομάδα με την τρίτη υψηλότερη έκθεση και στις ομάδες χαμηλής έκθεσης στην F1 θα πρέπει να επαρκεί για την αξιολόγηση των παραμέτρων κατά τη δειγματοληψία ατόμων πριν την ενηλικίωση (βλ. παραγράφους 36 και 38 και προσάρτημα 9). Επίσης, θα πρέπει να επιτυγχάνεται τουλάχιστον το ελάχιστο ποσοστό επιβίωσης μετά την εκκόλαψη (~20 %) στην ομάδα της F1 με τη δεύτερη υψηλότερη έκθεση. Τα παραπάνω δεν αποτελούν κριτήρια εγκυρότητας καθαυτά αλλά συστάσεις που βοηθούν στον υπολογισμό αξιόπιστων NOEC.

10. Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής και οι εν λόγω αποκλίσεις και εκτιμήσεις θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

11. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) οξυγονόμετρα και pHμετρα,

β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού,

γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης,

δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τον συνιστώμενο πληθυσμιακό φόρτο και την πληθυσμιακή πυκνότητα (βλ. προσάρτημα 3),

ε) ζυγός κατάλληλης ακρίβειας (δηλαδή ακρίβεια έως ± 0,5 mg).

Νερό

12. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και σωματική αύξηση. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει δυσμενώς το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. σχηματίζοντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή χημική ουσία) ούτε τις επιδόσεις των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει, π.χ. κάθε έξι μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), σημαντικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), φυτοφαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης απαριθμούνται στο προσάρτημα 2. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των ± 0,5 μονάδων pH.

Σύστημα έκθεσης

13. Ο σχεδιασμός και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σύστημα έκθεσης δεν προσδιορίζονται. Για την κατασκευή του συστήματος δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό, το οποίο δεν έχει μολυνθεί στη διάρκεια προηγούμενων δοκιμών. Για τους σκοπούς της δοκιμής, ένα κατάλληλο σύστημα έκθεσης μπορεί να αποτελείται από ένα σύστημα συνεχούς ροής (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Διαλύματα δοκιμής

14. Το αποθεματικό διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να διοχετεύεται στο σύστημα έκθεσης μέσω κατάλληλης αντλίας. Ο ρυθμός ροής του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να βαθμονομείται σύμφωνα με την ανάλυση επιβεβαίωσης για τα διαλύματα της δοκιμής πριν από την έναρξη της έκθεσης, και να ελέγχεται ογκομετρικά κατά διαστήματα στη διάρκεια της δοκιμής. Το διάλυμα της δοκιμής σε κάθε θάλαμο ανανεώνεται επαρκώς (π.χ. τουλάχιστον 5 ανανεώσεις του όγκου/ημέρα έως 16 ανανεώσεις του όγκου/ημέρα ή ροή έως 20 ml/λεπτό), ανάλογα με τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και την ποιότητα του νερού.

15. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αποθεματικού διαλύματος. Το αποθεματικά διαλύματα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό αραίωσης με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλα πυκνό αποθεματικό διάλυμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες/συστήματα κορεσμού ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (14). Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η χρήση διαλυτών ή φορέων, για τους ακόλουθους λόγους: 1) ορισμένοι διαλύτες ενδέχεται να συνεπάγονται οι ίδιοι τοξικότητα και/ή ανεπιθύμητες ή απρόβλεπτες αποκρίσεις, 2) η διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων, 3) η χρήση διαλυτών σε μακροπρόθεσμες δοκιμές μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικό σχηματισμό βιοϋμένων, ο οποίος σχετίζεται με μικροβιακή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την ικανότητα διατήρησης των συγκεντρώσεων έκθεσης, και 4) ελλείψει ιστορικών δεδομένων που να καταδεικνύουν ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την έκβαση της μελέτης, η χρήση διαλυτών απαιτεί αγωγή μάρτυρα με διαλύτη η οποία έχει επιπτώσεις στην καλή μεταχείριση των ζώων, δεδομένου ότι απαιτείται πρόσθετος αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για χημικές ουσίες που παρουσιάζουν δυσκολίες στη δοκιμή, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση· συμβουλευτείτε το έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (OECD Guidance Document 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη διαθεσιμότητα ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες σχετικά με τη χρήση του διαλύτη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται διαλύτες, πέραν των (αρνητικών) μαρτύρων που δεν είναι διαλύτες (μόνο νερό αραίωσης), θα πρέπει να αξιολογούνται και οι κατάλληλοι μάρτυρες με διαλύτη. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η χρήση διαλύτη και προκύψει μικροβιακή δραστηριότητα (σχηματισμός βιοϋμένων), συνιστάται η καταγραφή και η αναφορά του σχηματισμού βιοϋμένων ανά δεξαμενή (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Ιδανικά, η συγκέντρωση του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται σταθερή στον μάρτυρα με διαλύτη και σε όλες τις αγωγές της δοκιμής. Εάν η συγκέντρωση του διαλύτη δεν διατηρηθεί σταθερή, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύτη στην αγωγή της δοκιμής. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 100 μl/l ή τα 100 mg/l (15), και συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη να είναι όσον το δυνατόν πιο χαμηλή (π.χ. < 20 μl/l) για να αποφεύγονται πιθανές επιδράσεις του διαλύτη στις μετρούμενες παραμέτρους (16).

Πειραματόζωα

Επιλογή και διατήρηση ψαριών

16. Το επιλεγμένο είδος δοκιμής είναι το ιαπωνικό ρυζόψαρο *Oryzias latipes*, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής του και της δυνατότητας προσδιορισμού του γενετικού φύλου. Παρότι για άλλα μικρά είδη ψαριών μπορούν να προσαρμοστούν παρεμφερή πρωτόκολλα δοκιμής, οι συγκεκριμένες μέθοδοι και οι παράμετροι παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών αφορούν μόνο το ιαπωνικό ρυζόψαρο (βλ. παράγραφο 1). Το ρυζόψαρο αναπαράγεται εύκολα σε συνθήκες αιχμαλωσίας· υπάρχουν δημοσιευμένες μέθοδοι για την εκτροφή του (17) (18) (19), καθώς και δεδομένα από δοκιμές βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας, πρώιμων σταδίων ζωής και πλήρους κύκλου ζωής (5) (6) (8) (9) (20). Όλα τα ψάρια διατηρούνται σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός/8 ωρών σκοταδιού. Τα ψάρια τρέφονται με ζωντανές γαρίδες της άλμης, ναύπλιους από *Artemia* spp., οι οποίες μπορούν να συμπληρώνονται με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες. Η τροφή του εμπορίου σε νιφάδες θα πρέπει να αναλύεται για τυχόν ύπαρξη ρύπων.

17. Εφόσον ακολουθούνται οι κατάλληλες πρακτικές εκτροφής, δεν απαιτείται ειδικό πρωτόκολλο καλλιέργειας. Για παράδειγμα, το ρυζόψαρο μπορεί να εκτρέφεται σε δεξαμενές 2 l, με 240 προνύμφες ανά δεξαμενή μέχρι την 4η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, και, στη συνέχεια, μπορεί να εκτρέφεται σε δεξαμενές 2 l, με 10 ψάρια ανά δεξαμενή μέχρι την 8η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, οπότε μεταφέρονται σε δεξαμενές 2 l ως ζεύγη αναπαραγωγής.

Εγκλιματισμός και επιλογή ψαριών

18. Τα ζώα της δοκιμής θα πρέπει να επιλέγονται από ένα μοναδικό εργαστηριακό απόθεμα, το οποίο έχει εγκλιματιστεί για τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής υπό συνθήκες ποιότητας του νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή (σημείωση: αυτή η περίοδος εγκλιματισμού δεν είναι περίοδος *in situ* προέκθεσης). Συνιστάται τα ψάρια της δοκιμής να λαμβάνονται από εργαστηριακή καλλιέργεια, δεδομένου ότι η αποστολή ενήλικων ψαριών είναι αγχογόνος και μπορεί να παρεμποδίσει την αξιόπιστη ωοτοκία. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται με ναύπλιους γαρίδας της άλμης δύο φορές την ημέρα σε όλη τη διάρκεια της περιόδου διατήρησης και κατά τη φάση έκθεσης, και, συμπληρωματικά, με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες, εάν χρειάζεται. Για να εξασφαλιστούν αρκετά πανομοιότυπα δείγματα (replicates), η δοκιμή πρέπει να ξεκινά με τουλάχιστον 42 ζεύγη αναπαραγωγής (54 ζεύγη αναπαραγωγής εάν απαιτείται χρήση μάρτυρα με διαλύτη λόγω, εν μέρει, έλλειψης ιστορικών δεδομένων που να υποστηρίζουν τη χρήση μόνο του μάρτυρα χωρίς διαλύτη). Επιπλέον, θα πρέπει να επαληθεύεται ότι κάθε ζεύγος αναπαραγωγής της F0 είναι XX-XY (δηλ. το φυσιολογικό σύνολο των χρωμοσωμάτων φύλου σε κάθε φύλο) προκειμένου να αποφεύγεται η πιθανή συμπερίληψη αυθόρμητων αρσενικών XX (βλ. παράγραφο 39).

19. Κατά τη φάση του εγκλιματισμού, θα πρέπει να καταγράφονται οι τιμές θνησιμότητας στα ψάρια της καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια μετά από μία πρώτη περίοδο 48 ωρών:

— θνησιμότητες άνω του 10 % επί του πληθυσμού καλλιέργειας κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— θνησιμότητες μεταξύ 5 % και 10 % επί του πληθυσμού κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: εγκλιματισμός επί επτά ημέρες επιπλέον της περιόδου εγκλιματισμού 2 εβδομάδων· εάν, κατά τη διάρκεια του δεύτερου επταημέρου, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— θνησιμότητες κάτω του 5 % επί του πληθυσμού κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

20. Τα ψάρια δεν θα πρέπει να λαμβάνουν αγωγή για ασθένεια κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού δύο εβδομάδων που προηγείται της δοκιμής και κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, και, ει δυνατόν, η αγωγή για ασθένεια θα πρέπει να αποφεύγεται τελείως. Τα ψάρια με κλινικά σημεία ασθένειας δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στη μελέτη. Θα πρέπει να τηρείται αρχείο παρατηρήσεων και τυχόν προφυλακτικών και θεραπευτικών αγωγών για ασθένειες κατά την περίοδο της καλλιέργειας που προηγείται της δοκιμής.

21. Η φάση της έκθεσης θα πρέπει να ξεκινά με γενετικά φυλοκαθορισμένα ενήλικα ψάρια με φυλετικό διμορφισμό, προερχόμενα από εργαστηριακή πηγή αναπαραγωγικά ώριμων ζώων καλλιεργηθέντων σε 25 ± 2 °C. Τα ψάρια θα πρέπει να είναι αποδεδειγμένοι γεννήτορες (δηλ. να έχουν παράξει βιώσιμους απογόνους) στη διάρκεια της εβδομάδας που προηγείται της έκθεσης. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος βάρους σώματος ανά άτομο για αρσενικά και θηλυκά ψάρια στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να διατηρείται εντός του ± 20 % του αριθμητικού μέσου βάρους του ιδίου φύλου. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα των ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος. Τα ψάρια που επιλέγονται θα πρέπει να είναι ηλικίας τουλάχιστον 12 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση και βάρους ≥ 300 mg για τα θηλυκά και ≥ 250 mg για τα αρσενικά.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συγκεντρώσεις δοκιμής

22. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας, συν τον μάρτυρα/-ες. Κατά την επιλογή του εύρους συγκεντρώσεων δοκιμής, θα πρέπει να εξετάζονται όλες οι πηγές πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένων των ποσοτικών σχέσεων δομής-δραστικότητας (QSAR), των συγκρίσεων με στοιχεία για ουσίες ανάλογης χημικής δομής, των αποτελεσμάτων δοκιμών σε ψάρια όπως δοκιμασίες οξείας τοξικότητας (κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος), της βραχυπρόθεσμης δοκιμασίας αναπαραγωγής σε ψάρια (κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος) και άλλων μεθόδων δοκιμών, π.χ. κεφάλαια Γ.15, Γ.37, Γ.41, Γ.47 ή Γ.49 του παρόντος παραρτήματος (21) (22) (23) (24) (25) (26), εάν υπάρχουν, ή, εφόσον απαιτείται, οι πληροφορίες από δοκιμή προσδιορισμού του εύρους, που να περιλαμβάνει ενδεχομένως και μια φάση αναπαραγωγής. Εφόσον απαιτείται, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους μπορεί να διεξάγεται υπό συνθήκες (υδατοδιαλυτότητα, σύστημα δοκιμής, πληθυσμιακός φόρτος ζώων) παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την οριστική δοκιμή. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση διαλύτη και δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της καταλληλότητας του διαλύτη. Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή υδατοδιαλυτότητας, 10 mg/l ή 1/10ο της 96h-LC50 (27). Η χαμηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από την υψηλότερη συγκέντρωση κατά 10 έως 100 φορές. Η χρήση πέντε συγκεντρώσεων στην παρούσα δοκιμή επιτρέπει όχι μόνο τη μέτρηση των σχέσεων δόσης-απόκρισης, αλλά και τον υπολογισμό της κατώτατης συγκέντρωσης στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) και της NOEC, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εκτίμηση του κινδύνου σε ορισμένα κανονιστικά προγράμματα ή δικαιοδοσίες. Γενικά, ο συντελεστής απόστασης μεταξύ των ονομαστικών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ γειτονικών επιπέδων αγωγής είναι ≤ 3,2.

Πανομοιότυπα δείγματα εντός των ομάδων αγωγής και των μαρτύρων

23. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον έξι θάλαμοι δοκιμής πανομοιότυπου δείγματος ανά συγκέντρωση δοκιμής (βλ. προσάρτημα 7). Κατά τη φάση αναπαραγωγής (εκτός της γενεάς F0), η δομή πανομοιότυπων δειγμάτων διπλασιάζεται με σκοπό την αξιολόγηση της γεννητικότητας και κάθε πανομοιότυπο δείγμα περιλαμβάνει ένα μόνο ζεύγος αναπαραγωγής (βλ. παράγραφο 42).

24. Εκτός από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται μάρτυρας νερού αραίωσης και, εφόσον απαιτείται, μάρτυρας με διαλύτη. Προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής στατιστική ισχύς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διπλάσιος αριθμός θαλάμων πανομοιότυπων δειγμάτων για τους μάρτυρες (θα πρέπει δηλαδή να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δώδεκα πανομοιότυπα δείγματα για τους μάρτυρες). Κατά τη φάση της αναπαραγωγής, ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων στους μάρτυρες διπλασιάζεται (δηλαδή τουλάχιστον 24 πανομοιότυπα δείγματα, με ένα μόνο ζεύγος ζευγαρώματος σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα). Μετά την αναπαραγωγή, τα πανομοιότυπα δείγματα μαρτύρων δεν θα πρέπει να περιλαμβάνουν πάνω από 20 έμβρυα (ψάρια).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έναρξη της δοκιμής

25. Τα αναπαραγωγικώς ενεργά ενήλικα ψάρια που χρησιμοποιούνται για το ξεκίνημα της γενεάς F0 της δοκιμής επιλέγονται με βάση τα ακόλουθα δύο κριτήρια: ηλικία (συνήθως άνω των 12 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση, αλλά όχι άνω των 16 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση) και βάρος (τα θηλυκά θα πρέπει να είναι ≥ 300 mg και τα αρσενικά ≥ 250 mg).

26. Ζεύγη θηλυκών-αρσενικών που πληρούν τις ανωτέρω προδιαγραφές μετακινούνται ως μεμονωμένα ζεύγη σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος, δηλαδή δώδεκα δείγματα στους μάρτυρες και έξι δείγματα στις αγωγές με τη χημική ουσία κατά την έναρξη της δοκιμής. Στις εν λόγω δεξαμενές αντιστοιχίζεται τυχαία μια αγωγή (π.χ. T1-T5 και μάρτυρας) και ένα πανομοιότυπο δείγμα (π.χ. A-L στους μάρτυρες και A-F στην αγωγή) και, στη συνέχεια, οι δεξαμενές τοποθετούνται στο σύστημα έκθεσης με την κατάλληλη ροή σε κάθε δεξαμενή.

Συνθήκες έκθεσης

27. Πλήρης σύνοψη των παραμέτρων και των συνθηκών της δοκιμής παρέχεται στο προσάρτημα 3. Η τήρηση των εν λόγω προδιαγραφών αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα ψάρια μάρτυρες με τιμές παραμέτρων παρεμφερείς με εκείνες που παρατίθενται στο προσάρτημα 4.

28. Στη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το διαλυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία σε τουλάχιστον ένα δοχείο δοκιμής κάθε ομάδας αγωγής και του μάρτυρα. Οι εν λόγω μετρήσεις, εκτός της μέτρησης της θερμοκρασίας, θα πρέπει να πραγματοποιούνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 24 και 26 °C. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετράται κάθε ημέρα, σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των ± 0,5 μονάδων pH. Τα πανομοιότυπα δείγματα εντός μιας ορισμένης αγωγής δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από στατιστικής άποψης, και οι ομάδες αγωγής δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από στατιστικής άποψης (με βάση τις καθημερινές μετρήσεις της θερμοκρασίας, και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τυχόν σύντομες αποκλίσεις).

Διάρκεια της έκθεσης

29. Κατά τη δοκιμή εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία ώριμα για αναπαραγωγή ψάρια της γενεάς F0 επί τρεις εβδομάδες. Την 4η εβδομάδα και την 24η περίπου ημέρα δοκιμής δημιουργείται η F1, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 θανατώνονται με ευθανασία, και το βάρος και το μήκος τους καταγράφονται (βλ. παράγραφο 34). Στη συνέχεια, ξεκινά η έκθεση της γενεάς F1 επί 14 επιπλέον εβδομάδες (συνολικά 15 εβδομάδες για την F1) και της γενεάς F2 επί δύο εβδομάδες μέχρι την εκκόλαψη. Η συνολική διάρκεια της δοκιμής είναι κατά κανόνα 19 εβδομάδες (δηλ. μέχρι την εκκόλαψη της F2). Τα χρονοδιαγράμματα της δοκιμής φαίνονται στον πίνακα 2 και επεξηγούνται διεξοδικά στο προσάρτημα 9.

Πρόγραμμα σίτισης

30. Τα ψάρια μπορούν να σιτίζονται με γαρίδες της άλμης *Artemia* spp. (ναύπλιοι ηλικίας 24 ωρών) κατά βούληση, και, συμπληρωματικά, με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες, εάν χρειάζεται. Η τροφή σε νιφάδες θα πρέπει να αναλύεται τακτικά για τυχόν ύπαρξη ρύπων όπως οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα, πολυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB). Θα πρέπει να αποφεύγονται τροφές με αυξημένα επίπεδα ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα (φυτοοιστρογόνα), οι οποίες θα μπορούσαν να υπονομεύσουν την απόκριση της δοκιμής. Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής όπως απαιτείται, π.χ. με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με σιφώνιο. Επίσης, θα πρέπει να καθαρίζονται μία ή δύο φορές την εβδομάδα οι πλευρές και ο πυθμένας κάθε δεξαμενής (π.χ. μέσω ξέσης με σπάτουλα). Παράδειγμα προγράμματος σίτισης παρέχεται στο προσάρτημα 5. Ο ρυθμός σίτισης βασίζεται στον αριθμό ψαριών ανά πανομοιότυπο δείγμα. Ως εκ τούτου, εάν παρατηρηθούν θάνατοι σε ένα πανομοιότυπο δείγμα, ο ρυθμός σίτισης μειώνεται.

Αναλυτικός προσδιορισμός και μετρήσεις

31. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που απαιτούνται θα πρέπει να είναι καθιερωμένες και θα πρέπει να υπάρχουν επαρκείς γνώσεις σχετικά με τη χημική σταθερότητα στο σύστημα δοκιμής. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, κατά προτίμηση τουλάχιστον κάθε εβδομάδα σε ένα πανομοιότυπο δείγμα για κάθε ομάδα αγωγής, με κυκλική εναλλαγή μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ομάδας αγωγής κάθε εβδομάδα.

32. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι ρυθμοί ροής του αραιωτικού μέσου και του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να ελέγχονται σε αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (π.χ. τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα). Συνιστάται τα αποτελέσματα να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ±20 % των μέσων μετρηθεισών τιμών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται είτε στις ονομαστικές είτε στις μετρηθείσες τιμές. Σε περίπτωση χημικών ουσιών που εμφανίζουν σημαντική συσσώρευση στα ψάρια, οι συγκεντρώσεις δοκιμής μπορούν να μειώνονται καθώς αναπτύσσονται τα ψάρια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνιστάται ο ρυθμός ανανέωσης του διαλύματος δοκιμής σε κάθε θάλαμο να προσαρμόζεται ώστε να διατηρείται όσο το δυνατόν περισσότερο η σταθερότητα των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Παρατηρήσεις και μετρούμενες παράμετροι

33. Οι μετρούμενες παράμετροι είναι η γεννητικότητα, η γονιμότητα, η εκκόλαψη, η σωματική αύξηση και η επιβίωση με σκοπό την αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων στο επίπεδο του πληθυσμού. Επίσης, θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η συμπεριφορά και να καταγράφεται τυχόν ασυνήθης συμπεριφορά. Άλλες παράμετροι που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης είναι τα ηπατικά επίπεδα mRNA του γονιδίου *vtg* ή τα επίπεδα της πρωτεΐνης VTG που προσδιορίζονται μέσω ανοσοδοκιμασίας (28), οι φαινοτυπικοί δείκτες φύλου όπως οι χαρακτηριστικές θηλοειδείς αποφύσεις του εδρικού πτερυγίου των αρσενικών, η ιστολογική αξιολόγηση του γοναδικού φύλου, και η αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας του νεφρού, του ήπατος και της γονάδας (βλ. κατάλογο παραμέτρων στον πίνακα 1). Όλες οι ειδικές παράμετροι αξιολογούνται στο πλαίσιο προσδιορισμού του γενετικού φύλου του ατόμου, βάσει της παρουσίας ή απουσίας του γονιδίου *dmy* που καθορίζει το φύλο των αρσενικών ρυζόψαρων (βλ. παράγραφο 41). Επιπλέον, αξιολογείται ο χρόνος μέχρι την ωοτοκία. Επίσης, μπορούν να εξαχθούν απλές αναλογίες των φαινοτυπικών φύλων βάσει των στοιχείων μετρήσεων των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου με σκοπό να προσδιοριστούν μεμονωμένα άτομα ρυζόψαρων ως φαινοτυπικώς αρσενικά ή θηλυκά. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται για την ανίχνευση μικρών αποκλίσεων από την αναμενόμενη αναλογία των φύλων, διότι οι σχετικά μικροί αριθμοί ψαριών ανά πανομοιότυπο δείγμα δεν παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ. Επίσης, στη διάρκεια της ιστοπαθολογικής αξιολόγησης, αξιολογείται η γονάδα και διεξάγονται πολύ πιο ισχυρές στατιστικά αναλύσεις για την αξιολόγηση του γοναδικού φαινοτύπου στο πλαίσιο του γενετικού φύλου.

34. Ο κύριος σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που σχετίζονται με τον πληθυσμό. Οι παράμετροι που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης (VTG, SSC και ορισμένες επιδράσεις στην ιστοπαθολογία των γονάδων) μπορούν επίσης να συμβάλουν στον προσδιορισμό του κατά πόσον κάποια επίδραση μεσολαβείται από ενδοκρινική δραστικότητα. Ωστόσο, οι εν λόγω παράμετροι μπορούν επίσης να επηρεάζονται από συστηματικές και άλλες τοξικότητες. Κατά συνέπεια, μπορεί επίσης να αξιολογείται διεξοδικά η ιστοπαθολογία του ήπατος και των νεφρών με σκοπό την καλύτερη κατανόηση τυχόν αποκρίσεων στις μηχανιστικές παραμέτρους. Εντούτοις, ακόμη κι αν δεν διεξαχθούν αυτές οι αναλυτικές αξιολογήσεις, τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες που παρατηρούνται περιστασιακά κατά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

Θανάτωση των ψαριών με ευθανασία

35. Κατά τη λήξη της έκθεσης των γενεών F0 και F1, και όταν πραγματοποιείται μερική δειγματοληψία των ψαριών που βρίσκονται πριν την ενηλικίωση, τα ψάρια θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία με κατάλληλες ποσότητες αναισθητικού διαλύματος [π.χ. μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l] στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα $NaHCO_3$ (διττανθρακικό νάτριο, CAS.144-55-8) 300 mg/l για τον περιορισμό του ερεθισμού του βλεννογόνου. Εάν τα ψάρια εμφανίζουν συμπτώματα έντονης οδύνης (μπορεί να προβλεφθεί με ασφάλεια η πρόκληση ιδιαίτερα έντονης οδύνης και θανάτου) και θεωρούνται ετοιμοθάνατα, πρέπει να αναισθητοποιούνται και να θανατώνονται με ευθανασία, και να συγκαταλέγονται στην παράμετρο της θνησιμότητας στο πλαίσιο της ανάλυσης δεδομένων. Όταν ένα ψάρι θανατώνεται με ευθανασία λόγω νοσηρότητας, αυτό θα πρέπει να καταγράφεται και να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή στη διάρκεια της μελέτης κατά την οποία θανατώνεται το ψάρι, μπορεί να διατηρείται με σκοπό τη διεξαγωγή ιστοπαθολογικής ανάλυσης (μονιμοποίηση του ψαριού για την πιθανή διενέργεια ιστοπαθολογικής ανάλυσης).

Χειρισμός των αυγών και των προνυμφών

Συλλογή των αυγών από τα ζεύγη ζευγαρώματος για τον πολλαπλασιασμό της επόμενης γενεάς

36. Η συλλογή των αυγών πραγματοποιείται την πρώτη ημέρα (ή τις πρώτες δύο ημέρες, εφόσον απαιτείται) της 4ης εβδομάδας δοκιμής για τη μετάβαση από την F0 στην F1, και της 18ης εβδομάδας δοκιμής για τη μετάβαση από την F1 στην F2. Η 18η εβδομάδα δοκιμής αντιστοιχεί σε ενήλικα ψάρια F1, ηλικίας 15 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση. Είναι σημαντικό, πριν από την ημέρα έναρξης συλλογής των αυγών, να απομακρύνονται όλα τα αυγά από κάθε δεξαμενή, προκειμένου να διασφαλίζεται ότι όλα τα αυγά που συλλέγονται από ένα ζεύγος ζευγαρώματος προέρχονται από την ίδια ωοτοκία. Μετά την ωοτοκία, το θηλυκό ρυζόψαρο κρατά μερικές φορές τα αυγά του προσκολλημένα κοντά στον ουρογεννητικό πόρο μέχρι να τα αποθέσει σε υπόστρωμα. Εάν δεν υπάρχει υπόστρωμα στη δεξαμενή, τα αυγά βρίσκονται είτε επάνω στο θηλυκό είτε στον πυθμένα της δεξαμενής. Ανάλογα με το σημείο στο οποίο βρίσκονται, τα αυγά είτε αποσπώνται προσεκτικά από το θηλυκό είτε απομακρύνονται με σιφωνισμό από τον πυθμένα την 4η εβδομάδα δοκιμής για την F0 και τη 18η εβδομάδα δοκιμής για την F1. Όλα τα αυγά που συλλέγονται στο πλαίσιο μιας αγωγής συγχωνεύονται πριν από την κατανομή σε θαλάμους επώασης.

37. Τα νημάτια αυγών, που συγκρατούν τα αυγά της ωοτοκίας μαζί, θα πρέπει να απομακρύνονται. Τα γονιμοποιημένα αυγά (έως 20) συλλέγονται από κάθε ζεύγος ζευγαρώματος (1 ζεύγος ανά πανομοιότυπο δείγμα), συγχωνεύονται ανά αγωγή και κατανέμονται συστηματικά σε κατάλληλους θαλάμους επώασης (προσάρτημα 6, 7). Με χρήση στερεοσκοπίου καλής ποιότητας, μπορούν να διαπιστωθούν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρώιμης γονιμοποίησης/ανάπτυξης όπως η ανύψωση της μεμβράνης γονιμοποίησης (χόριο), η εξελισσόμενη διαίρεση των κυττάρων, ή ο σχηματισμός του βλαστιδίου. Οι θάλαμοι επώασης μπορούν να τοποθετούνται σε χωριστά «ενυδρεία επώασης» που διαμορφώνονται για κάθε αγωγή (στα οποία θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι ποιότητας του νερού και οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας), ή στο ενυδρείο στο οποίο θα τοποθετηθούν οι εκκολαφθείσες προνύμφες (λεκιθοφόρα ιχθύδια). Σε περίπτωση που η συλλογή πρέπει να συνεχιστεί και για δεύτερη ημέρα (ημέρα δοκιμής 23), όλα τα αυγά και από τις δύο ημέρες θα πρέπει να συγχωνεύονται και, στη συνέχεια, να κατανέμονται συστηματικά σε όλα τα πανομοιότυπα δείγματα της αγωγής.

Εκτροφή των αυγών μέχρι την εκκόλαψη

38. Τα γονιμοποιημένα αυγά ανακινούνται διαρκώς, π.χ. μέσα στον επωαστήρα αυγών με φυσαλίδες αέρα ή μέσω κατακόρυφης ταλάντωσης του επωαστήρα αυγών. Οι θνησιμότητες των γονιμοποιημένων αυγών (εμβρύων) ελέγχονται και καταγράφονται καθημερινά. Τα νεκρά αυγά απομακρύνονται από τους επωαστήρες (προσάρτημα 9). Την 7η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, η ανακίνηση διακόπτεται ή μειώνεται, ούτως ώστε τα γονιμοποιημένα αυγά να κατακαθίσουν στον πυθμένα του επωαστήρα. Κατ' αυτόν τον τρόπο υποστηρίζεται η εκκόλαψη, συνήθως τις επόμενες μία ή δύο ημέρες. Οι νεαρές προνύμφες (λεκιθοφόρα ιχθύδια) καταγράφονται (συγχωνευμένα για κάθε πανομοιότυπο δείγμα) για κάθε αγωγή και μάρτυρα. Τα γονιμοποιημένα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί σε χρονικό διάστημα διπλάσιο αυτού της διάμεσης ημέρας εκκόλαψης στον μάρτυρα (συνήθως η 16η ή η 18η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση) θεωρούνται μη βιώσιμα και απορρίπτονται.

39. Σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος μεταφέρονται δώδεκα ιχθύδια. Τα ιχθύδια από τους θαλάμους επώασης συγχωνεύονται και κατανέμονται συστηματικά σε δεξαμενές πανομοιότυπων δειγμάτων (προσάρτημα 7). Αυτό μπορεί να πραγματοποιείται μέσω τυχαίας επιλογής ενός ιχθυδίου από τον πληθυσμό αγωγής και μέσω της διαδοχικής προσθήκης σε ένα ενυδρείο ενός ιχθυδίου τη φορά, χωρίς να γίνεται διάκριση ως προς τα χαρακτηριστικά του. Καθεμία από τις δεξαμενές θα πρέπει να περιέχει ίσο αριθμό (n=12) εκκολαφθεισών προνυμφών (20 προνύμφες σε κάθε δεξαμενή κατά μέγιστο). Εάν ο αριθμός των ιχθυδίων δεν επαρκεί για την πλήρωση όλων των πανομοιότυπων δειγμάτων της αγωγής, συνιστάται να διασφαλίζεται η πλήρωση όσο το δυνατόν περισσότερων επαναλήψεων με 12 ιχθύδια. Ο χειρισμός των ιχθυδίων μπορεί να γίνει με ασφάλεια με γυάλινες πιπέτες μεγάλης διαμέτρου. Τυχόν πλεονάζοντα ιχθύδια θανατώνονται με ευθανασία με αναισθητικό. Στη διάρκεια των λίγων εβδομάδων πριν από τη διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος, θα πρέπει να καταγράφεται η ημέρα κατά την οποία παρατηρείται το πρώτο συμβάν ωοτοκίας σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα.

Διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος

Αποκοπή πτερυγίου και προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου

40. Ο προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου μέσω αποκοπών πτερυγίου πραγματοποιείται την 9η-10η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση (δηλαδή τη 12η-13η εβδομάδα δοκιμής για τη γενεά F1). Όλα τα ψάρια σε μία δεξαμενή αναισθητοποιούνται (με χρήση εγκεκριμένων μεθόδων, π.χ. IACUC) και λαμβάνεται ένα μικρό δείγμα ιστού είτε από το ραχιαίο είτε από το κοιλιακό άκρο του ουραίου πτερυγίου κάθε ψαριού, προκειμένου να προσδιοριστεί το γονοτυπικό φύλο του ατόμου (29). Τα ψάρια ενός πανομοιότυπου δείγματος μπορούν να στεγάζονται σε μικρούς κλωβούς, κατά προτίμηση ένα ανά κλωβό, στη δεξαμενή. Εναλλακτικά, μπορούν να διατηρούνται δύο ψάρια σε κάθε κλωβό, εφόσον διακρίνονται μεταξύ τους. Μία μέθοδος είναι η διαφοροποίηση του σημείου αποκοπής στο ουραίο πτερύγιο (π.χ. ραχιαίου έναντι κοιλιακού άκρου) κατά τη λήψη του δείγματος ιστού.

41. Το γονοτυπικό φύλο του ρυζόψαρου καθορίζεται από ένα αναγνωρισμένο και αλληλουχημένο γονίδιο (*dmy*), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα Y. Η παρουσία του *dmy* υποδεικνύει άτομο XY ανεξάρτητα από τον φαινότυπο, ενώ η απουσία του *dmy* υποδεικνύει άτομο XX ανεξάρτητα από τον φαινότυπο (30), (31). Από κάθε πτερύγιο εξάγεται το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και η παρουσία ή η απουσία του *dmy* μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) [ανατρέξτε στο προσάρτημα 9 του κεφαλαίου Γ.41 του παρόντος παραρτήματος, ή στο προσάρτημα 3 και 4 στην παράγραφο (29)].

Δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος

42. Οι πληροφορίες για το γονοτυπικό φύλο χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ζευγών ζευγαρώματος XX-XY ανεξάρτητα από τον εξωτερικό φαινότυπο, οποίος μπορεί να έχει αλλοιωθεί λόγω της έκθεσης σε υπό δοκιμή χημική ουσία. Την ημέρα μετά τον προσδιορισμό του γονοτυπικού φύλου κάθε ψαριού, επιλέγονται τυχαία δύο ψάρια XX και δύο ψάρια XY από κάθε πανομοιότυπο δείγμα και δημιουργούνται δύο ζεύγη ζευγαρώματος XX-XY. Εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα δεν διαθέτει είτε δύο ψάρια XX είτε δύο ψάρια XY, τα κατάλληλα ψάρια θα πρέπει να λαμβάνονται από άλλα πανομοιότυπα δείγματα της ίδιας αγωγής. Αυτό που έχει σημασία είναι σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες (24) να υπάρχει ο συνιστώμενος αριθμός ζευγών ζευγαρώματος ανά πανομοιότυπο δείγμα (12). Κατά τη δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος αποκλείονται τα ψάρια με εμφανείς ανωμαλίες (προβλήματα νυκτικής κύστης, παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης, ακραίες διακυμάνσεις μεγέθους κ.λπ.). Κατά την αναπαραγωγική φάση της F1, κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος θα πρέπει να περιέχει ένα μόνο ζεύγος ζευγαρώματος.

Δειγματοληψία ψαριών πριν την ενηλικίωση και αξιολόγηση παραμέτρων

Δειγματοληψία ψαριών που δεν ανήκουν στα ζεύγη ζευγαρώματος

43. Μετά τη διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος, τα ψάρια που δεν έχουν επιλεγεί για περαιτέρω αναπαραγωγή θανατώνονται με ευθανασία προκειμένου να μετρηθούν οι παράμετροι πριν την ενηλικίωση, τη 12η-13η εβδομάδα δοκιμής (F1). Είναι εξαιρετικά σημαντικό ο χειρισμός των ψαριών να πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να εξακολουθεί να είναι γνωστό το γονοτυπικό φύλο που είχε προσδιοριστεί για κάθε άτομο κατά την επιλογή των ζευγών ζευγαρώματος. Όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αναλύονται στο πλαίσιο του γονοτυπικού φύλου του συγκεκριμένου ψαριού. Κάθε ψάρι χρησιμοποιείται για διάφορες μετρήσεις παραμέτρων, όπως οι ακόλουθες: προσδιορισμός των ποσοστών επιβίωσης ιχθυδίων/ψαριών πριντην

ενηλικίωση [εβδομάδες δοκιμής 7-12/13 (F1)], της αύξησης σε μήκος (σε περίπτωση αποκοπής του ουραίου πτερυγίου λόγω δειγματοληψίας για ανάλυση του γενετικού φύλου, μπορεί να μετράται το κανονικό μήκος. Το ολικό μήκος μπορεί να μετράται εφόσον είχε ληφθεί μόνο ένα τμήμα –ραχιαίο ή κοιλιακό– του ουραίου πτερυγίου για τον προσδιορισμό του *dmy*), της μάζας σώματος (δηλ. νωπό βάρος, στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί), του ηπατικού *vtg* mRNA (ή της VTG) και των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (βλ. πίνακες 1 και 2). Επισημαίνεται ότι τα βάρη και τα μήκη των ζευγών ζευγαρώματος είναι επίσης απαραίτητα για τον υπολογισμό της μέσης σωματικής αύξησης της ομάδας αγωγής.

Δειγματοληψία ιστών και μέτρηση λεκιθογενίνης

44. Το ήπαρ ανατέμνεται και φυλάσσεται στους ≤ –70 °C μέχρι να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις του *vtg* mRNA (ή της VTG). Η ουρά του ψαριού, περιλαμβανομένου του εδρικού πτερυγίου, διατηρείται σε κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης (π.χ. Davidson) ή φωτογραφίζεται ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου αργότερα. Εφόσον είναι επιθυμητό, σε αυτό το στάδιο μπορεί να πραγματοποιείται δειγματοληψία και διατήρηση άλλων ιστών (δηλ. γονάδας) σε μέσο μονιμοποίησης. Θα πρέπει να προσδιορίζεται ποσοτικά η συγκέντρωση της ηπατικής VTG με ομόλογη τεχνική ELISA (βλ. τις συνιστώμενες διαδικασίες για το ρυζόψαρο στο προσάρτημα 6 του κεφαλαίου Γ.48 του παρόντος παραρτήματος). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού του vtg mRNA που ανέπτυξε ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) των ΗΠΑ, δηλαδή εκχύλιση του mRNA του γονιδίου *vtg I* από δείγμα ήπατος και ποσοτικός προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *vtg I* (ανά ng συνολικού mRNA) μέσω ποσοτικής PCR (29). Αντί του προσδιορισμού του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *vtg* στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής, μια λιγότερο δύσκολη τεχνικά μέθοδος με χρήση λιγότερων πόρων είναι ο προσδιορισμός της σχετικής (πολλαπλάσιας) μεταβολής της έκφρασης του vtg I στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής.

Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου

45. Υπό κανονικές συνθήκες, μόνο τα σεξουαλικώς ώριμα αρσενικά ρυζόψαρα διαθέτουν θηλοειδείς αποφύσεις, οι οποίες αναπτύσσονται στις αρθρικές πλάκες ορισμένων ακτίνων του εδρικού πτερυγίου ως δευτερογενές σεξουαλικό χαρακτηριστικό, και αποτελούν δυνητικό βιοδείκτη επιδράσεων ενδοκρινικών διαταρακτών. Η μέθοδος καταμέτρησης των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (ο αριθμός των ενωτικών μεμβρανών με θηλοειδείς αποφύσεις) παρατίθεται στο προσάρτημα 8. Επίσης, ο αριθμός των θηλοειδών αποφύσεων του εδρικού πτερυγίου ανά άτομο χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση του συγκεκριμένου ατόμου ως εξωτερικά φαινοτυπικού αρσενικού ή θηλυκού με σκοπό τον υπολογισμό μιας απλής αναλογίας φύλων ανά πανομοιότυπο δείγμα. Ένα ρυζόψαρο με αριθμό μεγαλύτερου του 0 ορίζεται ως αρσενικό· ένα ρυζόψαρο με 0 θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου ορίζεται ως θηλυκό.

Αξιολόγηση της γεννητικότητας και της γονιμότητας

46. Η γεννητικότητα και η γονιμότητα αξιολογούνται τις εβδομάδες δοκιμής 1 έως 3 στη γενεά F0 και τις εβδομάδες 15 έως 17 στη γενεά F1. Τα αυγά συλλέγονται καθημερινά από κάθε ζεύγος ζευγαρώματος επί 21 διαδοχικές ημέρες. Τα αυγά απομακρύνονται προσεκτικά από τα θηλυκά, αφού αυτά παγιδευτούν με απόχη, και/ή αναρροφούνται με σιφώνιο από τον πυθμένα του ενυδρείου κάθε πρωί. Η γεννητικότητα και η γονιμότητα καταγράφονται καθημερινά για κάθε ζεύγος ζευγαρώματος πανομοιότυπου δείγματος. Η γεννητικότητα ορίζεται ως ο αριθμός των αυγών ωοτοκίας, ενώ η γονιμότητα ορίζεται λειτουργικά ως ο αριθμός των γονιμοποιημένων και βιώσιμων αυγών κατά την καταμέτρηση. Η καταμέτρηση θα πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατόν μετά τη συλλογή των αυγών.

47. Η γεννητικότητα πανομοιότυπου δείγματος καταγράφεται καθημερινά ως ο αριθμός των αυγών ανά ζεύγος ζευγαρώματος που αναλύεται με τις συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες και με χρήση των μέσων όρων των πανομοιότυπων δειγμάτων. Η γονιμότητα πανομοιότυπου δείγματος είναι το άθροισμα του αριθμού των γόνιμων αυγών που παράγει κάθε ζεύγος ζευγαρώματος διαιρούμενο διά του αθροίσματος του αριθμού των αυγών που παράγει το συγκεκριμένο ζεύγος. Στατιστικά, η γονιμότητα αναλύεται ως αναλογία ανά πανομοιότυπο δείγμα. Η εκκολαψιμότητα πανομοιότυπου δείγματος είναι ο αριθμός των εκκολαφθέντων ιχθυδίων διαιρούμενος διά του πληθυσμιακού φόρτου εμβρύων (συνήθως 20). Στατιστικά, η εκκολαψιμότητα αναλύεται ως αναλογία ανά πανομοιότυπο δείγμα.

Δειγματοληψία ενήλικων ψαριών και αξιολόγηση παραμέτρων

Δειγματοληψία ψαριών ζευγών ζευγαρώματος

48. Μετά τη 17η εβδομάδα δοκιμής (δηλ. μετά την επιτυχή έναρξη της γενεάς F2), τα ενήλικα ψάρια της γενεάς F1 θανατώνονται με ευθανασία και αξιολογούνται διάφορες παράμετροι (βλ. πίνακες 1 και 2). Λαμβάνεται εικόνα του εδρικού πτερυγίου για την αξιολόγηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (βλ. προσάρτημα 8), και/ή η ουρά, ακριβώς πίσω από την αμάρα, αφαιρείται και διατηρείται σε μέσο μονιμοποίησης για καταμέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων αργότερα. Μπορεί να πραγματοποιηθεί δειγματοληψία τμήματος του ουραίου πτερυγίου, το οποίο αρχειοθετείται σε αυτό το στάδιο για επαλήθευση του γενετικού φύλου (*dmy*), εφόσον είναι επιθυμητό. Εφόσον απαιτείται, μπορεί να λαμβάνεται δείγμα ιστού με σκοπό την επανάληψη της ανάλυσης *dmy* με σκοπό την επαλήθευση του γενετικού φύλου συγκεκριμένου ψαριού. Ανοίγεται η σωματική κοιλότητα ώστε να επιτραπεί η διαβροχή με κατάλληλα μέσα μονιμοποίησης (π.χ. Davidson), πριν από την εμβύθιση ολόκληρου του σώματος στο μέσο μονιμοποίησης. Εντούτοις, εάν έχει προηγηθεί εκτέλεση κατάλληλου σταδίου αύξησης της διαπερατότητας, δεν είναι απαραίτητο να ανοιχθεί η σωματική κοιλότητα.

Ιστοπαθολογία

49. Αξιολογείται η ιστοπαθολογική εικόνα κάθε ψαριού για τον εντοπισμό παθολογικών καταστάσεων στον γοναδικό ιστό (30), (29). Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 33, άλλες σχετιζόμενες με τον μηχανισμό δράσης παράμετροι που αξιολογούνται στην παρούσα δοκιμασία (δηλ. VTG, SSC και ορισμένες επιδράσεις στην ιστοπαθολογία των γονάδων) ενδέχεται να επηρεάζονται από συστηματικές ή άλλες τοξικότητες. Κατά συνέπεια, μπορεί επίσης να αξιολογείται διεξοδικά η ιστοπαθολογία του ήπατος και των νεφρών με σκοπό την καλύτερη κατανόηση τυχόν αποκρίσεων στις μηχανιστικές παραμέτρους. Εντούτοις, ακόμη κι αν δεν διεξαχθούν αυτές οι αναλυτικές αξιολογήσεις, τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες που παρατηρούνται περιστασιακά κατά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια προσέγγιση «καθοδικής ανάγνωσης» από την ομάδα υψηλότερης δόσης αγωγής (σε σύγκριση με τον μάρτυρα) μέχρι τη δόση που δεν εμφανίζει επίδραση, ωστόσο καλό είναι να ανατρέχετε στο υλικό καθοδήγησης για την ιστοπαθολογία (29). Συνήθως, όλα τα δείγματα υποβάλλονται σε επεξεργασία/ανατέμνονται και κατόπιν αξιολογούνται από τον ιστοπαθολόγο. Εάν χρησιμοποιείται προσέγγιση καθοδικής ανάγνωσης, επισημαίνεται ότι η διαδικασία Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) βασίζεται στην προσδοκία ότι η αύξηση των επιπέδων δόσης θα συνοδεύεται επίσης από αύξηση των βιολογικών επιπτώσεων (της παθολογικής κατάστασης). Ως εκ τούτου, η στατιστική ισχύς θα μειωθεί εάν εξετάζεται μόνο μία υψηλή δόση, χωρίς ενδιάμεσες δόσεις. Σε περίπτωση που δεν είναι απαραίτητη η διενέργεια στατιστικής ανάλυσης προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η υψηλή δόση δεν έχει καμία επίδραση, η προσέγγιση αυτή μπορεί να είναι αποδεκτή. Από την αξιολόγηση αυτή προκύπτει επίσης ο γοναδικός φαινότυπος.
Άλλες παρατηρήσεις

50. Η δοκιμή MEOGRT παρέχει δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης) για την ταυτόχρονη αξιολόγηση τουλάχιστον δύο τύπων οδών δυσμενούς έκβασης (AOP) που έχουν ως αποτέλεσμα εξασθένιση του αναπαραγωγικού συστήματος: α) οδοί μέσω του ενδοκρινικού συστήματος που περιλαμβάνουν τη διατάραξη του ενδοκρινικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG)· και β) οδοί που προκαλούν μείωση της επιβίωσης, της σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος) και της αναπαραγωγής μέσω τοξικότητας που δεν διαμεσολαβείται από το ενδοκρινικό σύστημα. Παράμετροι που μετρώνται συνήθως στις δοκιμές χρόνιας τοξικότητας, όπως η δοκιμή πλήρους κύκλου ζωής και η δοκιμή πρώιμων σταδίων ζωής, περιλαμβάνονται και στην παρούσα δοκιμή, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των κινδύνων που ενέχουν τόσο οι τρόποι δράσης που δεν διαμεσολαβούνται από το ενδοκρινικό σύστημα όσο και οι οδοί τοξικότητας που διαμεσολαβούνται από το ενδοκρινικό σύστημα. Στη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η συμπεριφορά και να καταγράφεται τυχόν ασυνήθης συμπεριφορά. Επιπλέον, τυχόν θνησιμότητα θα πρέπει να καταγράφεται, και θα πρέπει να υπολογίζεται η επιβίωση μέχρι την απομάκρυνση των ψαριών (εβδομάδα δοκιμής 6/7), η επιβίωση μετά την απομάκρυνση μέχρι τη δειγματοληψία ψαριών πριν την ενηλικίωση (εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση 9-10), και η επιβίωση από το ζευγάρωμα μέχρι τη δειγματοληψία των ενήλικων ψαριών.

Πίνακας 1

Επισκόπηση παραμέτρων της MEOGRT (*)

Στάδιο κύκλου ζωής	Παράμετρος	Γενεά
Έμβρυα (2 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Εκκόλαψη (% και χρόνος μέχρι την εκκόλαψη)	F1, F2
Ιχθύδια (4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
Πριν την ενηλικίωση (9 ή 10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
	Σωματική αύξηση (μήκος και βάρος)	
	Λεκιθογενίνη (mRNA ή πρωτεΐνη)	
	Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου)	
	Αναλογία εξωτερικών σεξουαλικών χαρακτηριστικών	
	Χρόνος μέχρι την 1η ωοτοκία	
Ενήλικα άτομα (12-14 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Αναπαραγωγή (γεννητικότητα και γονιμότητα)	F0, F1
Ενήλικα άτομα (15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
	Σωματική αύξηση (μήκος και βάρος)	
	Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου)	
	Ιστοπαθολογία (γονάδα, ήπαρ, νεφρός)	

(*) Αυτές οι παράμετροι πρέπει να αναλύονται στατιστικά

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

51. Στον πίνακα 2 φαίνεται το χρονοδιάγραμμα της δοκιμής MEOGRT. Η δοκιμή MEOGRT περιλαμβάνει 4 εβδομάδες έκθεσης ενήλικων ατόμων της γενεάς F0 και 15 εβδομάδες έκθεσης της γενεάς F1, και περίοδο έκθεσης για τη δεύτερη γενεά (F2), μέχρι την εκκόλαψη (2 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση). Όλες οι δραστηριότητες της MEOGRT συνοψίζονται στο προσάρτημα 9.

Πίνακας 2

Χρονοδιαγράμματα της δοκιμής MEOGRT για τις παραμέτρους της έκθεσης και της μέτρησης

Χρονοδιάγραμμα της δοκιμής MEOGRT για τις παραμέτρους της έκθεσης και της μέτρησης

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Εβδομάδα	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Στάδιο κύκλου ζωής				**Έμβρυα**						**Προνύμφες**					**Νεαρά**			**Πριν την ενηλικίωση**	**Ενήλικα άτομα**
Παράμετροι																			
Γεννητικότητα	F_0														F_1				
Γονιμότητα	F_0														F_1				
Εκκόλαψη					F_1														F_2
Επιβίωση						F_1						F_1						F_1	
Σωματική αύξηση				F_0								F_1						F_1	
Λεκιθογενίνη												F_1							
Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου												F_1						F_1	
Ιστοπαθολογία																		F_1	
Εβδομάδα δοκιμής	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Ο σχεδιασμός του πειράματος περιλαμβάνει 7 ομάδες πανομοιότυπων δειγμάτων
  - 5 για αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία
  - 2 για αγωγές μάρτυρα (4 εάν χρησιμοποιείται διαλύτης)
- Σχεδιασμός εντός των ομάδων
  - 12 πανομοιότυπα δείγματα για την αναπαραγωγή, παθολογικές καταστάσεις και SSC ενήλικων ατόμων (εβδομάδες 10 έως 18)
  - 6 πανομοιότυπα δείγματα για εκκόλαψη, επιβίωση, Vtg, και - SSC και σωματική αύξηση ατόμων πριν την ενηλικίωση (εβδομάδες 1 έως 9)

SSC: δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου

Vtg: λεκιθογενίνη

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στατιστική ανάλυση

52. Δεδομένου ότι το γενετικό φύλο προσδιορίζεται για όλα τα ψάρια της δοκιμής, τα δεδομένα θα πρέπει να αναλύονται ως προς κάθε γενετικό φύλο χωριστά (δηλ. τα αρσενικά XY και τα θηλυκά XX). Αν αυτό δεν συμβεί, θα μειωθεί η στατιστική ισχύς οποιασδήποτε ανάλυσης. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) του ΟΟΣΑ (32). Στο προσάρτημα 10 παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τη στατιστική ανάλυση.

53. Ο σχεδιασμός της δοκιμής και η επιλογή των στατιστικών ελέγχων θα πρέπει να παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ για την ανίχνευση των μεταβολών με βιολογική σημασία στις παραμέτρους για τις οποίες πρέπει να αναφερθεί NOEC (32). Η αναφορά των σχετικών συγκεντρώσεων και παραμέτρων με επίδραση μπορεί να εξαρτάται από το κανονιστικό πλαίσιο. Σε κάθε παράμετρο θα πρέπει να προσδιορίζεται η ποσοστιαία μεταβολή που είναι σημαντικό να ανιχνευθεί ή να εκτιμηθεί. Ο πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να είναι ειδικά προσαρμοσμένος έτσι ώστε να παρέχει αυτή τη δυνατότητα. Είναι απίθανο να ισχύει η ίδια ποσοστιαία μεταβολή για όλες τις παραμέτρους, ούτε είναι εφικτό να σχεδιαστεί ένα πείραμα που θα πληροί αυτά τα κριτήρια για όλες τις παραμέτρους και, ως εκ τούτου, έχει σημασία για τον κατάλληλο σχεδιασμό του πειράματος η εστίαση στις παραμέτρους που είναι σημαντικές για το αντίστοιχο πείραμα. Στο προσάρτημα 10 διατίθεται ένα στατιστικό διάγραμμα ροής και καθοδήγηση που βοηθούν στην επεξεργασία των δεδομένων και στην επιλογή του καταλληλότερου στατιστικού ελέγχου ή μοντέλου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στατιστικές προσεγγίσεις, εφόσον αυτό δικαιολογείται επιστημονικά.

54. Είναι απαραίτητο να αναλύονται οι μεταβολές σε κάθε σειρά πανομοιότυπων δειγμάτων με διαδικασίες ανάλυσης διασποράς ή πίνακα συνάφειας και να χρησιμοποιούνται κατάλληλες και επαρκείς μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης με βάση αυτή την ανάλυση. Για την πολλαπλή σύγκριση των αποτελεσμάτων στις επιμέρους συγκεντρώσεις με τα αποτελέσματα από τους μάρτυρες, συνιστάται η διαδικασία αποκλιμάκωσης (step-down) (π.χ. ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra) για συνεχείς αποκρίσεις. Όταν τα δεδομένα δεν είναι συμβατά με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο έλεγχος του Dunnett ή του Dunn (μετά από επαρκή μετασχηματισμό δεδομένων, εφόσον απαιτείται).

55. Για τη γεννητικότητα, πραγματοποιούνται καθημερινά μετρήσεις των αυγών οι οποίες μπορούν, ωστόσο, να αναλύονται ως συνολικοί αριθμοί αυγών ή ως επαναλαμβανόμενη μέτρηση. Στο προσάρτημα 10 παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης της εν λόγω παραμέτρου. Για τα ιστοπαθολογικά δεδομένα σε μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας, έχει αναπτυχθεί ένας νέος στατιστικός έλεγχος, ο έλεγχος Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Κάθε παρατηρούμενη παράμετρος στο πλαίσιο αγωγών με χημική ουσία η οποία παρουσιάζει σημαντική απόκλιση από τους κατάλληλους μάρτυρες θα πρέπει να αναφέρεται.

Θέματα ανάλυσης δεδομένων

Χρήση υπονομευμένων επιπέδων αγωγής

57. Προκειμένου να καθοριστεί εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα ή μια ολόκληρη αγωγή παρουσιάζει έκδηλη τοξικότητα και θα πρέπει να εξαιρεθεί από την ανάλυση, εξετάζεται μια σειρά παραγόντων. Η έκδηλη τοξικότητα ορίζεται ως η εμφάνιση > 4 θανάτων σε οποιοδήποτε πανομοιότυπο δείγμα μεταξύ της 3ης εβδομάδας μετά τη γονιμοποίηση και της 9ης εβδομάδας μετά τη γονιμοποίηση, η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε τεχνικό σφάλμα. Άλλες ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν την αιμορραγία, μη φυσιολογικές συμπεριφορές, μη φυσιολογικούς τρόπους κολύμβησης, ανορεξία και άλλες κλινικές ενδείξεις ασθένειας. Για υποθανατηφόρες ενδείξεις τοξικότητας, ενδέχεται να χρειάζονται ποιοτικές αξιολογήσεις, οι οποίες θα πρέπει πάντα να πραγματοποιούνται σε συνάρτηση με την ομάδα-μάρτυρα νερού αραίωσης (μόνο καθαρό νερό). Εάν είναι εμφανής έκδηλη τοξικότητα στις αγωγές με την υψηλότερη δόση, συνιστάται να λογοκρίνονται οι αγωγές αυτές από την ανάλυση.

Μάρτυρες με διαλύτη

58. Το ενδεχόμενο χρήσης διαλύτη θα πρέπει να εξετάζεται μόνο ως έσχατη λύση, αφού έχουν εξεταστεί όλες οι άλλες δυνατότητες χορήγησης της χημικής ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν μάρτυρα νερού αραίωσης. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη. Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα νερού αραίωσης. Οι πλέον κατάλληλες παράμετροι προς εξέταση στην ανάλυση αυτή είναι οι παράγοντες της σωματικής αύξησης (βάρος), καθώς αυτές επηρεάζονται από τυχόν γενικευμένη τοξικότητα. Σε περίπτωση εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των ομάδων μάρτυρα νερού αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η βέλτιστη κρίση ειδικών προκειμένου να προσδιοριστεί το κατά πόσον υπονομεύεται η εγκυρότητα της δοκιμής. Εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων, οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη, εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εάν δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μάρτυρα, συνιστάται οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία να συγκρίνονται με τις συγχωνευμένες ομάδες (ομάδες μάρτυρα με διαλύτη και μάρτυρα νερού αραίωσης), εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα νερού αραίωσης είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

59. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία: φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας,

Μονοσυστατική ουσία:

— φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

— περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Είδος δοκιμής:

— επιστημονική ονομασία, φυλή εάν είναι γνωστή, προέλευση και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός.

Συνθήκες δοκιμής:

— φωτοπερίοδος/-οι,

— σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. μέγεθος και υλικό θαλάμου, όγκος νερού, αριθμός θαλάμων δοκιμής και πανομοιότυπων δειγμάτων, αριθμός ιχθυδίων ανά πανομοιότυπο δείγμα),

— μέθοδος παρασκευής των αποθεματικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρονται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται),

— μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης),

— η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετριέται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετριέται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, οι μέσοι όροι των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους,

— ποιότητα του νερού μέσα στα δοχεία δοκιμής, pH, θερμοκρασία (καθημερινά) και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα:

— ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα συνολικά κριτήρια επικύρωσης,

— δεδομένα για τον μάρτυρα (και για τον μάρτυρα με διαλύτη, όταν χρησιμοποιείται) και τις ομάδες αγωγής ως εξής: εκκόλαψη (εκκολαψιμότητα και χρόνος μέχρι την εκκόλαψη) για τις γενεές F1 και F2, επιβίωση μετά την εκκόλαψη για τη γενεά F1, σωματική αύξηση (μήκος και σωματικό βάρος) για τη γενεά F1, γονοτυπικό φύλο και σεξουαλική διαφοροποίηση (π.χ. δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου βάσει ιστολογικής εξέτασης των θηλοειδών αποφύσεων του εδρικού πτερυγίου και των γονάδων) για τη γενεά F1, φαινοτυπικό φύλο για τη γενεά F1, δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου) για τη γενεά F1, *vtg* mRNA (ή πρωτεΐνη VTG) για τη γενεά F1, αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας (γονάδα, ήπαρ και νεφρός) για τη γενεά F1 και αναπαραγωγή (γεννητικότητα και γονιμότητα) για τις γενεές F0, F1 (βλ. πίνακες 1 και 2),

— προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση (ανάλυση παλινδρόμησης ή ανάλυση διασποράς) και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικοί έλεγχοι ή στατιστικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν),

— συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε,

— κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (σε p = 0,05), EC_x για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 90 % ή 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους,

— οποιαδήποτε απόκλιση από την εν λόγω μέθοδο δοκιμών και οι αποκλίσεις από τα κριτήρια αποδοχής, και εκτιμήσεις των δυνητικών επιπτώσεων στην έκβαση της δοκιμής.

60. Για τα αποτελέσματα των μετρήσεων παραμέτρων, θα πρέπει να παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους (ει δυνατόν, τόσο ανά πανομοιότυπο δείγμα όσο και ανά συγκέντρωση).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Κεφάλαιο Γ.15 του παρόντος παραρτήματος: Ψάρια, δοκιμασία βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια.

(22) Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία 21 ημερών σε ψάρια: Μια βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής για την οιστρογονική και ανδρογονική δράση, και την αναστολή αρωματάσης.

(23) Κεφάλαιο Γ.41 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών.

(24) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια.

(25) Κεφάλαιο Γ.47 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή τοξικότητας στα αρχικά στάδια ζωής των ψαριών.

(26) Κεφάλαιο Γ.49 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and 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 and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Δοκιμή ELISA: ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης

Γεννητικότητα = αριθμός αυγών

Γονιμότητα = αριθμός βιώσιμων αυγών/γεννητικότητα

Μεσουραίο μήκος (fork length, FL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως το άκρο των μεσαίων ακτίνων του ουραίου πτερυγίου και χρησιμοποιείται σε ψάρια στα οποία είναι δύσκολο να εντοπιστεί η κατάληξη της σπονδυλικής στήλης (www.fishbase.org)

Εκκολαψιμότητα = εκκολάψεις/αριθμό εμβρύων που φορτώνονται στον επωαστήρα

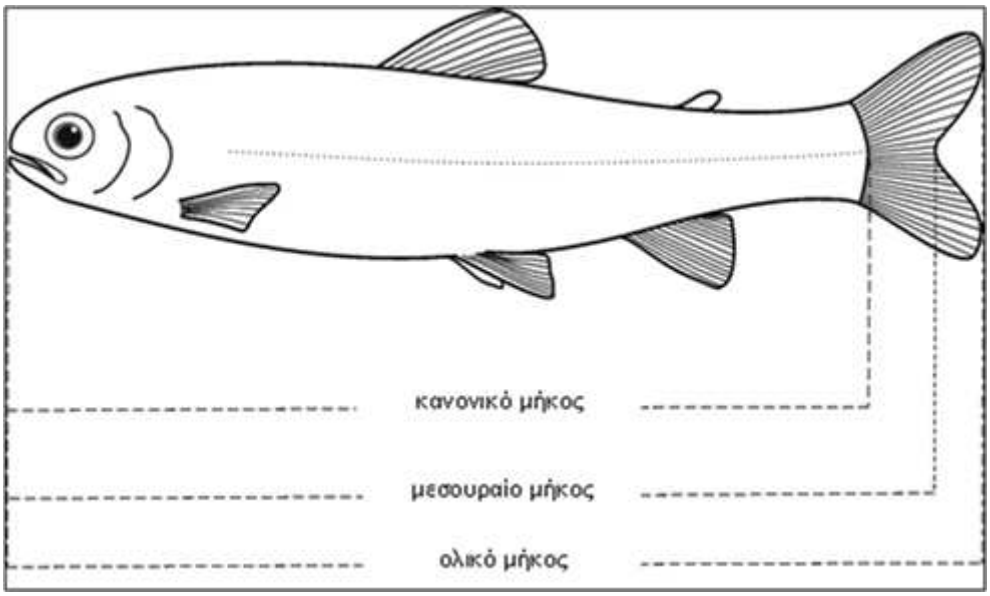
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Θεσμική Επιτροπή Φροντίδας και Χρησιμοποίησης Ζώων)

Κανονικό μήκος (standard length, SL): αναφέρεται στο μήκος ψαριού που μετράται από την άκρη του ρύγχους έως το οπίσθιο άκρο του τελευταίου σπονδύλου ή το οπίσθιο άκρο του μεσοπλάγιου τμήματος της υπουραίας πλάκας. Με απλά λόγια, η μέτρηση αυτή δεν περιλαμβάνει το μήκος του ουραίου πτερυγίου (www.fishbase.org)

Ολικό μήκος (total length, TL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως την άκρη του μακρύτερου λοβού του ουραίου πτερυγίου, που συνήθως μετράται με τους λοβούς συμπιεσμένους κατά μήκος του άξονα συμμετρίας. Πρόκειται για μέτρηση ευθείας γραμμής που δεν ακολουθεί την καμπύλη του σώματος (www.fishbase.org)

Σχήμα 1

Περιγραφή των διαφορετικών χρησιμοποιούμενων μηκών



ECx (συγκέντρωση επίδρασης για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC50 είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε τελικό σημείο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

Δοκιμή συνεχούς ροής: δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής διαμέσου του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης.

Άξονας HPG: άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων.

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας.

Δείκτης πληθυσμιακού φόρτου: το νωπό βάρος ψαριών κατ' όγκο νερού.

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Τα προσαρτήματα 5 και 6 παρέχουν οδηγίες.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC50): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50 % των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

SMILES: (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) προδιαγραφή απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής.

Πυκνότητα πληθυσμού: ο αριθμός ψαριών κατ' όγκο νερού.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

VTG: η λεκιθογενίνη είναι φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

WPF: εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΥΔΑΤΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 μg/l
Αρσενικό	1 μg/l
Χρώμιο	1 μg/l
Κοβάλτιο	1 μg/l
Χαλκός	1 μg/l
Σίδηρος	1 μg/l
Μόλυβδος	1 μg/l
Νικέλιο	1 μg/l
Ψευδάργυρος	1 μg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

Προσάρτημα 3

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΟGRT

1. Συνιστώμενο είδος	Ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*)
2. Τύπος δοκιμής	Συνεχής ροή
3. Θερμοκρασία νερού	Η ονομαστική θερμοκρασία δοκιμής είναι 25°C. Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής σε κάθε δεξαμενή είναι 24-26°C.
4. Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος και ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5. Φωτοπερίοδος	16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι
6. Δείκτης πληθυσμιακού φόρτου	F0: 2 ενήλικα/πανομοιότυπο δείγμα· F1: κατά την έναρξη, 20 αυγά (έμβρυα)/πανομοιότυπο δείγμα κατ' ανώτατο όριο, που μειώνονται σε 12 έμβρυα/πανομοιότυπο δείγμα κατά την εκκόλαψη, κατόπιν 2 ενήλικα (ζεύγος αναπαραγωγής XX-XY) στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση για το αναπαραγωγικό στάδιο
7. Ελάχιστος ωφέλιμος όγκος θαλάμου δοκιμής	1,8 l (π.χ. μέγεθος θαλάμου 18x9x15 cm)
8. Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής	Τουλάχιστον 5 ανανεώσεις όγκου/ημέρα έως και 16 ανανεώσεις όγκου/ημέρα (ή ροή 20 ml/λεπτό)
9. Ηλικία των υπό δοκιμή οργανισμών κατά την έναρξη	F0: > 12 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αλλά συνιστάται να μην υπερβαίνονται οι 16 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση
10. Αριθμός οργανισμών ανά πανομοιότυπο δείγμα	F0: 2 ψάρια (ζεύγος αρσενικού και θηλυκού)· F1: 20 ψάρια (αυγά)/πανομοιότυπο δείγμα κατ' ανώτατο όριο (παραγόμενα από ζεύγη αναπαραγωγής F0 και F1).
11. Αριθμός αγωγών	5 αγωγές με υπό δοκιμή χημική ουσία συν κατάλληλοι μάρτυρες
12. Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή	Τουλάχιστον 6 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή για υπό δοκιμή χημική ουσία και τουλάχιστον 12 πανομοιότυπα δείγματα για μάρτυρα και μάρτυρα με διαλύτη, αν χρησιμοποιείται (ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων διπλασιάζεται στην αναπαραγωγική φάση στην F1)
13. Αριθμός οργανισμών ανά δοκιμή	Τουλάχιστον 84 ψάρια στην F0 και 504 στην F1. (Εάν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη, 108 ψάρια στην F0 και 648 ψάρια στην F1). Ως μονάδα μέτρησης λαμβάνεται το στάδιο μετά το λεκιθοφόρο ιχθύδιο.
14. Πρόγραμμα σίτισης	Τα ψάρια τρέφονται με γαρίδες άλμης *Artemia* spp. (ναύπλιοι ηλικίας 24 ωρών) κατά βούληση και, εφόσον χρειαστεί, παρέχεται συμπλήρωμα τροφής του εμπορίου σε νιφάδες (παράδειγμα προγράμματος σίτισης για την εξασφάλιση κατάλληλης ανάπτυξης και σωματικής αύξησης που υποστηρίζει την εύρωστη αναπαραγωγή δίνεται στο προσάρτημα 5).
15. Αερισμός	Κανένας, εκτός εάν το διαλυμένο οξυγόνο φθάσει < 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα
16. Νερό αραίωσης	Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, γεώτρηση ή ανασύσταση ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης.

17. Περίοδος έκθεσης	Επί το πλείστον 19 εβδομάδες (από F0 έως εκκόλαψη F2)
18. Βιολογικές παράμετροι (κύριες)	Εκκολαψιμότητα (F1 και F2)· επιβίωση [F1, από εκκόλαψη έως 4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (τέλος προνυμφικού σταδίου/έναρξη νεαρού σταδίου), από 4 έως 9 (ή 10) εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (έναρξη νεαρού σταδίου έως υποενηλικίωση) και από 9 έως 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (υποενηλικίωση έως λήξη ενήλικου σταδίου)]· σωματική αύξηση (F1, μήκος και βάρος στις 9 και 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· δευτερεύοντα χαρακτηριστικά φύλου (F1, θηλές εδρικού πτερυγίου στις 9 και 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· λεκιθογενίνη (F1, *vtg* mRNA ή πρωτεΐνη VTG στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· φαινοτυπικό φύλο (F1, μέσω ιστολογικής εξέτασης των γονάδων στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· αναπαραγωγή (F0 και F1, γεννητικότητα και γονιμότητα επί 21 ημέρες)· χρόνος ωοτοκίας (F1)· και ιστοπαθολογία (F1, γονάδες, ήπαρ και νεφρός στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)
19. Κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο ≥ 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα· μέση θερμοκρασία νερού 24-26°C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής· επιτυχής αναπαραγωγή ≥ 65 % των θηλυκών μαρτύρων· μέση ημερήσια γεννητικότητα 20 των αυγών των μαρτύρων· Εκκολαψιμότητα ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) των μαρτύρων (σε καθεμία από τις F1 και F2)· επιβίωση μετά την εκκόλαψη έως 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση ≥ 80 % (μέσος όρος) και από 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση έως τη θανάτωση της γενεάς ≥ 90 % (μέσος όρος) των μαρτύρων (F1), οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα θα πρέπει να διατηρούνται σε ικανοποιητικό επίπεδο εντός ± 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών.

Προσάρτημα 4

ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΤΙΜΕΣ ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι αυτές οι τιμές μαρτύρων βασίζονται σε περιορισμένο αριθμό μελετών επικύρωσης και ενδέχεται να τροποποιηθούν βάσει περαιτέρω εμπειρίας.

Σωματική αύξηση

Λαμβάνονται μετρήσεις βάρους και μήκους για όλα τα άτομα της δειγματοληψίας στις 9 (ή 10) και στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (wpf). Με αυτό το πρωτόκολλο, το προσδοκώμενο υγρό βάρος στις 9 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι 85-145 mg για τα αρσενικά και 95-150 mg για τα θηλυκά. Το προσδοκώμενο βάρος στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι 250-330 mg για τα αρσενικά και 280-350 mg για τα θηλυκά. Παρότι ενδέχεται να υπάρχουν αποκλίσεις από αυτές τις τιμές σε μεμονωμένα άτομα, εάν το μέσο βάρος των μαρτύρων αποκλίνει σημαντικά από αυτές τις κλίμακες τιμών, ιδίως το κατώτερο όριο, τότε ενδέχεται να υπάρχουν προβλήματα σίτισης, ελέγχου της θερμοκρασίας, ποιότητας του νερού, ασθένειας ή συνδυασμός αυτών των παραγόντων.

Εκκόλαψη

Η επιτυχία εκκόλαψης των μαρτύρων κυμαίνεται συνήθως στο 90 %, εντούτοις δεν είναι σπάνιες τιμές που περιορίζονται στο 80 %. Επιτυχία εκκόλαψης κάτω του 75 % μπορεί να υποδηλώνει ανεπαρκή ανακίνηση των αναπτυσσόμενων αυγών ή ακατάλληλη φροντίδα στον χειρισμό των αυγών, όπως παράλειψη έγκαιρης απομάκρυνσης των νεκρών αυγών, που οδηγεί σε προσβολή από μύκητες.

Επιβίωση

Τα ποσοστά επιβίωσης από την εκκόλαψη έως 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση και μετά τις 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι συνήθως 90 % ή υψηλότερα για τους μάρτυρες, αλλά αν τα ποσοστά επιβίωσης στα πρώιμα στάδια της ζωής μειώνονται σε επίπεδο έως και 80 % των μαρτύρων δεν θεωρούνται ανησυχητικά. Ποσοστά επιβίωσης των μαρτύρων κάτω του 80 % θα πρέπει να προκαλέσουν ανησυχία και ενδέχεται να υποδηλώνουν ανεπαρκή καθαρισμό των ενυδρείων που οδηγεί σε απώλεια ατόμων σε προνυμφικό στάδιο λόγω ασθένειας ή εξαιτίας ασφυξίας που οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου. Η θνησιμότητα μπορεί επίσης να οφείλεται σε τραυματισμούς κατά τον καθορισμό της δεξαμενής και σε απώλειες ψαριών σε προνυμφικό στάδιο στο σύστημα αποστράγγισης της δεξαμενής.

Γονίδιο λεκιθογενίνης

Παρότι σε απόλυτα επίπεδα το γονίδιο της λεκιθογενίνης (*vtg*), εκφρασμένο ως αντίγραφα/ng ολικού mRNA, ενδέχεται να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ εργαστηρίων λόγω των διαδικασιών ή του συστήματος οργάνων που χρησιμοποιούνται, η αναλογία *vtg* θα πρέπει να είναι περίπου 200 φορές μεγαλύτερη στους θηλυκούς μάρτυρες σε σύγκριση με τους αρσενικούς μάρτυρες. Εντούτοις, δεν είναι σπάνιο η αναλογία αυτή να ανέρχεται σε τιμές 1.000 έως 2.000, ενώ αναλογίες κάτω του 200 είναι ύποπτες και ενδέχεται να υποδηλώνουν προβλήματα μόλυνσης του δείγματος ή προβλήματα στην διαδικασία και/ή στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται.

Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

Στα αρσενικά, το κανονικό εύρος δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου, που ορίζονται ως ο συνολικός αριθμός των τμημάτων των ακτίνων των θηλών του εδρικού πτερυγίου, είναι 40-80 στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση. Στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, ο αριθμός στους αρσενικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι περίπου 80-120 και στους θηλυκούς μάρτυρες 0. Για λόγους που παραμένουν ανεξήγητοι, σε σπάνιες περιπτώσεις ορισμένα αρσενικά δεν εμφανίζουν θηλές πριν από τις 9 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αλλά δεδομένου ότι όλοι οι αρσενικοί μάρτυρες αναπτύσσουν θηλές έως τις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αυτό οφείλεται πιθανότατα σε καθυστερημένη ανάπτυξη. Η παρουσία θηλών σε θηλυκούς μάρτυρες υποδεικνύει την παρουσία αρσενικών XX στον πληθυσμό.

Αρσενικά XX

Η κανονική συχνότητα εμφάνισης αρσενικών XX στην καλλιέργεια είναι περίπου 4 % ή λιγότερο στους 25°C, ενώ παρατηρείται αυξημένη συχνότητα με την αύξηση της θερμοκρασίας. Θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την ελαχιστοποίηση της αναλογίας των αρσενικών XX στον πληθυσμό. Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης αρσενικών XX οφείλεται εν μέρει σε γενετικό παράγοντα και συνεπώς είναι κληρονομήσιμη, αποτελεσματικό μέσο μείωσης της εμφάνισης αρσενικών XX στον πληθυσμό είναι η παρακολούθηση του αποθέματος της καλλιέργειας και η αποφυγή χρήσης αρσενικών XX για τον πολλαπλασιασμό του.

Δραστηριότητα ωοτοκίας

Η δραστηριότητα ωοτοκίας στα πανομοιότυπα δείγματα-μάρτυρες θα πρέπει να παρακολουθείται καθημερινά πριν από τη διενέργεια αξιολόγησης της γεννητικότητας. Τα ζεύγη μαρτύρων μπορούν να αξιολογηθούν σε ποιοτικό επίπεδο οπτικά για τον εντοπισμό στοιχείων που υποδηλώνουν δραστηριότητα ωοτοκίας. Έως τις 12-14 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση θα πρέπει να παρατηρηθεί ωοτοκία στα περισσότερα ζεύγη μαρτύρων. Μικρός αριθμός ζευγών αναπαραγωγής κατά την περίοδο αυτή υποδηλώνει ενδεχόμενα προβλήματα υγείας, ωριμότητας ή ευζωίας των ψαριών.

Γεννητικότητα

Στα υγιή ρυζόψαρα ηλικίας 12-14 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση, που σιτίζονται σωστά, η ωοτοκία είναι συνήθως καθημερινή, με παραγωγή που κυμαίνεται από 15 έως 50 αυγά ανά ημέρα. Η παραγωγή αυγών στα 16 από τα προτεινόμενα 24 ζεύγη αναπαραγωγής μαρτύρων (> 65 %) θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 αυγά ανά ημέρα και μπορεί να φθάσει τα 40 αυγά ανά ημέρα. Χαμηλότερη ποσότητα μπορεί να υποδηλώνει ανώριμα, υποσιτιζόμενα ή μη υγιή αναπαραγωγικά ζεύγη.

Γονιμότητα

Το ποσοστό γόνιμων αυγών στα αναπαραγωγικά ζεύγη μαρτύρων είναι κατά κανόνα της τάξης του 90 %, ενώ δεν είναι σπάνιες οι τιμές άνω του 90 %. Ποσοστά γονιμότητας κάτω του 80 % των αυγών των μαρτύρων είναι ύποπτα και μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη μη υγιών ατόμων ή μη ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας.

Προσάρτημα 5

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΙΤΙΣΗΣ

Στον πίνακα 1 δίνεται ένα παράδειγμα προγράμματος σίτισης για την εξασφάλιση σωστής ανάπτυξης και σωματικής αύξησης, που υποστηρίζει την εύρωστη αναπαραγωγή. Οι αποκλίσεις από αυτό το πρόγραμμα σίτισης είναι αποδεκτές, αλλά συνιστάται η δοκιμή τους για να εξακριβωθεί ότι παρατηρείται αποδεκτό επίπεδο σωματικής αύξησης και αναπαραγωγής. Προκειμένου να ακολουθηθεί το προτεινόμενο πρόγραμμα σίτισης, θα πρέπει πριν από την έναρξη της δοκιμής να προσδιοριστεί το ξηρό βάρος γαρίδων άλμης ανά όγκο πολτού γαρίδων άλμης. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζύγιση ενός προσδιορισμένου όγκου πολτού γαρίδων άλμης ο οποίος έχει ξηρανθεί επί 24 ώρες στους 60 °C σε προζυγισμένα σκεύη. Για να προσμετρηθεί το βάρος του άλατος στον πολτό, θα πρέπει να ξηρανθεί αντίστοιχος όγκος του διαλύματος άλατος που χρησιμοποιήθηκε στον πολτό. Εναλλακτικά, οι γαρίδες άλμης μπορούν να περάσουν από διήθηση και έκπλυση με απεσταγμένο νερό πριν από την ξήρανση, ώστε να μη χρειάζεται να μετρηθεί το βάρος του «τυφλού διαλύματος άλατος». Τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή των στοιχείων του πίνακα από ξηρό βάρος γαρίδων άλμης σε όγκο πολτού γαρίδων άλμης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη σίτιση ανά άτομο. Επιπλέον, συνιστάται οι κατάλληλες δόσεις πολτού γαρίδων άλμης να ζυγίζονται σε εβδομαδιαία βάση, ώστε να επαληθεύεται ότι χορηγείται το σωστό ξηρό βάρος γαρίδων άλμης.

Πίνακας 1

Παράδειγμα προγράμματος σίτισης

Χρόνος (μετά την εκκόλαψη)	Γαρίδες άλμης (mg ξηρού βάρους/ψάρι/ημέρα)
1η ημέρα	0,5
2η ημέρα	0,5
3η ημέρα	0,6
4η ημέρα	0,7
5η ημέρα	0,8
6η ημέρα	1,0
7η ημέρα	1,3
8η ημέρα	1,7
9η ημέρα	2,2
10η ημέρα	2,8
11η ημέρα	3,5
12η ημέρα	4,2
13η ημέρα	4,5

Χρόνος (μετά την εκκόλαψη)	Γαρίδες άλμης (mg ξηρού βάρους/ψάρι/ημέρα)
14η ημέρα	4,8
15η ημέρα	5,2
16η-21η ημέρα	5,6
4η εβδομάδα	7,7
5η εβδομάδα	9,0
6η εβδομάδα	11,0
7η εβδομάδα	13,5
8η εβδομάδα-θανάτωση	22,5

Προσάρτημα 6

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΑΛΑΜΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΑΥΓΩΝ

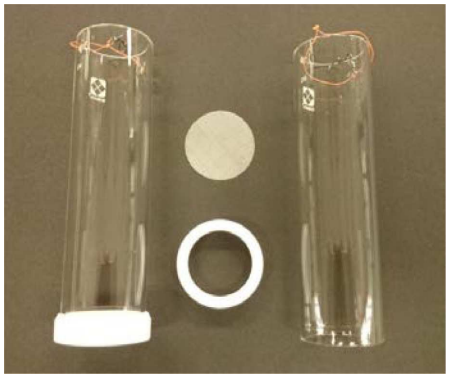
Παράδειγμα Α





Ο επωαστήρας αυτός αποτελείται από έναν γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου κομμένο εγκάρσια, ο οποίος συνδέεται με θήκη από ανοξείδωτο χάλυβα και συγκρατείται στη θέση του από το κοχλιωτό πώμα φυγοκέντρησης. Ένα μικρός σωλήνας από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα προβάλλει διαμέσου του πώματος και τοποθετείται κοντά στον στρογγυλό πυθμένα, διοχετεύοντας αέρα με αργό ρυθμό ώστε να αιωρούνται τα αυγά και να μειώνεται η μετάδοση μολύνσεων από σαπροφυτικούς μύκητες μεταξύ των αυγών, ενώ παράλληλα διευκολύνεται η ανταλλαγή χημικών ουσιών μεταξύ του επωαστήρα και της δεξαμενής συγκράτησης.

Παράδειγμα Β





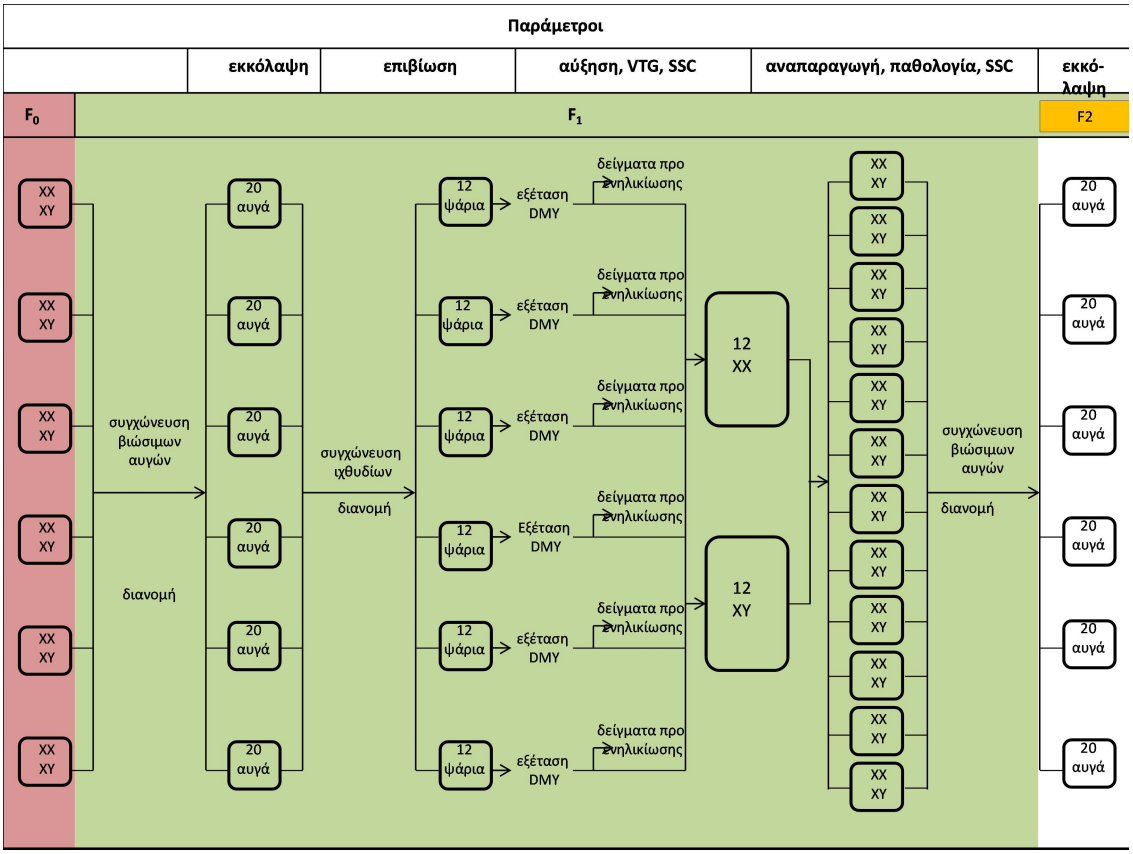
Ο επωαστήρας αυτός αποτελείται από ένα γυάλινο κυλινδρικό σώμα (διαμέτρου 5 cm και ύψους 10 cm) και συρματόπλεγμα από ανοξείδωτο χάλυβα (0,25 φ και μεγέθους ματιού 32), το οποίο προσδένεται στον πυθμένα του σώματος με έναν δακτύλιο PTFE. Οι επωαστήρες αναρτώνται από τη ράβδο ανύψωσης στις δεξαμενές και ανακινούνται κάθετα (πλάτος περίπου 5 cm) με περιοδικότητα κατάλληλη (περίπου ανά 4 δευτερόλεπτα) για τα αυγά ρυζόψαρου.

Προσάρτημα 7

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΑΤΟΜΩΝ ΣΤΑ ΠΑΝΟΜΟΙΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ MEOGRT

Σχήμα 1

Συγχώνευση και επανασύσταση πανομοιότυπων δειγμάτων στη μέθοδο MEOGRT. Το σχήμα αναπαριστά μία αγωγή ή ½ του μάρτυρα. Λόγω της συγχώνευσης, τα πανομοιότυπα δείγματα δεν παραμένουν τα ίδια καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Να σημειωθεί ότι ο όρος «αυγά» αναφέρεται σε βιώσιμα γονιμοποιημένα αυγά (αντίστοιχα των εμβρύων).



Αγωγή και πανομοιότυπα δείγματα

Η μέθοδος δοκιμής συνιστά πέντε αγωγές με υπό δοκιμή χημική ουσία με χρήση υλικού τεχνικής καθαρότητας και ενός αρνητικού μάρτυρα. Ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή δεν παραμένει σταθερός στη διάρκεια της MEOGRT και ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων στην αγωγή με μάρτυρα είναι διπλάσιος σε σχέση με οποιαδήποτε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην F0, κάθε αγωγή με υπό δοκιμή ουσία έχει έξι πανομοιότυπα δείγματα ενώ η αγωγή με αρνητικό μάρτυρα έχει 12 πανομοιότυπα δείγματα. Συνιστάται ιδιαίτερα η αποφυγή χρήσης διαλυτών και, εφόσον χρησιμοποιούνται, στην έκθεση MEOGRT θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται αιτιολόγηση αφενός της χρήσης του διαλύτη και, αφετέρου, της επιλογής του διαλύτη. Επίσης, εάν χρησιμοποιηθεί διαλύτης, απαιτούνται δύο τύποι μαρτύρων: α) μάρτυρας με διαλύτη και β) αρνητικός μάρτυρας. Καθεμία από τις δύο αυτές ομάδες μαρτύρων θα πρέπει να αποτελείται από πλήρη σειρά πανομοιότυπων δειγμάτων σε όλα τα σημεία του χρονοδιαγράμματος MEOGRT. Στη διάρκεια της δοκιμής ανάπτυξης οργανισμών γενεάς F1 (και F2, έως την εκκόλαψη), αυτή η δομή πανομοιότυπων δειγμάτων παραμένει η ίδια. Εντούτοις, στο ενήλικο στάδιο, όταν διαμορφώνονται τα ζεύγη αναπαραγωγής F1, ο αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ζευγών αναπαραγωγής ανά αγωγή ιδανικά διπλασιάζεται· έτσι θα υπάρχουν έως και 12 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία και 24 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων στην ομάδα μαρτύρων (και άλλα 24 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων στον μάρτυρα με διαλύτη, εφόσον χρειαστεί). Ο καθορισμός της εκκόλαψης από έμβρυα που γεννήθηκαν από ζεύγη F1 γίνεται με την ίδια δομή πανομοιότυπων δειγμάτων όπως και με τα έμβρυα που γεννήθηκαν από ζεύγη F0, πράγμα που σημαίνει ότι αρχικά θα υπάρχουν έξι πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία και 12 πανομοιότυπα δείγματα στις ομάδες μαρτύρων.

Προσάρτημα 8

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΘΗΛΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟΦΥΣΕΩΝ ΕΔΡΙΚΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟΥ

Βασικά υλικά και αντιδραστήρια

— Στερεοσκόπιο (προαιρετικά με συνδεδεμένη φωτογραφική μηχανή)

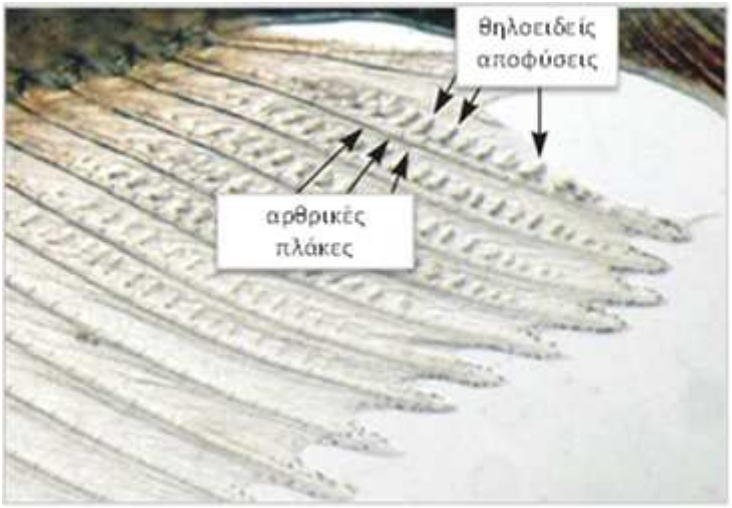
— Μέσο μονιμοποίησης [π.χ. Davidson (δεν συνιστάται το μέσο του Bouin)], σε περίπτωση που η μέτρηση δεν πραγματοποιείται από εικόνα

Διαδικασίες

Μετά τη νεκροψία/νεκροτομή, θα πρέπει να λαμβάνεται εικόνα του εδρικού πτερυγίου ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου. Παρότι η φωτογράφιση θεωρείται η συνιστώμενη μέθοδος, το εδρικό πτερύγιο μπορεί να μονιμοποιείται με μέσο μονιμοποίησης του Davidson ή άλλο κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης επί περίπου 1 λεπτό. Είναι σημαντικό το εδρικό πτερύγιο να διατηρείται επίπεδο κατά τη μονιμοποίηση ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων. Μέχρι την ανάλυση, το πτώμα με το εδρικό πτερύγιο μπορούν να φυλάσσονται σε μέσο μονιμοποίησης του Davidson ή άλλο μέσο μονιμοποίησης. Μετράται ο αριθμός των αρθρικών πλακών (βλ. **σχήμα 1**) με τις θηλοειδείς αποφύσεις που προεξέχουν από την οπίσθια παρυφή της αρθρικής πλάκας.

Σχήμα 1

Θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου



Προσάρτημα 9

ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΜΕΟGRT

Εβδομάδες δοκιμής 1-3 (F0)

Τα ψάρια ωοτοκίας της γενεάς F0 που πληρούν τα κριτήρια επιλογής (βλ. παραγράφους 16-20) εκτίθενται επί τρεις εβδομάδες προκειμένου να καταστεί εφικτή η έκθεση των αναπτυσσόμενων γαμετών και γοναδικών ιστών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Κάθε δεξαμενή πανομοιότυπων δειγμάτων στεγάζει ένα μεμονωμένο ζεύγος ψαριών αναπαραγωγής (ζεύγος αναπαραγωγής με θηλυκό XX και αρσενικό XY). Τα αυγά της ωοτοκίας συλλέγονται, μετρώνται και αξιολογούνται ως προς τη γονιμότητα επί 21 διαδοχικές ημέρες, με αφετηρία την ημέρα δοκιμής 1.

Εβδομάδα δοκιμής 4 (F0 και F1)

Συνιστάται τα γονιμοποιημένα και βιώσιμα αυγά (έμβρυα) να συλλέγονται σε μία μόνο ημέρα· εντούτοις, εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα, τα έμβρυα μπορούν να συλλέγονται και δεύτερη ημέρα. Εάν συλλέγονται σε δύο ημέρες, όλα τα έμβρυα των αγωγών που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα συγχωνεύονται με τα έμβρυα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη ημέρα. Στη συνέχεια, το σύνολο των συγχωνευμένων εμβρύων για κάθε αγωγή κατανέμεται τυχαία σε καθέναν από τους επωαστήρες πανομοιότυπων δειγμάτων, σε αναλογία 20 εμβρύων ανά επωαστήρα. Οι θνησιμότητες των γονιμοποιημένων αυγών (εμβρύων) ελέγχονται και καταγράφονται καθημερινά. Τα νεκρά αυγά απομακρύνονται από τους επωαστήρες (ο θάνατος γονιμοποιημένων αυγών, ιδίως κατά τα πρώιμα στάδια, διαπιστώνεται από την εμφανή μείωση της διαύγειας και την αλλαγή του φυσικού χρωματισμού, οι οποίες οφείλονται σε πήξη και/ή κατακρήμνιση πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τα αυγά να αποκτούν λευκή, αδιαφανή εμφάνιση, ΟΟΣΑ 2010).

Σημείωση: Σε περίπτωση που για μια μεμονωμένη αγωγή απαιτείται δεύτερη ημέρα συλλογής, η εν λόγω διαδικασία θα πρέπει να ακολουθείται για όλες τις αγωγές (περιλαμβανομένων των μαρτύρων). Εάν μετά τη δεύτερη ημέρα συλλογής οι αριθμοί των εμβρύων εξακολουθούν να μην αρκούν για την τοποθέτηση πληθυσμού 20 εμβρύων ανά επωαστήρα αγωγής, μειώστε τον αριθμό των εμβρύων που τοποθετούνται σε επωαστήρες σε 15 έμβρυα ανά επωαστήρα για τη συγκεκριμένη αγωγή. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα ώστε να τοποθετηθούν 15 ανά επωαστήρα, μειώστε τον αριθμό των επωαστήρων πανομοιότυπων δειγμάτων μέχρις ότου ο αριθμός των εμβρύων να επαρκεί για την τοποθέτηση 15 εμβρύων ανά επωαστήρα. Επιπλέον, μπορούν να προστεθούν περισσότερα ζεύγη αναπαραγωγής ανά αγωγή και μάρτυρες στη γενεά F0 ώστε να παραχθούν περισσότερα αυγά προκειμένου να επιτευχθεί ο συνιστώμενος αριθμός των 20 αυγών ανά επωαστήρα.

Την 24η ημέρα δοκιμής, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 θανατώνονται με ευθανασία, και καταγράφεται το βάρος και το μήκος τους. Εφόσον απαιτείται, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 μπορούν να διατηρούνται επί 1-2 επιπλέον ημέρες προκειμένου να δημιουργηθεί νέα γενεά F1.

Εβδομάδες δοκιμής 5-6 (F1)

Μία ή δύο ημέρες πριν από την αναμενόμενη έναρξη της εκκόλαψης, σταματήστε ή μειώστε την ανάδευση των επωαζόμενων αυγών προκειμένου να επισπεύσετε την εκκόλαψη. Καθώς τα έμβρυα εκκολάπτονται κάθε ημέρα, τα ιχθύδια συγχωνεύονται ανά αγωγή και κατανέμονται συστηματικά σε κάθε δεξαμενή προνυμφών πανομοιότυπων δειγμάτων εντός κάθε ορισμένης αγωγής, έως τον αριθμό των 12 ιχθυδίων. Αυτό γίνεται με τυχαία επιλογή ιχθυδίων και τοποθέτηση ενός μεμονωμένου ιχθυδίου τη φορά σε διαδοχικά πανομοιότυπα δείγματα, αδιακρίτως, κατά σειρά στα επιμέρους πανομοιότυπα δείγματα αγωγής μέχρις ότου όλα τα πανομοιότυπα δείγματα της αγωγής να περιλαμβάνουν 12 ιχθύδια. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά ιχθύδια ώστε να συμπληρωθούν όλα τα πανομοιότυπα δείγματα, φροντίστε ώστε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα να περιλαμβάνουν 12 ιχθύδια προκειμένου να ξεκινήσει η φάση της γενεάς F1.

Τα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί σε χρονικό διάστημα διπλάσιο του διάμεσου αριθμού ημερών εκκόλαψης στον μάρτυρα θεωρούνται μη βιώσιμα και απορρίπτονται. Ο αριθμός των ιχθυδίων καταγράφεται και υπολογίζεται η επιτυχής εκκόλαψη (εκκολαψιμότητα) σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα.

Εβδομάδες δοκιμής 7-11 (F1)

Η επιβίωση των προνυμφών ελέγχεται και καταγράφεται καθημερινά σε όλα τα πανομοιότυπα δείγματα. Την 43η ημέρα δοκιμής, καταγράφεται ο αριθμός των επιβιωσάντων ψαριών σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, καθώς και ο αρχικός αριθμός των ιχθυδίων που είχαν τοποθετηθεί (κανονικά δώδεκα). Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται ο υπολογισμός της ποσοστιαίας επιβίωσης από το στάδιο της εκκόλαψης έως το στάδιο του ατόμου πριν την ενηλικίωση.

Εβδομάδα δοκιμής 12 (F1)

Την ημέρα δοκιμής 78-85 λαμβάνεται μικρό δείγμα από το ουραίο πτερύγιο κάθε ψαριού προκειμένου να προσδιοριστεί το γονοτυπικό φύλο του ατόμου (αποκοπή πτερυγίου) για όλα τα ψάρια. Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος.

Εντός τριών ημερών μετά τον προσδιορισμό του γονοτυπικού φύλου κάθε ψαριού, δημιουργούνται με τυχαίο τρόπο 12 ζεύγη αναπαραγωγής ανά αγωγή και 24 ζεύγη ανά μάρτυρα. Δύο ψάρια XX και XY από κάθε πανομοιότυπο δείγμα επιλέγονται τυχαία, συγχωνεύονται κατά φύλο και, στη συνέχεια, γίνεται τυχαία επιλογή για τη δημιουργία ενός ζεύγους αναπαραγωγής (ζεύγος XX-XY). Δημιουργούνται τουλάχιστον 12 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή με τη χημική ουσία και τουλάχιστον 24 πανομοιότυπα δείγματα για τον μάρτυρα, με ένα ζεύγος αναπαραγωγής ανά πανομοιότυπο δείγμα. Εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα δεν διαθέτει είτε δύο ψάρια XX είτε δύο ψάρια XY για συγχώνευση, τα ψάρια με τον κατάλληλο γονότυπο φύλου θα πρέπει να λαμβάνονται από άλλα δείγματα της ίδιας αγωγής.

Τα εναπομείναντα ψάρια (8 ψάρια ανά πανομοιότυπο δείγμα κατά μέγιστο) θανατώνονται με ευθανασία και πραγματοποιείται δειγματοληψία για τις διάφορες παραμέτρους ατόμων πριν την ενηλικίωση. Τα δεδομένα *dmy* (XX ή XY) για όλα τα δείγματα ατόμων πριν την ενηλικίωση διατηρούνται προκειμένου να διασφαλιστεί ότι όλα τα δεδομένα παραμέτρων μπορούν να συσχετιστούν με το γενετικό φύλο κάθε μεμονωμένου ατόμου.

Εβδομάδες δοκιμής 13-14 (F1)

Η έκθεση συνεχίζεται, καθώς τα ζεύγη αναπαραγωγής ατόμων πριν την ενηλικίωση αναπτύσσονται σε ενήλικα άτομα. Την 98η ημέρα δοκιμής (δηλ. την ημέρα προτού ξεκινήσει η συλλογή των αυγών), τα αυγά απομακρύνονται από τα ενυδρεία και τα θηλυκά.

Εβδομάδες δοκιμής 15-17 (F1)

Τα αυγά ωοτοκίας συλλέγονται καθημερινά επί 21 διαδοχικές ημέρες σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, και αξιολογούνται ως προς τη γεννητικότητα και τη γονιμότητα.

Εβδομάδα δοκιμής 18 (επανάληψη της 4ης εβδομάδας δοκιμής) (F1 και F2)

Το πρωί της 120ης ημέρας δοκιμής γίνεται συλλογή των αυγών σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος. Τα συλλεχθέντα αυγά αξιολογούνται και τα γονιμοποιημένα αυγά (αφού αφαιρεθούν τα νεμάτια) καθενός από τα ζεύγη αναπαραγωγής συγχωνεύονται ανά αγωγή, και κατανέμονται συστηματικά σε θαλάμους επώασης αυγών, με 20 γονιμοποιημένα αυγά ανά επωαστήρα. Οι επωαστήρες μπορούν να τοποθετούνται είτε σε χωριστές «δεξαμενές επωαστήρων» που διαμορφώνονται για κάθε αγωγή είτε στη δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος στην οποία θα τοποθετηθούν μετά την εκκόλαψη οι εκκολαφθείσες προνύμφες. Συνιστάται τα έμβρυα να συλλέγονται σε μία μόνο ημέρα· ωστόσο, εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα, μπορούν να συλλέγονται και δεύτερη ημέρα. Εάν συλλέγονται σε δύο ημέρες, όλα τα έμβρυα των αγωγών που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα συγχωνεύονται με τα έμβρυα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη ημέρα. Στη συνέχεια, το σύνολο των συγχωνευμένων εμβρύων για κάθε αγωγή κατανέμεται τυχαία σε καθέναν από τους επωαστήρες πανομοιότυπων δειγμάτων, σε αναλογία 20 εμβρύων ανά επωαστήρα. Σημείωση: Σε περίπτωση που για μια μεμονωμένη αγωγή απαιτείται δεύτερη ημέρα συλλογής, η ίδια διαδικασία θα πρέπει να ακολουθείται για όλες τις αγωγές (περιλαμβανομένων των μαρτύρων). Εάν μετά τη δεύτερη ημέρα συλλογής οι αριθμοί των εμβρύων εξακολουθούν να μην αρκούν για την τοποθέτηση πληθυσμού 20 εμβρύων ανά επωαστήρα αγωγής, μειώστε τον αριθμό των εμβρύων που τοποθετούνται σε επωαστήρες σε 15 έμβρυα ανά επωαστήρα για τη συγκεκριμένη αγωγή. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα ώστε να τοποθετηθούν 15 ανά επωαστήρα, μειώστε τον αριθμό των επωαστήρων πανομοιότυπων δειγμάτων μέχρις ότου ο αριθμός των εμβρύων να επαρκεί για την τοποθέτηση 15 εμβρύων ανά επωαστήρα.

Την 121η ημέρα δοκιμής (ή την 122η ημέρα δοκιμής, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η F2 θα ξεκινήσει καλά), τα ζεύγη αναπαραγωγής της F1 θανατώνονται και αναλύονται ως προς τις παραμέτρους ενήλικων ατόμων. Εφόσον απαιτείται, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F1 μπορούν να διατηρούνται επί 1-2 επιπλέον ημέρες προκειμένου να δημιουργηθεί νέα γενεά F2.

Εβδομάδες δοκιμής 19-20 (F2)

Μία ή δύο ημέρες πριν από την αναμενόμενη έναρξη της εκκόλαψης, σταματήστε ή μειώστε την ανάδευση των επωαζόμενων αυγών προκειμένου να επισπεύσετε την εκκόλαψη. Εάν η δοκιμή τερματιστεί πριν την ολοκλήρωση της εκκόλαψης της γενεάς F2, τα ιχθύδια καταμετρώνται και απορρίπτονται καθημερινά. (Τα έμβρυα που δεν έχουν εκκολαφθεί μετά από παρατεταμένο διάστημα επώασης, δηλαδή μετά από χρονικό διάστημα διπλάσιο αυτού του διάμεσου αριθμού ημερών εκκόλαψης του μάρτυρα, θεωρούνται μη βιώσιμα).

Προσάρτημα 10

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα είδη των βιολογικών δεδομένων που λαμβάνονται με τη δοκιμή MEOGRT δεν αφορούν αποκλειστικά αυτή τη δοκιμή και έχουν αναπτυχθεί πολλές κατάλληλες στατιστικές μεθοδολογίες για την ορθή ανάλυση παρεμφερών δεδομένων (εκτός των δεδομένων για τις παθολογικές καταστάσεις), ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των δεδομένων, περιλαμβανομένης της κανονικότητας, της ομοιογένειας της διασποράς, του κατά πόσον ο σχεδιασμός της μελέτης είναι κατάλληλος για έλεγχο υπόθεσης ή ανάλυση παλινδρόμησης, των παραμετρικών έναντι των μη παραμετρικών δοκιμών, κ.λπ. Καταρχήν, οι προτεινόμενες στατιστικές αναλύσεις συμμορφώνονται προς τις συστάσεις του ΟΟΣΑ για τα δεδομένα οικοτοξικότητας (ΟΟΣΑ 2006), και στο σχήμα 2 φαίνεται ένα διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων για την ανάλυση δεδομένων MEOGRT.

Θεωρείται ότι, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα σύνολα δεδομένων θα εμφανίζουν μονοτονικές αποκρίσεις. Επιπλέον, θα πρέπει να εξετάζεται το θέμα της χρήσης μονόπλευρου στατιστικού ελέγχου έναντι της χρήσης αμφίπλευρου στατιστικού ελέγχου. Συνιστάται η χρήση μονόπλευρων ελέγχων, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι βιολογικοί λόγοι που καθιστούν τη χρήση τους μη αρμόζουσα. Παρότι στη συνέχεια προτείνονται ορισμένοι στατιστικοί έλεγχοι, εάν αναπτυχθούν καταλληλότερες και/ή ισχυρότερες στατιστικές μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν στα συγκεκριμένα δεδομένα που προκύπτουν με την MEOGRT, θα χρησιμοποιούνται οι εν λόγω μέθοδοι προκειμένου να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματά τους.

Τα δεδομένα από τη MEOGRT θα πρέπει να αναλύονται χωριστά για κάθε γονοτυπικό φύλο. Για την ανάλυση των δεδομένων από ψάρια με αναστροφή φύλου (αρσενικών XX ή θηλυκών XY) χρησιμοποιούνται δύο στρατηγικές: 1) λογοκρισία όλων των δεδομένων που προέρχονται από ψάρια με αναστροφή φύλου σε όλη τη δοκιμή, εκτός του επιπολασμού των περιπτώσεων αναστροφής φύλου σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, 2) διατήρηση των δεδομένων που προέρχονται από όλα τα ψάρια με αναστροφή φύλου στο σύνολο δεδομένων και ανάλυσή τους με βάση τον γονότυπο.

Ιστοπαθολογικά δεδομένα

Τα ιστοπαθολογικά δεδομένα αναφέρονται υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας που αξιολογούνται με χρήση μιας στατιστικής διαδικασίας που αναπτύχθηκε πρόσφατα, της διαδικασίας Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). Κατά τη διόρθωση κατά Rao-Scott διατηρούνται οι πληροφορίες δοκιμής–πανομοιότυπου δείγματος· η διαδικασία by Slices (κατά τομές) βασίζεται στη βιολογική προσδοκία ότι οι βαθμολογίες σοβαρότητας τείνουν να αυξάνονται καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις αγωγής. Για κάθε διάγνωση, στα αποτελέσματα της RSCABS προσδιορίζονται οι αγωγές που παρουσιάζουν υψηλότερο επιπολασμό παθολογικών καταστάσεων και το σχετικό επίπεδο σοβαρότητας.

Δεδομένα γεννητικότητας

Οι αναλύσεις για δεδομένα γεννητικότητας περιλαμβάνουν έλεγχο αποκλιμάκωσης Jonckheere-Terpstra ή Williams για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της αγωγής, υπό την προϋπόθεση ότι τα δεδομένα συνάδουν με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Στο πλαίσιο ελέγχου αποκλιμάκωσης, όλες οι συγκρίσεις πραγματοποιούνται στο επίπεδο σημασίας 0,05, χωρίς να πραγματοποιείται διόρθωση ως προς τον αριθμό συγκρίσεων. Παρότι αναμένεται ότι τα δεδομένα θα συνάδουν με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, αυτό μπορεί να επαληθεύεται είτε μέσω οπτικού ελέγχου των δεδομένων είτε μέσω του υπολογισμού γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων των μέσων όρων των αγωγών μετά από μετασχηματισμό των δεδομένων με βάση τη σειρά κατάταξης. Ο έλεγχος τάσεων πραγματοποιείται, εκτός εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική αντίθεση δεν είναι. Διαφορετικά, για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της αγωγής χρησιμοποιείται ο έλεγχος Dunnett, εφόσον τα δεδομένα είναι κανονικά κατανεμημένα με ομοιογενείς διασπορές. Εάν δεν ικανοποιούνται αυτές οι απαιτήσεις, χρησιμοποιείται ο έλεγχος Dunn με διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Όλοι οι ενδεδειγμένοι έλεγχοι πραγματοποιούνται ανεξάρτητα από τυχόν συνολικό έλεγχο F ή Kruskal-Wallis. Περισσότερες πληροφορίες παρατίθενται στο ΟΟΣΑ 2006.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι, όπως γενικευμένο γραμμικό μοντέλο με σφάλματα Poisson όσον αφορά τις μετρήσεις των αυγών (χωρίς μετασχηματισμό), εφόσον τεκμηριώνονται στατιστικά (Cameron and Trividi, 2013). Σε περίπτωση χρήσης εναλλακτικής προσέγγισης, συνιστάται να αναζητάται η παροχή συμβουλών επί στατιστικών θεμάτων.

Καθημερινή μέτρηση αυγών σε μία γενεά

Το μοντέλο ANOVA προκύπτει ως εξής: Y = χρόνος*χρόνος+αγωγή + *αγωγή + χρόνος*αγωγή + *χρόνος*αγωγή, με τυχαίες επιδράσεις «πανομοιότυπο δείγμα(γενεά*αγωγή)» και «χρόνος*πανομοιότυπο δείγμα(αγωγή)», που συνεκτιμά συνιστώσες άνισης διασποράς και των δύο τύπων στις διάφορες γενεές. Εδώ, ο όρος «χρόνος» αναφέρεται στη συχνότητα των μετρήσεων αυγών (π.χ. ημέρα ή εβδομάδα). Πρόκειται για ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, στο πλαίσιο της οποίας οι συσχετίσεις μεταξύ των παρατηρήσεων επί των ίδιων πανομοιότυπων δειγμάτων καλύπτουν τη φύση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των δεδομένων.

Οι κύριες επιδράσεις της αγωγής ελέγχονται με χρήση του ελέγχου Dunnett (ή Dunnett-Hsu), στο πλαίσιο του οποίου πραγματοποιείται διόρθωση ως προς τον αριθμό των συγκρίσεων. Χρειάζονται διορθώσεις ως προς την κύρια επίδραση της γενεάς ή του χρόνου επειδή για τους δύο αυτούς παράγοντες δεν υφίσταται επίπεδο «ελέγχου» και κάθε ζεύγος επιπέδων αποτελεί σύγκριση που είναι πιθανό να παρουσιάζει ενδιαφέρον. Για τις εν λόγω δύο κύριες επιδράσεις, εάν ο έλεγχος F είναι σημαντικός στο επίπεδο 0,05, οι συγκρίσεις βάσει ζευγών στα διάφορα επίπεδα του συγκεκριμένου παράγοντα μπορούν να ελέγχονται στο επίπεδο 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση.

Το μοντέλο περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δύο και τριών παραγόντων, κατά τρόπον ώστε η κύρια επίδραση, για παράδειγμα, του χρόνου μπορεί να μην είναι σημαντική, ακόμη και αν ο χρόνος έχει σημαντικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, εάν μια αλληλεπίδραση δύο ή τριών παραγόντων που σχετίζεται με τον χρόνο είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05, τότε είναι αποδεκτές οι συγκρίσεις των επιπέδων του χρόνου στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05 χωρίς περαιτέρω διόρθωση.

Ακολουθούν έλεγχοι F για τη σημαντικότητα της αγωγής εντός του χρόνου, οι καλούμενες τομές στον πίνακα ANOVA. Εάν, για παράδειγμα, η τομή για την αγωγή στη γενεά F1 και τον χρόνο 12, είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05, οι συγκρίσεις βάσει ζευγών για την αγωγή στη γενεά F1 και τον χρόνο 12 μπορούν να γίνουν αποδεκτές στο επίπεδο 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση. Παρόμοιες δηλώσεις ισχύουν και τους ελέγχους για τον χρόνο εντός της F1 και της αγωγής καθώς και για τη γενεά εντός χρόνο και αγωγής.

Τέλος, όσον αφορά συγκρίσεις που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες, οι συγκρίσεις θα πρέπει να διορθώνονται με χρήση της διόρθωσης των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις αναλύσεις των εν λόγω μοντέλων παρέχονται από τους Hocking (1985) και Hochberg and Tamhane (1987).

Εναλλακτικά, τα ανεπεξέργαστα δεδομένα καταγράφονται και παρουσιάζονται στην έκθεση μελέτης ως γεννητικότητα (αριθμός αυγών) ανά πανομοιότυπο δείγμα για κάθε ημέρα. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος όρος πανομοιότυπου δείγματος των ανεπεξέργαστων δεδομένων, και, στη συνέχεια, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας. Θα πρέπει να υπολογίζεται μονόδρομος έλεγχος διασποράς ANOVA επί των μετασχηματισθέντων μέσων όρων πανομοιότυπου δείγματος, ακολουθούμενος από αντιθέσεις Dunnett. Επίσης, μπορεί να είναι σκόπιμος ο οπτικός έλεγχος των δεδομένων γεννητικότητας κάθε αγωγής και/ή πανομοιότυπου δείγματος με διάγραμμα διασποράς που παρουσιάζει τα δεδομένα στην πάροδο του χρόνου. Αυτό επιτρέπει την άτυπη αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων με την πάροδο του χρόνου.

'Ολα τα υπόλοιπα βιολογικά δεδομένα

Οι στατιστικές αναλύσεις βασίζονται στην υποκείμενη παραδοχή ότι, εφόσον η επιλογή δόσεων γίνει σωστά, τα δεδομένα θα είναι μονοτονικά. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι τα δεδομένα είναι μονοτονικά και ότι αξιολογούνται τυπικά ως προς τη μονοτονικότητα με χρήση γραφικών και τετραγωνικών αντιθέσεων. Εάν τα δεδομένα είναι μονοτονικά, συνιστάται η διενέργεια ελέγχου τάσεων Jonckheere-Terpstra στις διάμεσες τιμές των πανομοιότυπων δειγμάτων (όπως συνιστάται στο ΟΟΣΑ 2006). Εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική αντίθεση δεν είναι, τα δεδομένα θεωρούνται μη μονοτονικά.

Εάν τα δεδομένα είναι μη μονοτονικά, ιδίως λόγω της μειωμένης απόκρισης της μίας ή δύο αγωγών με την υψηλότερη δόση, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο λογοκρισίας του συνόλου δεδομένων, ούτως ώστε η ανάλυση να πραγματοποιηθεί χωρίς τις εν λόγω αγωγές. Η εν λόγω απόφαση θα πρέπει να βασίζεται στην κρίση ειδικών και στο σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, ιδίως των δεδομένων που υποδεικνύουν έκδηλη τοξικότητα στα συγκεκριμένα επίπεδα αγωγής.

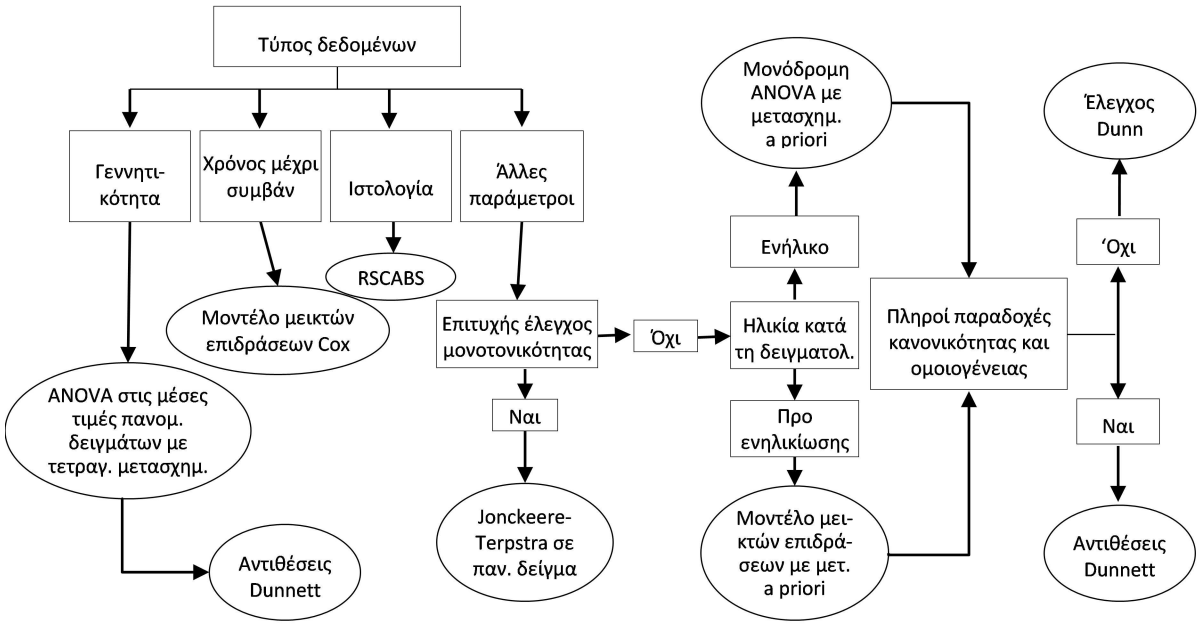
Για το βάρος και το μήκος, δεν συνιστάται η εφαρμογή μετασχηματισμών, αν και ενδέχεται κάποτε να είναι απαραίτητοι. Ωστόσο, για τα δεδομένα λεκιθογενίνης συνιστάται η εφαρμογή λογαριθμικού μετασχηματισμού· για τα δεδομένα SSC (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου) συνιστάται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας· για τα δεδομένα σχετικά με την ποσοστιαία εκκόλαψη, την ποσοστιαία επιβίωση, την αναλογία φύλων και τα ποσοστά γόνιμων αυγών συνιστάται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας τόξου ημιτόνου. Ο χρόνος μέχρι την εκκόλαψη και ο χρόνος μέχρι την πρώτη ωοτοκία θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν, με τα μεμονωμένα έμβρυα που δεν εκκολάπτονται εντός του καθορισμένου χρονικού διαστήματος ή τα πανομοιότυπα δείγματα που δεν εμφανίζουν ποτέ ωοτοκία να αντιμετωπίζονται ως λογοκριμένα εκ δεξιών δεδομένα. Ο χρόνος μέχρι την εκκόλαψη θα πρέπει να υπολογίζεται με βάση τη διάμεση ημέρα εκκόλαψης κάθε πανομοιότυπου δείγματος. Οι εν λόγω παράμετροι θα πρέπει να αναλύονται με χρήση μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox μεικτών επιδράσεων.

Τα βιολογικά δεδομένα από δείγματα ενήλικων ατόμων περιλαμβάνουν μία μέτρηση ανά πανομοιότυπο δείγμα, δηλαδή υπάρχει ένα ψάρι XX και ένα ψάρι XY ανά ενυδρείο πανομοιότυπου δείγματος. Ως εκ τούτου, συνιστάται ο υπολογισμός μονόδρομου ελέγχου διασποράς ANOVA επί των μέσων όρων πανομοιότυπου δείγματος. Εφόσον επαληθεύονται οι παραδοχές του ελέγχου ANOVA (η κανονικότητα και η ομοιογένεια της διασποράς συμφωνούν με τις αξιολογήσεις επί των καταλοίπων του ελέγχου ANOVA με έλεγχο Shapiro-Wilk και έλεγχο Levene αντίστοιχα), θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιθέσεις Dunnett για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές σε σχέση με τον μάρτυρα. Από την άλλη πλευρά, εάν οι παραδοχές του ANOVA δεν πληρούνται, θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος Dunn για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές από τον μάρτυρα. Συνιστάται η διεξαγωγή παρόμοιας διαδικασίας για τα δεδομένα που δίνονται ως ποσοστά (γονιμότητα, εκκόλαψη και επιβίωση).

Τα βιολογικά δεδομένα από δείγματα ατόμων πριν την ενηλικίωση περιλαμβάνουν από 1 έως 8 μετρήσεις ανά πανομοιότυπο δείγμα, δηλαδή μπορεί να υπάρχουν μεταβλητοί αριθμοί ατόμων που συνεισφέρουν στον μέσο όρο πανομοιότυπου δείγματος για κάθε γονοτυπικό φύλο. Ως εκ τούτου, εάν επαληθεύονται οι παραδοχές για την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς (επί των καταλοίπων του ANOVA μεικτών επιδράσεων), συνιστάται η χρήση μοντέλου ANOVA μεικτών δεδομένων, ακολουθούμενου από αντιθέσεις Dunnett. Εάν δεν επαληθεύονται, θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος Dunn για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές από τον μάρτυρα.

Σχήμα 2

Διάγραμμα ροής για τις συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες στο πλαίσιο ανάλυσης δεδομένων της MEOGRT



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

Γ.53 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΑΜΦΙΒΙΩΝ (LAGDA)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 241 του ΟΟΣΑ (2015). Η ανάγκη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας δοκιμασίας για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των δυσμενών συνεπειών της έκθεσης σε τοξικές χημικές ουσίες στα αμφίβια προέκυψε από ανησυχίες ότι τα περιβαλλοντικά επίπεδα χημικών ουσιών μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στη χλωροπανίδα. Η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ για τη δοκιμασία αύξησης και ανάπτυξης προνυμφών αμφιβίων (LAGDA) περιγράφει μια δοκιμή τοξικότητας με ένα είδος αμφιβίου η οποία εξετάζει την αύξηση και την ανάπτυξη από τη γονιμοποίηση μέχρι το πρώιμο νεαρό στάδιο. Πρόκειται για μια δοκιμασία (συνήθως 16 εβδομάδων) που αξιολογεί την πρώιμη ανάπτυξη, τη μεταμόρφωση, την επιβίωση, τη σωματική αύξηση και τη μερική αναπαραγωγική ωρίμανση. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης μιας σειράς άλλων παραμέτρων που επιτρέπουν τη διαγνωστική αξιολόγηση χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες (EDC) ή άλλου είδους ουσιών τοξικών για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Η μέθοδος που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι αποτέλεσμα εργασιών επικύρωσης για τον αφρικανικό ονυχοφόρο βάτραχο (*Xenopus laevis*) που διεξήγαγε ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) των ΗΠΑ, με υποστηρικτικές εργασίες στην Ιαπωνία (1). Παρότι είναι δυνατή η προσαρμογή και άλλων ειδών αμφιβίων σε πρωτόκολλα δοκιμής σωματικής αύξησης και ανάπτυξης στο πλαίσιο των οποίων η δυνατότητα προσδιορισμού του γενετικού φύλου αποτελεί σημαντικό στοιχείο, οι συγκεκριμένες μέθοδοι και παράμετροι παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών εφαρμόζονται μόνο στο είδος *Xenopus laevis*.

2. Η δοκιμασία LAGDA αποτελεί μια δοκιμή ανώτερης βαθμίδας σε αμφίβιο για τη συλλογή πιο ολοκληρωμένων πληροφοριών συγκέντρωσης-απόκρισης σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις, η οποία είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας, καθώς και για την αξιολόγηση του οικολογικού κινδύνου. Η δοκιμασία εντάσσεται στο επίπεδο 4 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών, όπου οι *in vivo* δοκιμασίες παρέχουν επίσης δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις σε παραμέτρους που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα (2). Ο γενικός πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων *X. laevis* σταδίου 8-10 κατά Nieuwkoop και Faber (NF) (3) σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (γενικά διατεταγμένες σε ημιλογαριθμικά διαστήματα τουλάχιστον) και μάρτυρα/-ων έως 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα, με ένα ενδιάμεσο μερικό δείγμα (υποδείγμα) στο στάδιο 62 κατά NF [≤ 45 ημέρες, συνήθως περί τις 45 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (dpf)]. Χρησιμοποιούνται τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για τον μάρτυρα. Στις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της έκθεσης (στο ενδιάμεσο υποδείγμα και το τελικό δείγμα κατά την ολοκλήρωση της δοκιμής) περιλαμβάνονται παράμετροι ενδεικτικές γενικευμένης τοξικότητας: θνησιμότητα, μη φυσιολογική συμπεριφορά και προσδιορισμοί σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος), καθώς και παράμετροι που έχουν σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό ειδικών τρόπων δράσης ενδοκρινικής τοξικότητας που στοχεύουν φυσιολογικές διεργασίες διαμεσολαβούμενες από τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα ή τις θυρεοειδικές ορμόνες. Η μέθοδος δίνει πρωταρχική έμφαση στις δυνητικές επιδράσεις που σχετίζονται με τον πληθυσμό (ήτοι δυσμενείς επιπτώσεις στην επιβίωση, την ανάπτυξη, τη σωματική αύξηση και την αναπαραγωγική ανάπτυξη) για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) ή της συγκέντρωσης επίδρασης που προκαλεί μεταβολή x% (ECx) στη μετρούμενη παράμετρο. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι προσεγγίσεις της ECx σπανίως είναι κατάλληλες για μεγάλες μελέτες αυτού του είδους, στο πλαίσιο των οποίων ενδέχεται να είναι πρακτικά αδύνατη η αύξηση του αριθμού των συγκεντρώσεων δοκιμής προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της επιθυμητής ECx. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η μέθοδος δεν καλύπτει το αναπαραγωγικό στάδιο αυτό καθαυτό. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Λόγω του περιορισμένου αριθμού, αφενός, των χημικών ουσιών που έχουν υποβληθεί σε δοκιμή και, αφετέρου, των εργαστηρίων που μετείχαν στην επικύρωση αυτής της σχετικά πολύπλοκης δοκιμασίας, ιδίως δεδομένου ότι η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα δεν τεκμηριώνεται μέχρι στιγμής με πειραματικά δεδομένα, αναμένεται ότι, όταν καταστεί διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών ώστε να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος του νέου αυτού σχεδιασμού μελέτης, η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 241 του ΟΟΣΑ θα επανεξεταστεί και, αν χρειαστεί, θα αναθεωρηθεί με βάση την αποκτηθείσα πείρα. Η δοκιμασία LAGDA αποτελεί μια σημαντική δοκιμασία για την εξέταση των δυνητικών παραγόντων που συντελούν στη μείωση των πληθυσμών των αμφιβίων, μέσω της αξιολόγησης των επιπτώσεων από την έκθεση σε χημικές ουσίες κατά το ευαίσθητο προνυμφικό στάδιο, όπου οι επιπτώσεις στην επιβίωση και την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής ανάπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων, μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τους πληθυσμούς.

4. Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί με σκοπό την ανίχνευση επιδράσεων κορυφαίου επιπέδου από ενδοκρινικούς και μη ενδοκρινικούς μηχανισμούς και περιλαμβάνει διαγνωστικά τελικά σημεία τα οποία σχετίζονται, εν μέρει, ειδικά με βασικές ενδοκρινικές διαδικασίες. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, πριν από την ανάπτυξη της δοκιμασίας LAGDA, δεν υπήρχε επικυρωμένη δοκιμασία για τον σκοπό αυτό στα αμφίβια.

5. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ιδίως προκειμένου να είναι δυνατή η παραγωγή σταθερών χημικών διαλυμάτων. Είναι επίσης αναγκαίο να υπάρχει επαρκώς ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για την επαλήθευση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για μια περίοδο 16 εβδομάδων περίπου, η δοκιμασία απαιτεί συνολικό αριθμό 480 ζώων, ήτοι εμβρύων *X. laevis* (ή 640 εμβρύων, αν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη) προκειμένου να διασφαλιστεί επαρκής ισχύς της δοκιμής για την αξιολόγηση των παραμέτρων που σχετίζονται με τον πληθυσμό, όπως η σωματική αύξηση, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγική ωρίμανση.

6. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για δοκιμές κανονιστικού χαρακτήρα ενός μείγματος, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η μέθοδος αποδίδει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό. Επιπλέον, η παρούσα δοκιμασία δεν αξιολογεί άμεσα τη γεννητικότητα και, ως εκ τούτου, ενδέχεται να μην ενδείκνυται για χρήση σε πιο προχωρημένο στάδιο από το επίπεδο 4 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΒΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Πολλά από τα στοιχεία που διαθέτουμε σήμερα σχετικά με τη βιολογία των αμφιβίων έχουν ληφθεί με το εργαστηριακό είδος-μοντέλο *X. laevis*. Αυτό το είδος μπορεί να εκτραφεί συνήθως στο εργαστήριο, η ωορρηξία μπορεί να προκληθεί με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και υπάρχουν άμεσα διαθέσιμα ζωικά αποθέματα από εκτροφείς του εμπορίου.

8. Όπως σε όλα τα σπονδυλωτά, η αναπαραγωγή στα αμφίβια ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG) (4). Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα είναι μεσολαβητές αυτού του ενδοκρινικού συστήματος και κατευθύνουν την ανάπτυξη και τη φυσιολογία των σεξουαλικά διμορφικών ιστών. Υπάρχουν τρεις ξεχωριστές φάσεις στον κύκλο ζωής των αμφιβίων κατά τις οποίες αυτός ο άξονας είναι ιδιαίτερα δραστήριος: (1) διαφοροποίηση των γονάδων κατά την ανάπτυξη των προνυμφών, (2) ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών φύλου και ωρίμανση των γονάδων κατά τη διάρκεια της νεαρής φάσης, και (3) λειτουργική αναπαραγωγή των ενηλίκων. Καθένα από αυτά τα τρία αναπτυξιακά «παράθυρα» είναι πιθανώς επιρρεπές σε ενδοκρινικές διαταραχές από ορισμένες χημικές ουσίες όπως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, οι οποίες οδηγούν τελικά σε απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας των ζώων.

9. Οι γονάδες αρχίζουν να αναπτύσσονται στο στάδιο 43 κατά NF, οπότε και εμφανίζεται η αμφιδύναμη γεννητική ταινία. Η διαφοροποίηση των γονάδων αρχίζει στο στάδιο 52 κατά NF όταν πρωτογενή γεννητικά κύτταρα είτε μεταναστεύουν σε μυελώδη ιστό (αρσενικά) είτε παραμένουν στη φλοιώδη μοίρα (θηλυκά) των αναπτυσσόμενων γονάδων (3). Για πρώτη φορά αναφέρθηκε ότι αυτή η διαδικασία σεξουαλικής διαφοροποίησης των γονάδων είναι ευαίσθητη σε χημική αλλοίωση στον *Xenopus* κατά τη δεκαετία του 1950 (5) (6). Η έκθεση των γυρίνων στην οιστραδιόλη κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου διαφοροποίησης των γονάδων έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή του φύλου των αρσενικών, τα οποία όταν ενηλικιώνονται είναι πλήρως λειτουργικά θηλυκά (7) (8). Η λειτουργική αναστροφή του φύλου θηλυκών σε αρσενικά είναι επίσης δυνατή και έχει αναφερθεί μετά την εμφύτευση ιστού όρχεων στους γυρίνους (9). Ωστόσο, αν και η έκθεση σε αναστολέα αρωματάσης προκαλεί επίσης λειτουργική αναστροφή του φύλου στον *X. tropicalis* (10), αυτό δεν έχει παρατηρηθεί στον<HT

TYPE="ITALIC">X. laevis. Ιστορικά, οι τοξικές επιδράσεις στη διαφοροποίηση των γονάδων έχουν αξιολογηθεί με ιστολογική εξέταση των γονάδων κατά τη μεταμόρφωση και η αναστροφή του φύλου μπορούσε να προσδιοριστεί μόνο με ανάλυση της αναλογίας φύλων. Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχαν μέσα για να προσδιοριστεί άμεσα το γενετικό φύλο του *Xenopus*. Ωστόσο, η πρόσφατη καθιέρωση δεικτών που συνδέονται με το φύλο στον *X. laevis* καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου και επιτρέπει την άμεση αναγνώριση των ζώων των οποίων το φύλο έχει αναστραφεί (11).

10. Στα αρσενικά, η ανάπτυξη νεαρών ατόμων προχωρά καθώς τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο αίμα αυξάνονται παράλληλα με την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και την ανάπτυξη των όρχεων. Στα θηλυκά παράγεται οιστραδιόλη από τις ωοθήκες με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεκιθογενίνης (VTG) στο πλάσμα και λεκιθογενετικών ωοκυττάρων στις ωοθήκες και την ανάπτυξη των ωαγωγών (12). Οι ωαγωγοί είναι δευτερογενή χαρακτηριστικά του θηλυκού φύλου που συμμετέχουν στην ωρίμανση των ωοκυττάρων κατά την αναπαραγωγή. Ζελατινώδη περιβλήματα προστίθενται στο εξωτερικό των ωοκυττάρων καθώς αυτά περνούν από τον ωαγωγό και συγκεντρώνονται στον ωόσακο, έτοιμα για γονιμοποίηση. Η ανάπτυξη των ωαγωγών φαίνεται να ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα καθώς συσχετίζεται με τα επίπεδα οιστραδιόλης στο αίμα στα είδη *X. laevis* (13) και *X. tropicalis* (12). Έχει αναφερθεί η ανάπτυξη ωαγωγών σε αρσενικά μετά από έκθεση σε ενώσεις πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (14) και σε 4-*tert*-οκτυλοφαινόλη (15).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Ο σχεδιασμός της δοκιμής περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων *X. laevis* σταδίων 8-10 κατά NF μέσω του ύδατος σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μάρτυρα/-ων έως 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα, με ένα ενδιάμεσο υποδείγμα στο στάδιο 62 κατά NF. Αν και μπορεί να είναι επίσης δυνατή η χορήγηση εξαιρετικά υδρόφοβων χημικών ουσιών μέσω της τροφής, η μέχρι σήμερα εμπειρία στη χρήση αυτής της οδού έκθεσης σε αυτή τη δοκιμασία είναι μικρή. Χρησιμοποιούνται τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για κάθε μάρτυρα. Στις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της έκθεσης περιλαμβάνονται τα τελικά σημεία που είναι ενδεικτικά γενικευμένης τοξικότητας [δηλαδή θνησιμότητα, μη φυσιολογική συμπεριφορά και προσδιορισμοί σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος)], καθώς και παράμετροι που αποσκοπούν στον χαρακτηρισμό ειδικών τρόπων δράσης ενδοκρινικής τοξικότητας που επηρεάζουν φυσιολογικές διεργασίες διαμεσολαβούμενες από τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα ή τις θυρεοειδικές ορμόνες [δηλαδή ιστοπαθολογία θυρεοειδούς, ιστοπαθολογία γονάδων και γοναδικού πόρου, ανώμαλη ανάπτυξη, λεκιθογενίνη πλάσματος (προαιρετικά) και αναλογίες γονοτυπικού/φαινοτυπικού φύλου].

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για την εγκυρότητα της δοκιμής εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι > 40 % της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής·

— η θερμοκρασία πρέπει να είναι 21 ± 1 °C και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0 °C·

— το pH του διαλύματος δοκιμής πρέπει να διατηρείται μεταξύ του 6,5 και του 8,5 και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5·

— θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν·

— η θνησιμότητα κατά την περίοδο έκθεσης θα πρέπει να είναι ≤ 20 % σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα στους μάρτυρες·

— ≥ 70 % βιωσιμότητα των αυγών που επιλέχθηκαν για την έναρξη της μελέτης·

— Ο διάμεσος χρόνος των μαρτύρων έως το στάδιο 62 κατά NF θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες·

— Το μέσο βάρος των οργανισμών δοκιμής στο στάδιο 62 κατά NF και στη λήξη της δοκιμασίας στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να φτάνει τα 1,0 ± 0,2 και 11,5 ± 3 g αντίστοιχα.

13. Παρόλο που δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, συνιστάται να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα. Η υπερβολική θνησιμότητα, η οποία υπονομεύει μια αγωγή, ορίζεται ως > 4 θάνατοι (> 20 %) σε 2 ή περισσότερα πανομοιότυπα δείγματα, που δεν μπορούν να αποδοθούν σε τεχνικό σφάλμα. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής χωρίς προφανή έκδηλη τοξικότητα. Ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν, ενδεικτικά, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης, μη ανταπόκριση σε ερεθίσματα, μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), αιμορραγικές βλάβες και κοιλιακό οίδημα.

14. Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής και οι αποκλίσεις και εκτιμήσεις αυτές θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

15. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας (π.χ. θερμαντήρες ή ψύκτες με δυνατότητα ρύθμισης στους 21 ° ± 1 °C),

β) θερμόμετρο,

γ) διοφθάλμιο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο και εργαλεία ανατομής,

δ) ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με ανάλυση τουλάχιστον 4 megapixel και λειτουργία micro (εάν χρειάζεται),

ε) αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 0,001 mg ή 1 μg,

στ) μετρητής διαλυμένου οξυγόνου και μετρητής pH,

ζ) μετρητής έντασης φωτός με δυνατότητα μέτρησης σε lux.

Νερό

Πηγή και ποιότητα

16. Μπορεί να χρησιμοποιείται κάθε νερό που διατίθεται τοπικά (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα) και επιτρέπει τη φυσιολογική σωματική αύξηση και ανάπτυξη των γυρίνων του είδους *X. laevis* και θα πρέπει να είναι διαθέσιμα στοιχεία που αποδεικνύουν τη φυσιολογική αύξηση σε αυτό το νερό. Επειδή η ποιότητα του τοπικού νερού μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων περιοχών, θα πρέπει να διεξάγεται ανάλυση της ποιότητας του νερού, ιδιαίτερα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα σχετικά με τη χρησιμότητα του νερού για την εκτροφή προνυμφών αμφιβίων. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), σημαντικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών προτού ξεκινήσει η δοκιμή και/ή π.χ. κάθε έξι μήνες. Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο προσάρτημα 2.

Συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής

17. Για να μπορεί ο θυρεοειδής αδένας να συνθέτει θυρεοειδικές ορμόνες που υποστηρίζουν τη φυσιολογική μεταμόρφωση, πρέπει να παρέχεται επαρκής ποσότητα ιωδίου στις προνύμφες μέσω υδατικών και διατροφικών πηγών, σε συνδυασμό. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν εμπειρικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις ιωδίου, είτε στην τροφή είτε στο νερό, που εξασφαλίζουν σωστή ανάπτυξη. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα του ιωδίου ενδέχεται να επηρεάσει την ανταπόκριση του θυρεοειδικού συστήματος σε παράγοντες που επιδρούν στον θυρεοειδή και είναι γνωστό ότι επιδρά στο βασικό επίπεδο λειτουργίας του θυρεοειδούς, μια πτυχή στην οποία πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς. Με βάση προηγούμενες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η δοκιμασία αποδίδει ικανοποιητικά όταν οι συγκεντρώσεις ιωδίου (I^{-}) στο νερό αραίωσης κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 10 μg/l. Ιδανικά, η ελάχιστη συγκέντρωση ιωδίου στο νερό αραίωσης σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να είναι 0,5 μg/l (με προσθήκη ιόντων ιωδίου σε μορφή άλατος με νάτριο ή κάλιο). Σε περίπτωση ανασύστασης του νερού δοκιμής από απιονισμένο νερό, θα πρέπει να προστίθεται ιώδιο σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 μg/l. Η μετρούμενη συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής (δηλ. στο νερό αραίωσης) και η συμπλήρωση του νερού δοκιμής με ιώδιο ή άλλα άλατα (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να δηλώνονται στην έκθεση. Η περιεκτικότητα σε ιώδιο θα πρέπει να μετριέται και στις τροφές.

Σύστημα έκθεσης

18. Η δοκιμή σχεδιάστηκε με χρήση συστήματος αραιωτή συνεχούς ροής νερού. Τα εξαρτήματα του συστήματος που έρχονται σε επαφή με νερό θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα και/ή άλλα χημικώς αδρανή υλικά. Οι δεξαμενές έκθεσης θα πρέπει να είναι ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα με ωφέλιμο όγκο δεξαμενής από 4,0 έως 10,0 l (ελάχιστο βάθος νερού από 10 έως 15 cm). Το σύστημα θα πρέπει να είναι σε θέση να υποστηρίξει όλες τις συγκεντρώσεις έκθεσης, έναν μάρτυρα και έναν μάρτυρα με διαλύτη, αν χρειάζεται, με τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή και οκτώ στους μάρτυρες. Η ταχύτητα ροής σε κάθε δεξαμενή θα πρέπει να είναι σταθερή ώστε να διατηρούνται οι βιολογικές συνθήκες και η έκθεση στις χημικές ουσίες. Συνιστάται οι ταχύτητες ροής να είναι κατάλληλες (π.χ. τουλάχιστον 5 κύκλοι ανανέωσης του νερού της δεξαμενής ανά ημέρα) προκειμένου να αποφεύγεται η μείωση των συγκεντρώσεων των χημικών ουσιών μέσω μεταβολισμού τόσο από τους οργανισμούς δοκιμής όσο και από τους μικροοργανισμούς του νερού που περιέχονται στα ενυδρεία, και μέσω αβιοτικών οδών αποδόμησης (υδρόλυση, φωτόλυση) ή διαφυγής (εξάτμιση, προσρόφηση). Οι δεξαμενές αγωγής θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε μια θέση στο σύστημα έκθεσης, με σκοπό τη μείωση των πιθανών επιδράσεων που οφείλονται στη θέση, συμπεριλαμβανομένων των ελαφρών διακυμάνσεων στη θερμοκρασία, στην ένταση του φωτός κ.λπ. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη διαμόρφωση συστημάτων έκθεσης συνεχούς ροής νερού ανατρέξτε στον οδηγό του ASTM για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας σε υλικά δοκιμών με ψάρια, μακροασπόνδυλα και αμφίβια (Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians) (16).

Παροχή της χημικής ουσίας: παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

19. Για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής στο σύστημα έκθεσης, αποθεματικό διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να χορηγείται σταδιακά στο σύστημα έκθεσης μέσω κατάλληλης αντλίας ή άλλης συσκευής. Η ταχύτητα ροής του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να βαθμονομείται σύμφωνα με την αναλυτική επιβεβαίωση των διαλυμάτων δοκιμής πριν από την έναρξη της έκθεσης και να υποβάλλεται σε περιοδικό ογκομετρικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το διάλυμα δοκιμής σε κάθε υποδοχέα θα πρέπει να ανανεώνεται με ρυθμό τουλάχιστον 5 ανανεώσεων όγκου/ημέρα.

20. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. Ως εκ τούτου, πριν από τη δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται βασικές πληροφορίες για τη χημική ουσία, οι οποίες να αφορούν τη δυνατότητα δοκιμής της. Στις χρήσιμες πληροφορίες που είναι σχετικές με τις ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος, το μοριακό βάρος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a και ο K_{ow}, η υδατοδιαλυτότητα (κατά προτίμηση στο δοκιμαστικό μέσο) και η τάση ατμών, καθώς και τα αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποδομησιμότητας [μέθοδος δοκιμών Γ.4 (17) ή Γ.29 (18)]. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λόγω εξάτμισης. Η διενέργεια της δοκιμής χωρίς τις πληροφορίες που παρατίθενται ανωτέρω θα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο προσεκτικής εξέτασης καθώς ο σχεδιασμός της μελέτης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, χωρίς αυτά τα δεδομένα, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής μπορεί να είναι δύσκολη ή χωρίς νόημα. Πρέπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα διαλύματα, της οποίας η ακρίβεια και το όρια ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα. Οι υδατοδιαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ποσότητες νερού αραίωσης, σε συγκέντρωση που επιτρέπει την παροχή της χημικής ουσίας στην επιδιωκόμενη συγκέντρωση δοκιμής σε σύστημα συνεχούς ροής νερού. Οι χημικές ουσίες που είναι υγρές ή στερεές σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση μεθόδων κορεσμού υγρού:υγρού ή υγρού:στερεού (π.χ. στήλη υαλοβάμβακα) (19). Αν και μπορεί να είναι επίσης δυνατή η χορήγηση εξαιρετικά υδρόφοβων υπό δοκιμή χημικών ουσιών μέσω της τροφής, η εμπειρία στη χρήση αυτής της οδού έκθεσης σε αυτή τη δοκιμασία είναι μικρή.

21. Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αποθεματικού διαλύματος. Το αποθεματικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραίωσης, με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλα πυκνό αποθεματικό διάλυμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες/συστήματα κορεσμού ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (20). Προτιμώνται τα συστήματα δοκιμής χωρίς συνδιαλύτη, ωστόσο οι διάφορες υπό δοκιμή χημικές ουσίες έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες πιθανώς να απαιτούν διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά την προετοιμασία του νερού έκθεσης στη χημική ουσία. Είναι προτιμότερο να αποφεύγεται η χρήση διαλυτών ή φορέων επειδή: 1) ορισμένοι διαλύτες ενδέχεται να συνεπάγονται οι ίδιοι τοξικότητα και/ή ανεπιθύμητες ή απρόβλεπτες αποκρίσεις, 2) η διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων, (3) η χρήση διαλυτών σε μακροχρόνιες δοκιμές μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικό σχηματισμό βιοϋμένων, ο οποίος συνδέεται με μικροβιακή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την ικανότητα διατήρησης των συγκεντρώσεων έκθεσης, και (4) ελλείψει ιστορικών δεδομένων που να καταδεικνύουν ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την έκβαση της μελέτης, η χρήση διαλυτών απαιτεί αγωγή μάρτυρα με διαλύτη η οποία έχει επιπτώσεις στην καλή μεταχείριση των ζώων, δεδομένου ότι απαιτείται πρόσθετος αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για χημικές ουσίες που παρουσιάζουν δυσκολίες στη δοκιμή, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση· συμβουλευτείτε το έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη διαθεσιμότητα ιστορικών δεδομένων μάρτυρα σχετικά με τον διαλύτη. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα, η καταλληλότητα ενός διαλύτη θα πρέπει να προσδιορίζεται πριν από τη διενέργεια της οριστικής μελέτης. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η χρήση διαλύτη και προκύψει μικροβιακή δραστηριότητα (σχηματισμός βιοϋμένων), συνιστάται η καταγραφή και η αναφορά του σχηματισμού βιοϋμένων ανά δεξαμενή (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Ιδανικά, η συγκέντρωση του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται σταθερή στον μάρτυρα με διαλύτη και σε όλες τις αγωγές της δοκιμής. Εάν η συγκέντρωση του διαλύτη δεν διατηρηθεί σταθερή, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύτη στην αγωγή της δοκιμής. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 100 μl/l ή τα 100 mg/l (21), και συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη να είναι όσον το δυνατόν πιο χαμηλή (π.χ. ≤ 20 μl/l) για να αποφεύγονται πιθανές επιδράσεις του διαλύτη στις μετρούμενες παραμέτρους (22).

Πειραματόζωα

Είδος δοκιμής

22. Το είδος της δοκιμής είναι το *X. laevis* διότι: 1) καλλιεργείται συστηματικά σε εργαστήρια παγκοσμίως, 2) αποκτάται εύκολα από προμηθευτές του εμπορίου και 3) είναι δυνατός ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου.

Φροντίδα και αναπαραγωγή ενήλικων ατόμων

23. Η δέουσα φροντίδα και αναπαραγωγή των ατόμων *X. laevis* περιγράφεται στις σχετικές τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές (23). Η στέγαση και η φροντίδα των ατόμων *X. laevis* περιγράφεται επίσης από τον Read (24). Για την πρόκληση αναπαραγωγής, χορηγείται ενδοπεριτοναϊκώς ένεση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) σε τρία έως πέντεζεύγη

θηλυκών και αρσενικών ενήλικων ατόμων. Στα θηλυκά και αρσενικά άτομα χορηγούνται με ένεση περίπου 800-1000 IU και 500-800 IU hCG αντίστοιχα, διαλυμένης σε αλατούχο διάλυμα 0,6-0,9 % (ή σε διάλυμα Ringer βατράχου, ένα ισότονο αλατούχο διάλυμα για χρήση σε αμφίβια). Ο όγκος έγχυσης θα πρέπει να είναι περίπου 10 μl/g σωματικού βάρους (~1 000 μl). Εν συνεχεία, τα ζεύγη στα οποία έχει προκληθεί αναπαραγωγή διατηρούνται σε μεγάλες δεξαμενές ανενόχλητα και κάτω από στατικές συνθήκες, για διευκόλυνση του ζευγαρώματος. Στον πυθμένα κάθε δεξαμενής αναπαραγωγής θα πρέπει να υπάρχει ένας ψευδοπυθμένας από πλέγμα ανοξείδωτου χάλυβα (π.χ. με μάτια 1,25 cm) που να επιτρέπει στις μάζες των αυγών να αποτίθενται στον πυθμένα. Οι βάτραχοι που θα δεχτούν ένεση hCG αργά το απόγευμα συνήθως εναποθέτουν τα περισσότερα αυγά μέχρι αργά το πρωί της επόμενης ημέρας. Μετά την απελευθέρωση και γονιμοποίηση επαρκούς ποσότητας αυγών, τα ενήλικα άτομα θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αναπαραγωγής. Εν συνεχεία τα αυγά συλλέγονται και τα ζελατινώδη περιβλήματα αφαιρούνται με χρήση L-κυστεΐνης (23). Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα περιεκτικότητας 2 % σε L-κυστεΐνη και το pH να ρυθμίζεται σε 8,1 με προσθήκη 1 M NaOH. Αυτό το διάλυμα θερμοκρασίας 21 °C προστίθεται σε φιάλη Erlenmeyer 500 ml που περιέχει τα αυγά που προέρχονται από μία διαδικασία ωοτοκίας, περιδινίζεται ήπια για ένα έως δύο λεπτά και εν συνεχεία εκπλένεται σχολαστικά 6-8 φορές με νερό καλλιέργειας θερμοκρασίας 21 °C. Εν συνεχεία τα αυγά μεταφέρονται σε δοχείο κρυστάλλωσης και επιβεβαιώνεται ότι είναι βιώσιμα σε ποσοστό > 70 % με ελάχιστες ανωμαλίες στα έμβρυα που παρουσιάζουν κυτταρική διαίρεση

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συγκεντρώσεις δοκιμής

24. Συνιστάται η χρήση τουλάχιστον τεσσάρων συγκεντρώσεων χημικής ουσίας και κατάλληλων μαρτύρων (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων με διαλύτη, εάν είναι απαραίτητο). Γενικά, συνιστάται διαχωρισμός συγκέντρωσης (συντελεστής απόστασης) που δεν υπερβαίνει το 3,2.

25. Για τους σκοπούς της παρούσας δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, στο μέτρο του δυνατού, τα αποτελέσματα από τις υπάρχουσες μελέτες σχετικά με τα αμφίβια για τον προσδιορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής, ώστε να αποφεύγονται οι υπερβολικά τοξικές συγκεντρώσεις. Πληροφορίες π.χ. από ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας, από συγκριτικές μελέτες και από υπάρχουσες μελέτες σε αμφίβια, όπως η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (μέθοδος δοκιμών Γ.38) (25) και η δοκιμασία τερατογένεσης σε έμβρυο βατράχου - *Xenopus* (23) και/ή δοκιμασίες σε ψάρια όπως οι μέθοδοι δοκιμών Γ.48, Γ.41 και Γ.49 (26) (27) (28), μπορούν να συμβάλουν στον προσδιορισμό αυτής της συγκέντρωσης. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας LAGDA, μπορεί να διενεργηθεί πείραμα προσδιορισμού εύρους. Συνιστάται η έκθεση προσδιορισμού εύρους να ξεκινά εντός 24 ωρών από τη γονιμοποίηση και να συνεχίζεται για 7-14 ημέρες (ή περισσότερες, εάν χρειάζεται) και οι συγκεντρώσεις δοκιμής να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μην απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή μεγαλύτερο του 10. Τα αποτελέσματα του πειράματος προσδιορισμού εύρους θα πρέπει να χρησιμεύουν για τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής στη δοκιμασία LAGDA. Να σημειωθεί ότι, εάν πρέπει να χρησιμοποιηθεί διαλύτης, τότε η καταλληλότητα του διαλύτη (δηλαδή το κατά πόσον μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα της μελέτης) μπορεί να διαπιστωθεί στο πλαίσιο της μελέτης προσδιορισμού εύρους.

Πανομοιότυπα δείγματα εντός των ομάδων αγωγής και των μαρτύρων

26. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερις δεξαμενές πανομοιότυπων δειγμάτων ανά συγκέντρωση δοκιμής και τουλάχιστον οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για τους μάρτυρες (και τον μάρτυρα με διαλύτη, αν χρειάζεται) (δηλαδή ο αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων στον μάρτυρα και τυχόν μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να είναι διπλάσιος από τον αριθμό πανομοιότυπων δειγμάτων κάθε ομάδας αγωγής, για να εξασφαλιστεί η κατάλληλη στατιστική ισχύς). Κανένα πανομοιότυπο δείγμα δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από 20 ζώα. Ο ελάχιστος αριθμός ζώων που υποβάλλονται σε επεξεργασία θα είναι 15 (5 για το υποδείγμα στο στάδιο 62 κατά NF και 10 νεαρά άτομα). Ωστόσο, επιπλέον ζώα προστίθενται σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα ώστε τυχόν θάνατοι να μη μειώσουν το πλήθος κάτω από τον κρίσιμο αριθμό 15.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επισκόπηση δοκιμασίας

27. Η δοκιμασία ξεκινά με πρόσφατα έμβρυα (στάδια 8-10 κατά NF) και συνεχίζεται κατά το στάδιο της ανάπτυξης των νεαρών ατόμων. Τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για θνησιμότητα και τυχόν σημεία μη φυσιολογικής συμπεριφοράς. Στο στάδιο 62 κατά NF, συλλέγεται υποδείγμα προνυμφών (μέχρι 5 ζώα ανά πανομοιότυπο δείγμα) και εξετάζονται διάφορες παράμετροι (πίνακας 1). Αφού φτάσουν όλα τα ζώα στο στάδιο 66 κατά NF, δηλαδή μετά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης (ή 70 ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας, όποιο από τα δύο προηγείται), θανατώνονται τυχαία (αλλά χωρίς λήψη υποδείγματος) ορισμένα ζώα ώστε να μειωθεί ο αριθμός τους (10 ανά δεξαμενή) (βλ. παράγραφο 43) και συνεχίζεται η έκθεση των υπόλοιπων ζώων μέχρι να παρέλθουν 10 εβδομάδες από τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα. Στο τέλος της δοκιμής (δειγματοληψία νεαρών ζώων) πραγματοποιούνται επιπλέον μετρήσεις (πίνακας 1).

Συνθήκες έκθεσης

28. Πλήρης σύνοψη των παραμέτρων της δοκιμής διατίθεται στο προσάρτημα 3. Κατά την περίοδο έκθεσης, το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH των διαλυμάτων δοκιμής θα πρέπει να μετρώνται καθημερινά. Η αγωγιμότητα, η αλκαλικότητα και η σκληρότητα μετρώνται μία φορά τον μήνα. Για τη θερμοκρασία νερού των διαλυμάτων δοκιμής, οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών (εντός μίας ημέρας) δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0 °C. Επίσης, για το pH των διαλυμάτων δοκιμής, οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5.

29. Οι δεξαμενές έκθεσης μπορούν να καθαρίζονται καθημερινά με σιφωνισμό για την απομάκρυνση υπολειμμάτων τροφών και αποβλήτων, με προσοχή ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση των δεξαμενών. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση στρες και τραυματισμών στα ζώα, ιδιαίτερα κατά τη μετακίνηση, τον καθαρισμό των ενυδρείων και τον χειρισμό. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι συνθήκες/δραστηριότητες που προκαλούν στρες, όπως ο δυνατός και/ή αδιάκοπος θόρυβος, τα ελαφριά χτυπήματα στα ενυδρεία ή οι κραδασμοί μέσα στη δεξαμενή.

Διάρκεια έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία

30. Η έκθεση ξεκινά με πρόσφατα έμβρυα (σταδίου 8-10 κατά NF) και συνεχίζεται μέχρι να παρέλθουν δέκα εβδομάδες από τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF (≤ 45 ημέρες από την έναρξη της δοκιμασίας) στην ομάδα μάρτυρα. Γενικά, η διάρκεια της δοκιμασίας LAGDA είναι 16 εβδομάδες (17 εβδομάδες κατά μέγιστο).

Έναρξη δοκιμασίας

31. Όσον αφορά τα γονικά ζώα που χρησιμοποιούνται για την έναρξη της δοκιμασίας, θα πρέπει να αποδειχθεί προηγουμένως ότι παράγουν απογόνους των οποίων το φύλο μπορεί να προσδιοριστεί γενετικά (προσάρτημα 5). Μετά την ωοτοκία των ενηλίκων, τα έμβρυα συλλέγονται, υποβάλλονται σε επεξεργασία με κυστεΐνη για την απομάκρυνση του ζελατινώδους περιβλήματος και ελέγχονται ως προς τη βιωσιμότητα (23). Η επεξεργασία με κυστεΐνη επιτρέπει τον χειρισμό των εμβρύων κατά το στάδιο της διαλογής χωρίς αυτά να προσκολλώνται σε επιφάνειες. Η διαλογή πραγματοποιείται μέσω στερεοσκοπικού μικροσκοπίου με χρήση σταγονόμετρου κατάλληλου μεγέθους για την απομάκρυνση των μη βιώσιμων εμβρύων. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για τη δοκιμή μια ωοτοκία που έχει βιωσιμότητα μεγαλύτερη από 70 %. Τα έμβρυα σταδίου 8-10 κατά NF κατανέμονται τυχαία σε δεξαμενές αγωγής έκθεσης που περιέχουν κατάλληλο όγκο νερού αραίωσης, έτσι ώστε η κάθε δεξαμενή να περιέχει 20 έμβρυα. Ο χειρισμός των εμβρύων κατά τη διάρκεια αυτής της μεταφοράς θα πρέπει να πραγματοποιείται με προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση στρες λόγω του χειρισμού και να αποφεύγονται τυχόν τραυματισμοί. 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, οι γυρίνοι θα πρέπει να έχουν ανέλθει στη στήλη ύδατος και να έχουν αρχίσει να προσκολλώνται στα τοιχώματα της δεξαμενής.

Πρόγραμμα σίτισης

32. Η τροφή και η αλλαγή του ρυθμού σίτισης κατά τα διάφορα στάδια ζωής του *X. laevis* αποτελούν πολύ σημαντική πτυχή του πρωτοκόλλου LAGDA. Η υπερβολική σίτιση κατά το προνυμφικό στάδιο προκαλεί κατά κανόνα αύξηση της επίπτωσης και της σοβαρότητας της σκολίωσης (προσάρτημα 8) και θα πρέπει να αποφεύγεται. Αντιθέτως, η ελλιπής σίτιση κατά το προνυμφικό στάδιο προκαλεί ιδιαίτερα μεταβλητούς ρυθμούς ανάπτυξης στους μάρτυρες και ενδέχεται να μειώσει τη στατιστική ισχύ ή να επιδράσει συγχυτικά στα αποτελέσματα της δοκιμής. Στο προσάρτημα 4 περιγράφεται η συνιστώμενη διατροφή και τα προγράμματα σίτισης για τις προνύμφες και τα νεαρά άτομα του *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής, ωστόσο επιτρέπονται εναλλακτικές λύσεις με την προϋπόθεση ότι οι οργανισμοί δοκιμής αυξάνονται και αναπτύσσονται ικανοποιητικά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, εάν εξετάζονται παράμετροι που αφορούν το ενδοκρινικό σύστημα, η τροφή δεν θα πρέπει να περιέχει ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα, όπως άλευρο σόγιας.

Σίτιση των προνυμφών

33. Το συνιστώμενο σιτηρέσιο των προνυμφών περιλαμβάνει αρχικές τροφές για πέστροφες, δισκία φυκών *Spirulina* και νιφάδες για χρυσόψαρα (π.χ. νιφάδες TetraFin®, Tetra, Γερμανία) αναμεμιγμένα σε νερό καλλιέργειας (ή αραίωσης). Το μείγμα αυτό χορηγείται τρεις φορές ημερησίως τις καθημερινές και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα. Στους γυρίνους χορηγούνται επίσης ζωντανές γαρίδες της άλμης (ναύπλιοι *Artemia* spp. ηλικίας 24 ωρών), δύο φορές ημερησίως τις καθημερινές και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα, αρχίζοντας την 8η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Η σίτιση των προνυμφών, η οποία πρέπει να είναι σταθερή σε κάθε δοχείο δοκιμής, θα πρέπει να επιτρέπει την κατάλληλη αύξηση και ανάπτυξη των ζώων δοκιμής προκειμένου να διασφαλίζεται η αναπαραγωγιμότητα και η δυνατότητα μεταφοράς των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας: 1) ο διάμεσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στους μάρτυρες θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες και 2) συνιστάται το μέσο βάρος έως το στάδιο 62 κατά NF να είναι εντός του ορίου 1,0 ± 0,2g στους μάρτυρες.

Σίτιση των νεαρών ατόμων

34. Αφού ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση, το πρόγραμμα σίτισης περιλαμβάνει υψηλής ποιότητας βυθιζόμενη τροφή βατράχων, π.χ. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, ΗΠΑ) (προσάρτημα 4). Για τα πρώιμα νεαρά άτομα, οι κόκκοι αλέθονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε συσκευή άλεσης καφέ ή αναμικτήρα ή συνθλίβονται σε γουδί προκειμένου να μειωθεί το μέγεθός τους. Αφού τα νεαρά άτομα μεγαλώσουν αρκετά ώστε να μπορούν να καταναλώνουν πλήρεις κόκκους, δεν χρειάζεται πια άλεση ή σύνθλιψη. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται μία φορά ημερησίως. Η σίτιση των νεαρών ατόμων θα πρέπει να επιτρέπει την κατάλληλη αύξηση και ανάπτυξη των οργανισμών: συνιστάται μέσο βάρος 11,5 ± 3 g στα νεαρά άτομα μάρτυρες κατά τη λήξη της δοκιμασίας.

Αναλυτική χημεία

35. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. διαλυτότητα, ικανότητα αποδόμησης και πτητικότητα) και να επιλέγονται οι απαραίτητες αναλυτικές μέθοδοι, π.χ. βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών ή γνώσεων. Όταν η δόση χορηγείται μέσω του νερού αραίωσης, συνιστάται, πριν από την έναρξη της δοκιμής, να αναλύονται τα διαλύματα δοκιμής από κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος προκειμένου να επαληθεύονται οι επιδόσεις του συστήματος. Στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε εβδομάδα για τουλάχιστον ένα πανομοιότυπο δείγμα σε κάθε ομάδα αγωγής, με κυκλική εναλλαγή μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων της ίδιας ομάδας αγωγής κάθε εβδομάδα. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ±20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές. Επίσης, ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) των μετρούμενων συγκεντρώσεων δοκιμής καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής σε μία αγωγή θα πρέπει να διατηρείται εντός του ορίου του 20 % ή λιγότερο σε κάθε συγκέντρωση. Όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις δεν διατηρούνται εντός του ορίου 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης (για παράδειγμα, κατά την υποβολή σε δοκιμή χημικών ουσιών με υψηλή ικανότητα αποδόμησης ή προσρόφησης), οι συγκεντρώσεις επίδρασης θα πρέπει να προσδιορίζονται και να εκφράζονται σε σχέση με την αριθμητική μέση συγκέντρωση για τις δοκιμές συνεχούς ροής.

36. Οι ρυθμοί ροής του νερού αραίωσης και του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να ελέγχονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα (π.χ. τρεις φορές την εβδομάδα) καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης. Σε περιπτώσεις χημικών ουσιών που δεν μπορούν να ανιχνευτούν σε ορισμένες ή σε όλες τις ονομαστικές συγκεντρώσεις, (π.χ. λόγω ταχείας αποδόμησης ή προσρόφησης στα δοχεία δοκιμής, ή λόγω έντονης συσσώρευσης στο σώμα των εκτιθέμενων ζώων), συνιστάται ο ρυθμός ανανέωσης του διαλύματος δοκιμής σε κάθε θάλαμο να προσαρμόζεται ώστε να διατηρούνται οι συγκεντρώσεις δοκιμής όσο το δυνατόν πιο σταθερές.

Παρατηρήσεις και μετρήσεις παραμέτρων

37. Οι παράμετροι που αξιολογούνται στη διάρκεια της έκθεσης είναι εκείνες που είναι ενδεικτικές της τοξικότητας, περιλαμβανομένης της θνησιμότητας, της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, όπως κλινικά σημεία ασθένειας και/ή γενικές τοξικότητες, και προσδιορισμοί της σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος), καθώς και παράμετροι παθολογίας οι οποίες ενδέχεται να αντιδρούν τόσο στη γενική τοξικότητα όσο και στους ενδοκρινικούς τρόπους δράσης που πλήττουν οδούς που διαμεσολαβούνται από οιστρογόνα, ανδρογόνα ή θυρεοειδικές ορμόνες. Επιπλέον, κατά τη λήξη της δοκιμασίας μπορεί να μετράται προαιρετικά η συγκέντρωση της VTG στο πλάσμα. Η μέτρηση της VTG μπορεί να είναι χρήσιμη για την κατανόηση των αποτελεσμάτων της μελέτης στο πλαίσιο ενδοκρινικών μηχανισμών για εικαζόμενους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Οι παράμετροι και το χρονοδιάγραμμα μετρήσεων συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Επισκόπηση παραμέτρων της LAGDA

Παράμετροι (*)	Καθημερινά	Ενδιάμεση δειγματοληψία (δειγματοληψία προνυμφών)	Λήξη της δοκιμής (δειγματοληψία νεαρών ατόμων)
Θνησιμότητα και ανωμαλίες	X		
Χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF		X	
Ιστο(παθο)λογία (θυρεοειδής αδένας)		X	
Μορφομετρικά στοιχεία (σωματική αύξηση: βάρος και μήκος)		X	X
Ηπατοσωματικός δείκτης (LSI)			X
Αναλογίες γενετικών/φαινοτυπικών φύλων			X
Ιστοπαθολογία (γονάδες, αναπαραγωγικοί πόροι, νεφρός και ήπαρ)			X
Λεκιθογενίνη (VTG) (προαιρετικά)			X

(*) Όλες οι παράμετροι υποβάλλονται σε στατιστική ανάλυση.

Θνησιμότητα και καθημερινές παρατηρήσεις

38. Όλες οι δεξαμενές δοκιμής θα πρέπει να ελέγχονται καθημερινά για νεκρά ζώα και θα πρέπει να καταγράφονται οι τιμές θνησιμότητας για κάθε δεξαμενή. Τα νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τη δεξαμενή δοκιμής αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά. Θα πρέπει να κατηγοριοποιείται το αναπτυξιακό στάδιο των νεκρών ζώων είτε ως «προ σταδίου 58 κατά NF» (πριν από την εμφάνιση του πρόσθιου άκρου), ως «στάδιο 58 κατά NF έως στάδιο 62 κατά NF», ως «στάδιο 63 κατά NF έως στάδιο 66 κατά NF» (μεταξύ σταδίου 62 κατά NF και πλήρους απορρόφησης της ουράς), ή ως «μετά το στάδιο 66 κατά NF» (μετά το στάδιο της προνύμφης). Τιμές θνησιμότητας που υπερβαίνουν το 20 % ενδέχεται να υποδεικνύουν ακατάλληλες συνθήκες δοκιμής ή έκδηλες τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Τα ζώα είναι συνήθως πιο επιρρεπή στον θάνατο από άλλες αιτίες εκτός των χημικών ουσιών κατά τις πρώτες ημέρες της ανάπτυξης μετά την ωοτοκία και κατά την κορύφωση της μεταμόρφωσης. Τέτοιου είδους θνησιμότητα μπορεί να διαπιστωθεί από τα δεδομένα για τους μάρτυρες.

39. Επιπλέον, τυχόν παρατήρηση μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, μακροσκοπικά ορατών δυσπλασιών (π.χ. σκολίωση), ή αλλοιώσεων θα πρέπει να καταγράφεται. Οι παρατηρήσεις σκολίωσης θα πρέπει να μετρώνται (συχνότητα εμφάνισης) και να διαβαθμίζονται ως προς τη σοβαρότητα (π.χ. μη αξιοσημείωτη: NR, ελάχιστη: 1, μέτρια: 2, σοβαρή: 3 – βλ. προσάρτημα 8). Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες ώστε να περιορίζεται ο επιπολασμός της μέτριας και σοβαρής σκολίωσης (π.χ. κάτω του 10 % στους μάρτυρες) καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, αν και η ύπαρξη υψηλότερου επιπολασμού ανωμαλιών δεν θα πρέπει να αποτελεί απαραιτήτως λόγο διακοπής της δοκιμής. Η φυσιολογική συμπεριφορά των προνυμφών χαρακτηρίζεται από αιώρηση στη στήλη ύδατος με την ουρά σηκωμένη πάνω από το κεφάλι, τακτικό και ρυθμικό χτύπημα του ουραίου πτερυγίου, περιοδική ανάδυση στην επιφάνεια του νερού, ανοιγοκλείσιμο των επικαλυμμάτων των βραγχίων, και αντίδραση σε ερεθίσματα. Μη φυσιολογικές συμπεριφορές μπορεί να περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης και αδυναμία αντίδρασης σε ερεθίσματα. Για τα ζώα που έχουν ολοκληρώσει το στάδιο της μεταμόρφωσης, πέραν των προαναφερθεισών μη φυσιολογικών συμπεριφορών, θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των αγωγών. Μακροσκοπικές δυσπλασίες και αλλοιώσεις είναι, μεταξύ άλλων, οι μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), οι αιμορραγικές βλάβες, το οίδημα της κοιλίας και οι λοιμώξεις από βακτήρια ή μύκητες. Η εμφάνιση αλλοιώσεων στο κεφάλι των νεαρών ατόμων, ακριβώς πίσω από τα ρουθούνια, μπορεί να αποτελεί ένδειξη ανεπαρκών επιπέδων υγρασίας. Οι προσδιορισμοί αυτοί είναι ποιοτικοί και θα πρέπει να θεωρούνται παρόμοιοι με κλινικά σημεία ασθένειας/στρες, καθώς και να γίνονται σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες. Εάν η συχνότητα εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερη στις δεξαμενές έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες, θα πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας.

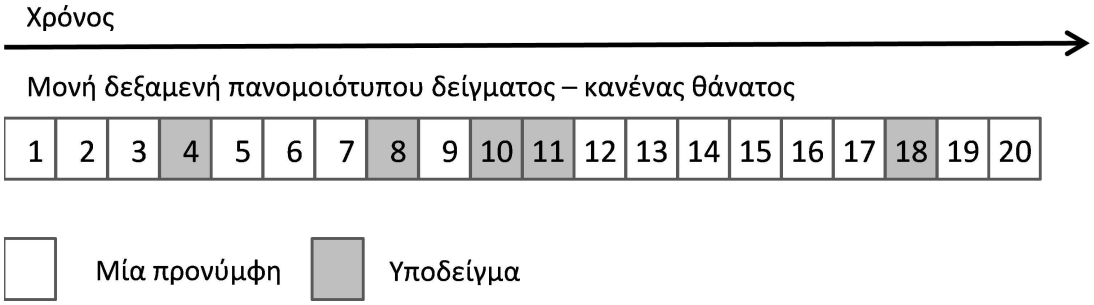
Δειγματοληψία υποδειγμάτων προνυμφών

Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας υποδειγμάτων προνυμφών:

40. Οι γυρίνοι που φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF θα πρέπει είτε να απομακρύνονται από τις δεξαμενές και κατόπιν να υποβάλλονται σε δειγματοληψία ή να μετακινούνται σε νέα δεξαμενή για τη διεξαγωγή της επόμενης φάσης έκθεσης, είτε να διαχωρίζονται από τους εναπομείναντες γυρίνους στην ίδια δεξαμενή με διαχωριστικό. Οι γυρίνοι ελέγχονται καθημερινά, και καταγράφεται η ημέρα της μελέτης κατά την οποία ένας μεμονωμένος γυρίνος φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται στην εν λόγω αξιολόγηση είναι το σχήμα του κεφαλιού. Μόλις το μέγεθος του κεφαλιού μειωθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε το πλάτος του να είναι οπτικά περίπου ίδιο με το πλάτος του κορμού και των εμπρόσθιων άκρων του γυρίνου στο επίπεδο του μέσου της καρδιάς, τότε θεωρείται ότι το συγκεκριμένο άτομο έχει φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF.
41. Ο στόχος είναι η εξέταση συνολικά πέντε γυρίνων σταδίου 62 κατά NF ανά δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος. Η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιείται απολύτως τυχαία, αλλά να αποφασίζεται εκ των προτέρων. Ένα υποθετικό παράδειγμα δεξαμενής πανομοιότυπου δείγματος παρέχεται στο **σχήμα 1**. Σε περίπτωση που σε μια συγκεκριμένη δεξαμενή υπάρχουν 20 επιβιώσαντες γυρίνοι όταν το πρώτο άτομο φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF, θα πρέπει να επιλέγονται πέντε τυχαίοι αριθμοί μεταξύ 1 και 20. Ο γυρίνος αριθ. 1 είναι το πρώτο άτομο που φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF και ο γυρίνος αριθ. 20 είναι το τελευταίο άτομο σε μια δεξαμενή που φθάνει το στάδιο 62 κατά NF. Παρομοίως, εάν σε μια δεξαμενή έχουν επιβιώσει 18 προνύμφες, θα πρέπει να επιλέγονται πέντε τυχαίοι αριθμοί μεταξύ 1 και 18. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να εκτελείται για κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος όταν το πρώτο άτομο υπό δοκιμή φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF. Εάν στη διάρκεια της δειγματοληψίας υπάρχουν θάνατοι ατόμων που φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF, τα δείγματα που απομένουν πρέπει να τυχαιοποιούνται εκ νέου ανάλογα με τον αριθμό των προνυμφών που έχουν απομείνει και οι οποίες δεν έχουν φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF και ανάλογα με τον αριθμό επιπλέον δειγμάτων που απαιτείται προκειμένου να συμπληρωθούν συνολικά πέντε δείγματα από το συγκεκριμένο πανομοιότυπο δείγμα. Την ημέρα που ένας γυρίνος φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF, θα πρέπει να καταγράφεται στον προετοιμασμένο πίνακα δειγματοληψίας το εάν το συγκεκριμένο άτομο υποβάλλεται σε εξέταση ή διαχωρίζεται από τους υπόλοιπους γυρίνους για τη συνέχιση της έκθεσης. Στο παρατιθέμενο παράδειγμα (σχήμα 1), το πρώτο άτομο που φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF (δηλ. στο πλαίσιο #1) διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες προνύμφες, συνεχίζει να υποβάλλεται σε έκθεση και καταγράφεται η ημέρα της μελέτης στην οποία το συγκεκριμένο άτομο έφθασε στο στάδιο 62 κατά NF. Επακολούθως, τα άτομα #2 και #3 υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία με το άτομο #1 και, στη συνέχεια, το άτομο #4 υποβάλλεται σε εξέταση της σωματικής αύξησης και της ιστολογικής εικόνας του θυρεοειδούς (στο συγκεκριμένο παράδειγμα). Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου το 20ο άτομο είτε προστεθεί στα υπόλοιπα άτομα μετά το στάδιο 62 κατά NF είτε υποβληθεί σε εξέταση. Η τυχαία διαδικασία που χρησιμοποιείται πρέπει να παρέχει την ίδια πιθανότητα επιλογής σε κάθε οργανισμό της δοκιμής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με χρήση οποιασδήποτε μεθόδου τυχαιοποίησης, αλλά θα πρέπει επίσης κάθε γυρίνος να παγιδευτεί με απόχη σε κάποια χρονική στιγμή της περιόδου λήψης υποδειγμάτων σταδίου 62 κατά NF.

Σχήμα 1

Υποθετικό παράδειγμα συστήματος δειγματοληψίας σταδίου 62 κατά NF για μεμονωμένη δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος



42. Για τη δειγματοληψία υποδείγματος προνυμφών, οι μετρούμενες παράμετροι είναι ακόλουθες: 1) χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF (δηλ. αριθμός ημερών μεταξύ της γονιμοποίησης και του σταδίου 62 κατά NF), 2) εξωτερικές ανωμαλίες, 3) μορφομετρικά στοιχεία (π.χ. βάρος και μήκος) και 4) ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς.

Θανάτωση γυρίνων

43. Το υποδείγμα γυρίνων σταδίου 62 κατά NF (5 άτομα ανά πανομοιότυπο δείγμα) θα πρέπει να θανατώνεται με ευθανασία μέσω εμβύθισης επί 30 λεπτά σε κατάλληλες ποσότητες (π.χ. 500 ml) αναισθητικού διαλύματος (π.χ. διάλυμα 0,3 % MS-222, μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης, CAS.886-86-2). Στο διάλυμα MS-222 θα πρέπει να προστίθεται διττανθρακικό νάτριο για ρύθμιση του pH περίπου στο 7,0, διότι το διάλυμα MS-222 χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα είναι όξινο και προκαλεί ερεθισμό στο δέρμα του βατράχου, με αποτέλεσμα κακή απορρόφηση και περιττό στρες.
44. Με χρήση απόχης, ένας γυρίνος απομακρύνεται από τον πειραματικό θάλαμο και μεταφέρεται (τοποθετείται) στο διάλυμα ευθανασίας. Το ζώο έχει θανατωθεί κατάλληλα και είναι έτοιμο για νεκροψία/νεκροτομή όταν δεν αντιδρά σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως το τσίμπημα του οπίσθιου άκρου με λαβίδα.

Μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος)

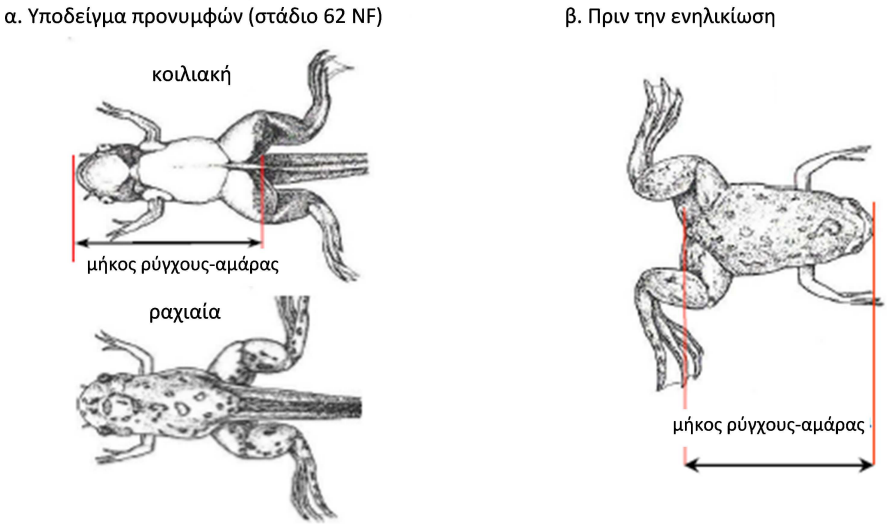
45. Αμέσως μόλις ο γυρίνος σταματήσει να αντιδρά λόγω αναισθησίας, θα πρέπει να πραγματοποιούνται μετρήσεις του νωπού βάρους (με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου) και του μήκους ρύγχους-αμάρας (SVL) (με ακρίβεια 0,1 χιλιοστόμετρου) κάθε γυρίνου (σχήμα 2α). Μπορεί να χρησιμοποιείται λογισμικό ανάλυσης εικόνας για τη μέτρηση του SVL από φωτογραφία. Προτού ζυγιστούν, οι γυρίνοι θα πρέπει να στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί ώστε να αφαιρείται τυχόν περίσσεια νερού. Μετά τις μετρήσεις του σωματικού μεγέθους (βάρος και SVL), θα πρέπει να καταγράφονται ή να σημειώνονται τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες και/ή κλινικά σημεία τοξικότητας όπως σκολίωση (βλ. προσάρτημα 8), πετέχειες και αιμορραγία, η τεκμηρίωση των οποίων συνιστάται να γίνεται με ψηφιακά μέσα. Επισημαίνεται ότι οι πετέχειες είναι μικρές αιμορραγίες κόκκινου ή μωβ χρώματος στα τριχοειδή αγγεία του δέρματος.

Συλλογή και μονιμοποίηση ιστών

46. Για το υποδείγμα προνυμφών, αξιολογείται η ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς αδένα. Το κάτω τμήμα του κορμού που βρίσκεται πίσω από τα πρόσθια άκρα αφαιρείται και απορρίπτεται. Το υπόλοιπο σώμα μονιμοποιείται σε μέσο μονιμοποίησης Davidson. Ο όγκος του μέσου μονιμοποίησης στον περιέκτη θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος του κατά προσέγγιση όγκου των ιστών. Θα πρέπει να διασφαλίζεται η κατάλληλη ανακίνηση ή κυκλοφορία του μέσου μονιμοποίησης προκειμένου να μονιμοποιούνται επαρκώς οι υπό μελέτη ιστοί. Όλοι οι ιστοί παραμένουν σε μέσο μονιμοποίησης Davidson επί τουλάχιστον 48 ώρες, αλλά όχι περισσότερο από 96 ώρες, οπότε και εκπλένονται με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10 % (1) (29).

Ιστολογία θυρεοειδούς

47. Αξιολογείται η ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς αδένα κάθε υποδείγματος προνυμφών (μονιμοποιημένοι ιστοί), δηλ. διάγνωση και αξιολόγηση σοβαρότητας (29) (30).



Σχήμα 2: Ορόσημα για τη μέτρηση του μήκους ρύγχους-αμάρας για τη LAGDA σε άτομα σταδίου 62 κατά NF 62 (α) και νεαρούς βατράχους (β). Τα καθοριστικά χαρακτηριστικά του σταδίου 62 κατά NF 62 (α) είναι τα ακόλουθα: το κεφάλι έχει το ίδιο πλάτος με τον κορμό, το μήκος του οσφρητικού νεύρου είναι μικρότερο από τη διάμετρο του οσφρητικού βολβού (ραχιαία όψη), και τα πρόσθια άκρα βρίσκονται στο επίπεδο της καρδιάς (κοιλιακή όψη). Εικόνες προσαρμοσμένες από Nieuwkoop και Faber (1994).

Λήξη της έκθεσης των προνυμφών

48. Δεδομένου του αρχικού αριθμού των γυρίνων, αναμένεται ότι πιθανώς θα υπάρχει μικρό ποσοστό ατόμων που δεν θα αναπτυχθούν φυσιολογικά και δεν θα ολοκληρώσουν τη μεταμόρφωση (στάδιο 66 κατά NF) εντός εύλογου χρονικού διαστήματος. Το προνυμφικό διάστημα της περιόδου έκθεσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 70 ημέρες. Οι γυρίνοι που τυχόν απομένουν μετά το διάστημα αυτό θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (βλ. παράγραφο 43), να εξετάζονται ως προς το νωπό βάρος και το SVL και να κατατάσσονται σε στάδιο κατά Nieuwkoop και Faber (1994), και τυχόν αναπτυξιακές ανωμαλίες θα πρέπει να σημειώνονται.

Επιλεκτική θανάτωση μετά το στάδιο 66 κατά NF

49. Δέκα άτομα ανά δεξαμενή θα πρέπει να συνεχίσουν από το στάδιο 66 κατά NF (πλήρης απορρόφηση της ουράς) μέχρι τη λήξη της έκθεσης. Ως εκ τούτου, αφού όλα τα ζώα φθάσουν στο στάδιο 66 κατά NF ή μετά από 70 ημέρες (όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο), θα πρέπει να γίνει επιλεκτική θανάτωση κάποιων ατόμων. Τα ζώα μετά το στάδιο 66 κατά NF που δεν θα συνεχίσουν να εκτίθενται θα πρέπει να επιλέγονται τυχαία.

50. Τα ζώα που δεν επιλέγονται για συνέχιση της έκθεσης θανατώνονται με ευθανασία (βλ. παράγραφο 43). Για κάθε ζώο πραγματοποιούνται μετρήσεις του αναπτυξιακού σταδίου, του νωπού βάρους και του SVL (σχήμα 2β) και διενεργείται μακροσκοπική νεκροψία. Το φαινοτυπικό φύλο (βάσει της γοναδικής μορφολογίας) σημειώνεται ως θηλυκό, αρσενικό ή απροσδιόριστο.

Δειγματοληψία νεαρών ατόμων

Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας νεαρών ατόμων

51. Τα ζώα που απομένουν συνεχίζουν να εκτίθενται μέχρι να παρέλθουν 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα νερού αραίωσης (και/ή στον μάρτυρα με διαλύτη, εάν υπάρχει). Κατά τη λήξη της περιόδου έκθεσης, τα ζώα που απομένουν (10 βάτραχοι ανά πανομοιότυπο δείγμα κατά μέγιστο) θανατώνονται με ευθανασία και οι διάφορες παράμετροι μετρώνται ή αξιολογούνται και καταγράφονται: 1) μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος), 2) αναλογίες φαινοτυπικών/γονοτυπικών φύλων, 3) βάρος ήπατος (ηπατοσωματικός δείκτης), 4) ιστοπαθολογία (γονάδες, αναπαραγωγικοί πόροι, ήπαρ και νεφρός) και, προαιρετικά, 5) VTG πλάσματος.

Θανάτωση βατράχων με ευθανασία

52. Τα δείγματα νεαρών ατόμων, οι βάτραχοι μετά τη μεταμόρφωση, θανατώνονται με ευθανασία με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση αναισθητικού, π.χ. MS-22210 % σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η εξέταση των βατράχων μπορεί να γίνει αφού αυτοί σταματήσουν να αντιδρούν (συνήθως γύρω στα 2 λεπτά μετά την έγχυση, εάν χρησιμοποιηθεί MS-22210 % σε δοσολογία 0,01 ml ανά γραμμάριο βατράχου). Τα νεαρά άτομα βατράχων μπορούν επίσης να αναισθητοποιούνται με εμβύθιση σε αναισθητικό (MS-222) υψηλότερης συγκέντρωσης, αλλά η εμπειρία έχει δείξει ότι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αναισθητοποίησή τους είναι μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιείται αυτή η μέθοδος και η αναισθησία μπορεί να μη διαρκεί όσο χρειάζεται για τη δειγματοληψία. Με την έγχυση εξασφαλίζεται αποτελεσματική και ταχεία ευθανασία πριν από τη δειγματοληψία. Η δειγματοληψία δεν θα πρέπει να ξεκινά μέχρι να επιβεβαιωθεί η απουσία αντίδρασης των βατράχων, ούτως ώστε να διασφαλίζεται ότι όλα τα ζώα είναι νεκρά. Εάν οι βάτραχοι εμφανίζουν συμπτώματα έντονης οδύνης (μπορεί να προβλεφθεί με ασφάλεια η πρόκληση ιδιαίτερα έντονης οδύνης και θανάτου) και θεωρούνται ετοιμοθάνατοι, πρέπει να αναισθητοποιούνται και να θανατώνονται με ευθανασία, και να συγκαταλέγονται στην παράμετρο της θνησιμότητας στο πλαίσιο της ανάλυσης δεδομένων. Όταν ένας βάτραχος θανατώνεται με ευθανασία λόγω νοσηρότητας, αυτό θα πρέπει να καταγράφεται και να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή της μελέτης κατά την οποία θανατώνεται ο βάτραχος, μπορεί να διατηρείται με σκοπό τη διεξαγωγή ιστοπαθολογικής ανάλυσης (μονιμοποίηση του βατράχου για πιθανή ιστοπαθολογική ανάλυση).

Μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος)

53. Οι μετρήσεις του νωπού βάρους και του SVL (σχήμα 2β) είναι όμοιες με εκείνες που περιγράφονται για τη δειγματοληψία υποδειγμάτων προνυμφών.

VTG πλάσματος (προαιρετικά)

54. Η VTG είναι ευρέως αποδεκτή ως βιοδείκτης που προκύπτει από την έκθεση σε οιστρογονικές χημικές ουσίες. Για τη LAGDA, μπορεί να μετράται προαιρετικά η VTG πλάσματος σε δείγματα νεαρών ατόμων (η μέτρηση μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι οιστρογόνο).

55. Τα οπίσθια άκρα του θανατωμένου νεαρού ατόμου αποκόπτονται και συλλέγεται αίμα με ηπαρινισμένο τριχοειδές σωληνάριο (αν και μπορεί να είναι κατάλληλες εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής αίματος, όπως η καρδιακή παρακέντηση). Το αίμα αποβάλλεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης (π.χ. όγκου 1,5 ml) και φυγοκεντρείται για να ληφθεί το πλάσμα. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να φυλάσσονται στους -70 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία μέχρι τον προσδιορισμό της VTG. Η συγκέντρωση της VTG στο πλάσμα μπορεί να μετρηθεί με ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο προσδιορισμού (ELISA) (προσάρτημα 6) ή με εναλλακτική μέθοδο, όπως φασματομετρία μάζας (31). Προτιμώνται αντισώματα ειδικά για το συγκεκριμένο ζωικό είδος, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας τους.

Προσδιορισμός γενετικού φύλου

56. Το γενετικό φύλο κάθε νεαρού ατόμου βατράχων αξιολογείται βάσει των δεικτών που ανέπτυξαν οι Yoshimoto *et al.* (11). Για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου, τμήμα (ή ολόκληρο) ενός οπίσθιου άκρου (ή οποιουδήποτε άλλου ιστού) που αφαιρέθηκε κατά την ανατομή συλλέγεται και φυλάσσεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης (δείγματα ιστών βατράχων μπορούν να ληφθούν από οποιονδήποτε ιστό). Ο ιστός μπορεί να φυλάσσεται στους -20 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία μέχρι την απομόνωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA). Η απομόνωση του DNA από τους ιστούς μπορεί να πραγματοποιείται με κιτ του εμπορίου, ενώ η ανάλυση για την παρουσία ή την απουσία του δείκτη πραγματοποιείται με μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (προσάρτημα 5). Γενικά, η συμφωνία μεταξύ του ιστολογικού φύλου και του γονοτύπου στα ζώα μάρτυρες κατά τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας νεαρών ατόμων σε ομάδες μάρτυρες υπερβαίνει το 95 %.

Συλλογή ιστών και μονιμοποίηση για ιστοπαθολογική εξέταση

57. Κατά την τελευταία δειγματοληψία συλλέγονται οι γονάδες, οι γεννητικοί πόροι, οι νεφροί και τα ήπατα για ιστοπαθολογική ανάλυση. Η κοιλιακή κοιλότητα ανοίγεται και πραγματοποιείται εκτομή και ζύγιση του ήπατος. Στη συνέχεια, τα όργανα του πεπτικού συστήματος (π.χ. στόμαχος, έντερο) αφαιρούνται προσεκτικά από την κάτω κοιλιακή χώρα προκειμένου να αποκαλυφθούν οι γονάδες, οι νεφροί και οι γεννητικοί πόροι. Τυχόν μακροσκοπικές μορφολογικές ανωμαλίες στις γονάδες θα πρέπει να σημειώνονται. Τέλος, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να αφαιρούνται, εάν δεν έχουν ήδη αφαιρεθεί για συλλογή αίματος. Τα συλλεχθέντα ήπατα και το νεκρό σώμα με τις γονάδες αφημένες *in situ* θα πρέπει να τοποθετούνται αμέσως σε μέσο μονιμοποίησης Davidson. Ο όγκος του μέσου μονιμοποίησης στον περιέκτη θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος του κατά προσέγγιση όγκου των ιστών. Όλοι οι ιστοί παραμένουν σε μέσο μονιμοποίησης Davidson επί τουλάχιστον 48 ώρες, αλλά όχι περισσότερο από 96 ώρες, οπότε και εκπλένονται με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10 % (1) (29).

Ιστοπαθολογία

58. Πραγματοποιείται αξιολόγηση της ιστολογικής εικόνας κάθε νεαρού ατόμου για την ανίχνευση τυχόν παθολογικών καταστάσεων στον ιστό των γονάδων, των γεννητικών πόρων, των νεφρών και του ήπατος, δηλ. διάγνωση και αξιολόγηση σοβαρότητας (32). Από την αξιολόγηση προσδιορίζεται επίσης ο φαινότυπος των γονάδων (π.χ. ωοθήκες, όρχεις, ακαθόριστο) και οι παρατηρήσεις αυτές, μαζί με τις ατομικές μετρήσεις γενετικού φύλου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των αναλογιών των φαινοτυπικών/γονοτυπικών φύλων.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στατιστική ανάλυση

59. Από τη LAGDA προκύπτουν τρεις τύποι δεδομένων προς στατιστική ανάλυση: 1) ποσοτικά συνεχή δεδομένα (βάρος, SVL, LSI, VTG), 2) δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν, για τους ρυθμούς ανάπτυξης (δηλ. ημέρες μέχρι το στάδιο 62 κατά NF από την έναρξη της δοκιμασίας) και 3) διατάξιμα δεδομένα υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων από ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις.

60. Συνιστάται ο σχεδιασμός της δοκιμής και η επιλογή στατιστικού ελέγχου να παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ για την ανίχνευση των μεταβολών με βιολογική σημασία στις παραμέτρους σε σχέση με τις οποίες πρέπει να αναφέρεται NOEC ή ECx. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων (γενικά, βάσει του μέσου όρου πανομοιότυπων δειγμάτων) θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» (Σύγχρονες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (33). Στο προσάρτημα 7 της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιλαμβάνεται το συνιστώμενο διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης και καθοδήγηση για την επεξεργασία των δεδομένων και την επιλογή του καταλληλότερου στατιστικού ελέγχου ή μοντέλου για χρήση στο πλαίσιο της LAGDA.

61. Τα δεδομένα από τη δειγματοληψία νεαρών ατόμων (π.χ. σωματική αύξηση, LSI) θα πρέπει να αναλύονται για κάθε γονοτυπικό φύλο χωριστά, δεδομένου ότι το γονοτυπικό φύλο προσδιορίζεται για όλα τα άτομα.

Θέματα ανάλυσης δεδομένων

Χρήση υπονομευμένων πανομοιότυπων δειγμάτων και αγωγών

62. Τα πανομοιότυπα δείγματα και οι αγωγές ενδέχεται να υπονομευτούν εξαιτίας υπέρμετρης θνησιμότητας λόγω έκδηλης τοξικότητας, ασθένειας ή τεχνικού σφάλματος. Σε περίπτωση υπονόμευσης μιας αγωγής λόγω ασθένειας ή τεχνικού σφάλματος, θα πρέπει να υπάρχουν τρεις μη υπονομευμένες αγωγές με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα διαθέσιμα για ανάλυση. Σε περίπτωση εμφάνισης έκδηλης τοξικότητας στις αγωγές υψηλής δόσης, καλό είναι να υπάρχουν τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα διαθέσιμα για ανάλυση [όπως ορίζεται στην προσέγγιση μέγιστης ανεκτής συγκέντρωσης για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ (34)]. Πέραν της τοξικότητας, στα σημεία έκδηλης τοξικότητας μπορεί να περιλαμβάνονται συμπεριφορικές επιδράσεις (π.χ. επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης), μορφολογικές αλλοιώσεις (π.χ. αιμορραγικές αλλοιώσεις, κοιλιακό οίδημα) ή αναστολή των φυσιολογικών αντιδράσεων σίτισης σε ποιοτική σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες.

Μάρτυρας με διαλύτη

63. Στο τέλος της δοκιμής θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιείται). Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα νερού αραίωσης. Οι πλέον κατάλληλες παράμετροι προς εξέταση στην ανάλυση αυτή είναι οι παράγοντες της σωματικής αύξησης (βάρος και μήκος), καθώς αυτές επηρεάζονται από τυχόν γενικευμένη τοξικότητα. Σε περίπτωση εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των ομάδων μάρτυρα νερού αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η βέλτιστη κρίση ειδικών προκειμένου να προσδιοριστεί το κατά πόσον υπονομεύεται η εγκυρότητα της δοκιμής. Εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων, οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη, εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εάν δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μάρτυρα, συνιστάται οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία να συγκρίνονται με τις συγχωνευμένες ομάδες (ομάδες μάρτυρα με διαλύτη και μάρτυρα νερού αραίωσης), εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα νερού αραίωσης είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

64. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

— φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

— Μονοσυστατική ουσία:

φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

— Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Είδος δοκιμής:

— επιστημονική ονομασία, φυλή εάν είναι γνωστή, προέλευση και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός,

— συχνότητα εμφάνισης σκολίωσης σε ιστορικούς μάρτυρες για την αποθεματική καλλιέργεια που χρησιμοποιείται.

Συνθήκες δοκιμής:

— φωτοπερίοδος/-οι,

— σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. μέγεθος και υλικό κατασκευής θαλάμου, όγκος νερού, αριθμός θαλάμων δοκιμής και πανομοιότυπων δειγμάτων, αριθμός οργανισμών δοκιμής ανά πανομοιότυπο δείγμα),

— μέθοδος παρασκευής των αποθεματικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται),

— μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης),

— η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικό ιώδιο, ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετριέται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετριέται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, οι μέσοι όροι των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους,

— ποιότητα του νερού μέσα στα δοχεία δοκιμής, pH, θερμοκρασία (καθημερινά) και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα:

— ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας,

— δεδομένα για τον μάρτυρα (συν τον μάρτυρα με διαλύτη, όταν χρησιμοποιείται) και τις ομάδες αγωγής, ως εξής: παρατηρούμενη θνησιμότητα και ανωμαλίες, χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF, ιστολογική αξιολόγηση του θυρεοειδούς (μόνο στο δείγμα προνυμφών), σωματική αύξηση (βάρος και μήκος), LSI (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων), αναλογίες γενετικών/γονοτυπικών φύλων (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων), αποτελέσματα ιστοπαθολογικής αξιολόγησης για τις γονάδες, τους γεννητικούς πόρους, τον νεφρό και το ήπαρ (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων) και VTG πλάσματος (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων, εάν διεξάγεται),

— προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικός έλεγχος ή στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε),

— συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε,

— κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (σε α = 0,05), ECx για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους,

— οποιαδήποτε απόκλιση από τη μέθοδο δοκιμών και οι αποκλίσεις από τα κριτήρια αποδοχής, και εκτιμήσεις των δυνητικών επιπτώσεων στην έκβαση της δοκιμής.

65. Για τα αποτελέσματα των μετρήσεων παραμέτρων, θα πρέπει να παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους (ει δυνατόν, τόσο ανά πανομοιότυπο δείγμα όσο και ανά συγκέντρωση).

66. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο διάμεσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στους μάρτυρες και να παρουσιάζεται ως ο μέσος όρος των διάμεσων τιμών των πανομοιότυπων δειγμάτων με την τυπική απόκλισή τους. Παρομοίως, για τις αγωγές, θα πρέπει να υπολογίζεται μια διάμεση τιμή αγωγής και να παρουσιάζεται ως ο μέσος όρος των διάμεσων τιμών των πανομοιότυπων δειγμάτων με την τυπική απόκλισή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

(18) Κεφάλαιο Γ.29 του παρόντος παραρτήματος: Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα - CO_2 σε σφραγισμένα δοχεία (δοκιμή υπερκείμενης φάσης).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, 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., 84 pp.

(25) Κεφάλαιο Γ.38 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφίβιων.

(26) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια.

(27) Κεφάλαιο Γ.41 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών.

(28) Κεφάλαιο Γ.49 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Παράμετρος κορυφαίου επιπέδου: που έχει επίδραση σε επίπεδο πληθυσμού

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Δοκιμή ELISA: ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός

ECx: (συγκέντρωση επίδρασης για επίδραση x %) η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC50 είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε παράμετρο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

dpf: (days post fertilization) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση

Έλεγχος συνεχούς ροής: δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής μέσω του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης

Άξονας HPG: άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Το προσάρτημα 7 παρέχει οδηγίες.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC50): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50 % των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

SMILES: (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) προδιαγραφή απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

VTG: η λεκιθογενίνη είναι φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 μg/l
Αρσενικό	1 μg/l
Χρώμιο	1 μg/l
Κοβάλτιο	1 μg/l
Χαλκός	1 μg/l
Σίδηρος	1 μg/l
Μόλυβδος	1 μg/l
Νικέλιο	1 μg/l
Ψευδάργυρος	1 μg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

Προσάρτημα 3

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗ LAGDA

1.	Είδος δοκιμής	*Xenopus laevis*
2.	Τύπος δοκιμής	Συνεχούς ροής
3.	Θερμοκρασία νερού	Η ονομαστική θερμοκρασία είναι 21 °C. Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ± 1°C (οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων και μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0°C)
4.	Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος) 600-2000 lux (lumen/m^2) στην επιφάνεια του νερού
5.	Φωτοπερίοδος	12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι
6.	Όγκος υπό δοκιμή χημικής ουσίας και δοχείο δοκιμής (δεξαμενή)	4-10 l (βάθος νερού τουλάχιστον 10–15 cm) Δεξαμενή από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα
7.	Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής	Σταθερές, βάσει της διατήρησης των βιολογικών συνθηκών και της έκθεσης στη χημική ουσία (π.χ. 5 ανανεώσεις του όγκου δεξαμενής ημερησίως)
8.	Ηλικία των οργανισμών δοκιμής κατά την έναρξη	Στάδιο 8-10 κατά Nieuwkoop και Faber (NF)
9.	Αριθμός οργανισμών ανά πανομοιότυπο δείγμα	20 ζώα (έμβρυα)/δεξαμενή (πανομοιότυπο δείγμα) κατά την έναρξη της έκθεσης και 10 ζώα (νεαρά άτομα)/δεξαμενή (πανομοιότυπο δείγμα) μετά το στάδιο 66 κατά NF μέχρι τη λήξη της έκθεσης
10.	Αριθμός αγωγών	Τουλάχιστον 4 αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία, συν κατάλληλοι μάρτυρες
11.	Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή	4 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή για την υπό δοκιμή χημική ουσία και 8 πανομοιότυπα δείγματα για τον ή τους μάρτυρες
12.	Αριθμός οργανισμών ανά συγκέντρωση δοκιμής	Τουλάχιστον 80 ζώα ανά αγωγή για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τουλάχιστον 160 ζώα για τον ή τους μάρτυρες
13.	Νερό αραίωσης	Οποιοδήποτε νερό επιτρέπει τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη του *X. laevis* (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης διηθημένο από φίλτρο ενεργού άνθρακα)
14.	Αερισμός	Δεν απαιτείται, αλλά ο αερισμός των δεξαμενών μπορεί να είναι απαραίτητος σε περίπτωση που τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου μειωθούν κάτω από τα συνιστώμενα όρια και μεγιστοποιηθούν οι αυξήσεις της ροής του διαλύματος δοκιμής.
15.	Διαλυμένο οξυγόνο του διαλύματος δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο: ≥ 40 % της τιμής κορεσμού αέρα ή ≥ 3,5 mg/l

16. pH του διαλύματος δοκιμής	6,5-8,5 (οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων και μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5)
17. Σκληρότητα και αλκαλικότητα του διαλύματος δοκιμής	10-250 mg $CaCO_3$/l
18. Πρόγραμμα σίτισης	(βλέπε προσάρτημα 4)
19. Περίοδος έκθεσης	Από το στάδιο 8-10 κατά NF έως δέκα εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο μέχρι το στάδιο 62 κατά NF σε νερό και/ή ομάδα μάρτυρα με διαλύτη (17 εβδομάδες κατά μέγιστο)
20. Βιολογικές παράμετροι	Θνησιμότητα (και ανωμαλίες στην εμφάνιση), χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF (δείγμα προνυμφών), ιστολογική αξιολόγηση του θυρεοειδούς (μόνο στο δείγμα προνυμφών), σωματική αύξηση (βάρος και μήκος), ηπατοσωματικός δείκτης (δείγμα νεαρών ατόμων), αναλογίες γενετικών/γονοτυπικών φύλων (δείγμα νεαρών ατόμων), ιστοπαθολογική αξιολόγηση γονάδων, γεννητικών πόρων, νεφρών και ήπατος (δείγμα νεαρών ατόμων) και VTG πλάσματος (δείγμα νεαρών ατόμων, προαιρετικά)
21. Κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής	Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να είναι > 40 % της τιμής κορεσμού αέρα· η μέση θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι 21 ± 1 °C και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών πρέπει να είναι 1,0°C· το pH του διαλύματος δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 8,5· η θνησιμότητα στον μάρτυρα θα πρέπει να είναι ≤ 20 % σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, και ο μέσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες· το μέσο βάρος των οργανισμών δοκιμής στο στάδιο 62 κατά NF και στη λήξη της δοκιμασίας στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να φτάνει τα 1,0 ± 0,2 και 11,5 ± 3 g, αντίστοιχα· θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

Προσάρτημα 4

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΙΤΙΣΗΣ

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι παρότι το παρόν πρόγραμμα σίτισης είναι το συνιστώμενο, επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικών προγραμμάτων υπό την προϋπόθεση ότι οι οργανισμοί δοκιμής αυξάνονται και αναπτύσσονται με τον κατάλληλο ρυθμό.

Σίτιση των προνυμφών

Παρασκεύασμα για σιτηρέσιο προνυμφών

Α. 1:1 (κ.ό.) αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin® (ή ισοδύναμο),

1. Αρχική τροφή για πέστροφες: αναμίξτε 50 g αρχικής τροφής για πέστροφες (λεπτοί κόκκοι ή σκόνη) και 300 ml κατάλληλα διηθημένου νερού σε αναμικτήρα σε υψηλή ταχύτητα επί 20 δευτερόλεπτα

2. Μείγμα φυκών/TetraFin® (ή ισοδύναμο): αναμίξτε 12 g δισκίων φυκών σπιρουλίνας και 500 ml διηθημένου νερού σε αναμικτήρα σε υψηλή ταχύτητα επί 40 δευτερόλεπτα, αναμίξτε 12 g Tetrafin® (ή ισοδύναμο) με 500 ml διηθημένου νερού και, στη συνέχεια, συνδυάστε τα για να παρασκευάσετε 1 l φυκών σπιρουλίνας 12 g/l και Tetrafin® (ή ισοδύναμο) 12 g/l

3. Συνδυάστε ίσους όγκους της αναμεμειγμένης αρχικής τροφής πέστροφας και του μείγματος φυκών/TetraFin® (ή ισοδύναμο)

Β. Γαρίδες της άλμης:

15 ml αυγών γαρίδας της άλμης εκκολάπτονται σε 1 l αλατισμένου νερού (παρασκευάζεται με προσθήκη 20 ml NaCl σε 1 l απιονισμένου νερού). Μετά από αερισμό επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερό φωτισμό, οι γαρίδες συλλέγονται. Οι γαρίδες αφήνονται να κατακαθίσουν επί 30 λεπτά με διακοπή του αερισμού. Οι κύστεις που επιπλέουν στην επιφάνεια του δοχείου αποχύνονται και απορρίπτονται, και οι γαρίδες διηθούνται από κατάλληλα φίλτρα και φέρονται στα 30 ml με διηθημένο νερό.

Πρωτόκολλο σίτισης

Στον πίνακα 1 παρέχονται στοιχεία αναφοράς όσον αφορά τον τύπο και την ποσότητα της τροφής που χρησιμοποιείται στα στάδια έκθεσης των προνυμφών. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται τρεις φορές ημερησίως από Δευτέρα έως Παρασκευή και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα.

Πίνακας 1

Πρόγραμμα σίτισης για τις προνύμφες *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής

Χρόνος (*) (μετά τη γονιμοποίηση)	Αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin®(ή ισοδύναμο)		Γαρίδες της άλμης	
	Καθημερινές (τρεις φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)	Καθημερινές (δύο φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)
Ημέρες 4-14 (τις εβδομάδες 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (από την ημέρα 8 έως την ημέρα 15) 1 ml (από την ημέρα 16)	0,5 ml (από την ημέρα 8 έως την ημέρα 15) 1 ml (από την ημέρα 16)
Εβδομάδα 2	0,67 ml	2,4 ml		
Εβδομάδα 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Χρόνος (*) (μετά τη γονιμοποίηση)	Αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin®(ή ισοδύναμο)		Γαρίδες της άλμης	
	Καθημερινές (τρεις φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)	Καθημερινές (δύο φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)
Εβδομάδα 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδες 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Η ημέρα 0 ορίζεται ως η ημέρα που πραγματοποιείται η έγχυση hCG.

Μετάβαση από το σιτηρέσιο προνυμφών στο σιτηρέσιο νεαρών ατόμων

Καθώς οι προνύμφες ολοκληρώνουν τη μεταμόρφωση, μεταβαίνουν σε παρασκεύασμα σιτηρεσίου νεαρών ατόμων, το οποίο επεξηγείται παρακάτω. Στη διάρκεια της μετάβασης αυτής, το σιτηρέσιο προνυμφών θα πρέπει να μειώνεται καθώς αυξάνεται η τροφή για νεαρά άτομα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω αναλογικής μείωσης της τροφής προνυμφών με ταυτόχρονη αναλογική αύξηση της τροφής για τα νεαρά άτομα καθώς κάθε ομάδα πέντε γυρίνων περνά το στάδιο 62 κατά NF και πλησιάζει την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης στο στάδιο 66 κατά NF.

Σίτιση των νεαρών ατόμων

Σιτηρέσιο νεαρών ατόμων

Αφού ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση (στάδιο 66), το πρόγραμμα σίτισης αλλάζει και πλέον χορηγείται αποκλειστικά υψηλής ποιότητας βυθιζόμενη τροφή βατράχων 3/32 ιντσών (Xenopus Express™, FL, ΗΠΑ) ή αντίστοιχη.

Παρασκεύασμα συνθλιμμένων κόκκων για τη μετάβαση από τις προνύμφες στα νεαρά άτομα

Οι κόκκοι βυθιζόμενης τροφής βατράχων αλέθονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε συσκευή άλεσης καφέ, αναμικτήρα ή γουδί προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος των κόκκων κατά περίπου 1/3. Η επεξεργασία για υπερβολικά μεγάλο χρονικό διάστημα έχει ως αποτέλεσμα την κονιοποίηση του παρασκευάσματος και δεν συνιστάται.

Πρωτόκολλο σίτισης

Στον **πίνακα 2** παρέχονται στοιχεία αναφοράς όσον αφορά τον τύπο και την ποσότητα της τροφής που χρησιμοποιείται στα στάδια των νεαρών ατόμων και της ενήλικης ζωής. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται μία φορά ημερησίως. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι καθώς τα ζώα μεταμορφώνονται, εξακολουθούν να λαμβάνουν μέρος του σιτηρεσίου γαρίδων της άλμης μέχρις ότου το 95 % εξ αυτών ολοκληρώσει τη μεταμόρφωση.

Τα ζώα δεν θα πρέπει να σιτίζονται την ημέρα της λήξης της δοκιμής, προκειμένου να αποφευχθεί η πρόκληση σύγχυσης στις μετρήσεις του βάρους λόγω της τροφής.

Πίνακας 2

Πρόγραμμα σίτισης για τα νεαρά άτομα *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα ζώα που δεν έχουν μεταμορφωθεί, περιλαμβανομένων των ζώων των οποίων η μεταμόρφωση έχει καθυστερήσει λόγω της αγωγής με την υπό δοκιμή ουσία, δεν μπορούν να καταναλώσουν μη αλεσμένους κόκκους.

Χρόνος (*) (Εβδομάδες μετά τη διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης)	Αλεσμένοι κόκκοι (mg ανά νεαρό άτομο)	Ολόκληροι κόκκοι (mg ανά νεαρό άτομο)
Καθώς τα ζώα ολοκληρώνουν τη μεταμόρφωση	25	0
Εβδομάδες 0-1	25	28
Εβδομάδες 2-3	0	110
Εβδομάδες 4-5	0	165
Εβδομάδες 6-9	0	220

(*) Η πρώτη ημέρα της εβδομάδας 0 είναι η διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης στα ζώα μάρτυρες.

Προσάρτημα 5

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΦΥΛΟΥ

Η μέθοδος προσδιορισμού του γενετικού φύλου για το *Xenopus laevis* βασίζεται στην εργασία των Yoshimoto *et al.*, 2008. Οι αναλυτικές διαδικασίες για τη γονοτύπηση παρατίθενται στην εργασία αυτή, αν χρειαστεί. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι (π.χ. qPCR υψηλής απόδοσης), εφόσον θεωρούνται κατάλληλες.

Εκκινητές X. laevis

Δείκτης DM-W

Πρόσθιος: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Αντίστροφος: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Θετικός μάρτυρας

Πρόσθιος: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Αντίστροφος: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Καθαρισμός DNA

Καθαρίστε το DNA από ιστούς μυών ή δέρματος χρησιμοποιώντας π.χ. το DNeasy Blood and Tissue Kit της Qiagen (αριθ. κατ. 69 506) ή παρόμοιο προϊόν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ. Το DNA μπορεί να εκλούεται από τις στήλες με μικρότερη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να προκύπτουν δείγματα υψηλότερης συγκέντρωσης, εφόσον θεωρείται απαραίτητο για την PCR. Επισημαίνεται ότι το DNA είναι αρκετά σταθερό και, ως εκ τούτου, χρειάζεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση που θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα εσφαλμένο χαρακτηρισμό αρσενικών ως θηλυκών ή το αντίστροφο.

PCR

Ένα παράδειγμα πρωτοκόλλου με χρήση της JumpStart™ *Taq* της Sigma περιγράφεται συνοπτικά στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1

Παράδειγμα πρωτοκόλλου με χρήση της JumpStart™ *Taq* της Sigma

Κύριο μείγμα	1x (μl)	[Τελικό]
NFW (*)	11	—
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	2,0	—
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10mM το καθένα)	0,4	200 μM
Πρόσθιος εκκινητής δείκτη (8 μM)	0,8	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής δείκτη (8 μM)	0,8	0,3 μM
Πρόσθιος εκκινητής μάρτυρα (8 μM)	0,8	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής μάρτυρα (8 μM)	0,8	0,3 μM

Κύριο μείγμα	1x (μl)	[Τελικό]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 μονάδες/μl
Μήτρα DNA	1,0	~200 pg/μl

(*) Νερό ελεύθερο νουκλεασώνΣημείωση: Κατά την παρασκευή των κύριων μειγμάτων, παρασκευάζετε επιπλέον ποσότητες για την περίπτωση τυχόν απώλειας κατά το πιπετάρισμα (παράδειγμα: το 25x θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για 24 αντιδράσεις).

Αντίδραση:

Κύριο μείγμα	19,0 μl
Μήτρα	1,0 μl
Σύνολο	20,0 μl

Χαρακτηριστικά θερμικού κυκλοποιητή (Thermocycler):

Στάδιο 1.	94°C	1 λεπτό
Στάδιο 2.	94°C	30 δευτερόλεπτα
Στάδιο 3.	60°C	30 δευτερόλεπτα
Στάδιο 4.	72°C	1 λεπτό
Στάδιο 5.	Μετάβαση στο στάδιο 2.	35 κύκλοι
Στάδιο 6.	72°C	1 λεπτό
Στάδιο 7.	4°C	αναμονή

Τα προϊόντα PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε γέλη ή να φυλαχθούν στους 4°C.

Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (3 %) (παράδειγμα πρωτοκόλλου)

50X TAE

Tris	24,2 g
Παγόμορφο οξικό οξύ	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Προσθέστε νερό μέχρι τα 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Αγαρόζη 3:1

3 μέρη αγαρόζης NuSieve™ GTG™

1 μέρος αγαρόζης Fisher χαμηλής ηλεκτροενδόσμωσης (EEO)

Μέθοδος

1. Παρασκευάστε γέλη 3 % προσθέτοντας 1,2 g μείγματος αγαρόζης σε 43 ml TAE 1X. Αναδεύστε με κυκλικές κινήσεις για να αποκολληθούν τα μεγάλα συσσωματώματα.

2. Θερμάνετε το μείγμα αγαρόζης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως (αποφύγετε την υπερχείλιση). Αφήστε να κρυώσει ελαφρώς.

3. Προσθέστε 1,0 μL βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Αναδεύστε τη φιάλη. Επισημαίνεται ότι το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μεταλλαξιγόνο και, ως εκ τούτου, στο στάδιο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές χημικές ουσίες εφόσον αυτό είναι τεχνικά εφικτό, ούτως ώστε να ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι για την υγεία των εργαζομένων ([1]).

4. Χύστε τη γέλη σε καλούπι με κτένι. Αφήστε να κρυώσει εντελώς.

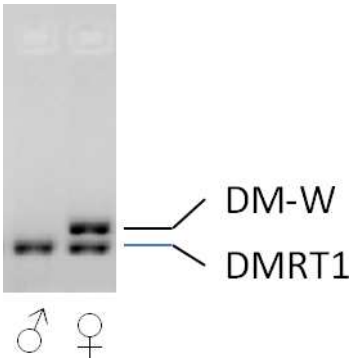
5. Προσθέστε τη γέλη στη συσκευή. Καλύψτε τη γέλη με TAE 1X.

6. Προσθέστε 1 μl χρωστικής φόρτωσης 6x σε κάθε προϊόν PCR 10 μl.

7. Μεταγγίστε τα δείγματα στις κοιλότητες με πιπέτα.

8. Ηλεκτροφορήστε στα 160 V σταθερής τάσης επί ~20 λεπτά.

Στο **σχήμα 1** φαίνεται εικόνα γέλης αγαρόζης με ενδεικτικές ζώνες για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα.



Σχήμα 1: Εικόνα γέλης αγαρόζης με τις ζώνες που υποδεικνύουν αρσενικό άτομο (♂) (μία ζώνη ~203 bp: DMRT1) και θηλυκό άτομο (♀) (δύο ζώνες στα ~259 bp: DM-W και στα 203 bp: DMRT1).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

([1]) Σύμφωνα με το άρθρο 4 παράγραφος 1 της οδηγίας 2004/37/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, σχετικά με την προστασία των εργαζομένων από τους κινδύνους που συνδέονται με την έκθεση σε καρκινογόνους ή μεταλλαξιογόνους παράγοντες κατά την εργασία (έκτη ειδική οδηγία κατά την έννοια του άρθρου 16 παράγραφος 1 της οδηγίας 89/391/ΕΟΚ του Συμβουλίου) (ΕΕ L 158 της 30.4.2004, σ. 50).

Προσάρτημα 6

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΚΙΘΟΓΕΝΙΝΗΣ

Η μέτρηση της λεκιθογενίνης (VTG) πραγματοποιείται με χρήση μεθόδου ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) που αναπτύχθηκε αρχικά για τη VTG του χοντροκέφαλου φοξίνου (Parks *et al.*, 1999). Δεν υπάρχουν στο εμπόριο αντισώματα για τον *X. laevis* προς το παρόν. Ωστόσο, δεδομένης της πληθώρας των πληροφοριών για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη και της διαθεσιμότητας οικονομικά αποδοτικών εμπορικών υπηρεσιών παραγωγής αντισωμάτων, θεωρείται εύλογα ότι τα εργαστήρια θα μπορούν εύκολα να αναπτύξουν μια μέθοδο ELISA για τη μέτρηση αυτή (Olmstead *et al.*, 2009). Επίσης, οι Olmstead *et al.* (2009) παρέχουν μια περιγραφή της δοκιμασίας, όπως τροποποιήθηκε για τη VTG στον *X. tropicalis*, όπως φαίνεται παρακάτω. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που παρήχθη ενάντια στη VTG του *X. tropicalis*, αλλά το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύει και τη VTG του *X. laevis*. Σημειώνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη ανταγωνιστικές μέθοδοι ELISA, και ότι αυτές ίσως έχουν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης απ' ό,τι η μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω.

Υλικά και αντιδραστήρια

— Ορός προ-προσροφημένου 1ου αντισώματος (Ab)

— Αναμίξτε 1 μέρος ορού 1ου Ab αντι-VTG *X. tropicalis* με 2 μέρη πλάσματος αρσενικού μάρτυρα και αφήστε σε θερμοκρασία δωματίου επί ~ 75 λεπτά, τοποθετήστε σε πάγο επί 30 λεπτά, φυγοκεντρήστε > 20K x g επί 1 ώρα στους 4°C, αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό, χωρίστε σε μερίδες και φυλάξτε στους -20°C.

— 2ο αντίσωμα

— συζευγμένο αντίσωμα αιγός έναντι πρωτεϊνών κουνελιού IgG-HRP (π.χ. Bio-Rad 172-1019)

— Πρότυπο VTG

— κεκαθαρμένη VTG *X. laevis* στα 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη) (π.χ. KPL 50-76-00 ή Sigma T0440)

— Κανονικός ορός αιγός (NGS)(π.χ. Chemicon® S26-100 ml)

— Τρυβλία μικροτιτλοδότησης EIA 96 κοιλοτήτων από πολυστυρόλιο (π.χ. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— Κλίβανος υβριδοποίησης 37°C (ή επωαστήρας αέρα ταχείας εξισορρόπησης) για τρυβλία, υδατόλουτρο για σωληνάρια

— Άλλος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, χημικές ουσίες και υλικά.

Συνταγές

Ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
νερό	428 ml

10X PBS (0,1 M φωσφορικού άλατος, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
νερό	810 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (PBST):

10X PBS	100 ml
νερό	900 ml

Ρυθμίστε το pH σε 7,3 με HCl 1 M και κατόπιν προσθέστε 0,5 ml Tween-20

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας:

Κανονικός ορός αιγός (NGS)	3,75 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	146,25 ml

Συλλογή δειγμάτων

Το αίμα συλλέγεται με ηπαρινισμένο σωληνάριο μικροαιματοκρίτη και τοποθετείται σε πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση επί 3 λεπτά, το σωληνάριο βαθμολογείται, ανοίγεται και το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 0,6 ml που περιέχουν 0,13 μονάδες λυοφιλιωμένης απροτινίνης. (Τα σωληνάρια αυτά προετοιμάζονται εκ των προτέρων, με προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας απροτινίνης, κατάψυξη και λυοφιλίωση σε speed-vac σε χαμηλή θερμότητα μέχρι να ξηρανθούν). Φυλάσσετε το πλάσμα στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

Διαδικασία για ένα τρυβλίο

Επικάλυψη του τρυβλίου

Αναμίξτε 20 μl κεκαθαρμένης VTG με 22 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών (τελικό 3 μg/ml). Προσθέστε 200 μl σε κάθε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Καλύψτε το τρυβλίο με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί στους 37°C επί 2 ώρες (ή στους 4°C όλη τη νύχτα).

Παρεμπόδιση του τρυβλίου

Παρασκευάζεται παρεμποδιστικό διάλυμα με προσθήκη 2 ml κανονικού ορού αιγός (NGS) σε 38 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών. Αφαιρέστε το διάλυμα επικάλυψης και τινάξτε το τρυβλίο για να στεγνώσει. Προσθέστε 350 μl του παρεμποδιστικού διαλύματος σε κάθε κοιλότητα. Καλύψτε με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί στους 37°C επί 2 ώρες (ή στους 4°C όλη τη νύχτα).

Παρασκευή των προτύπων

5,8 μl κεκαθαρμένου προτύπου VTG αναμιγνύονται με 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε αναλώσιμο σωληνάριο δοκιμής 12 x 75 mm από βοριοπυριτικό γυαλί. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκύπτουν 12 760 ng/ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διαδοχική αραίωση με προσθήκη 750 μl της προηγούμενης αραίωσης σε 750 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100, και 50 ng/ml.

Παρασκευή των δειγμάτων

Ξεκινήστε με αραίωση πλάσματος 1:300 (συνδυάζοντας π.χ. 1 μl πλάσματος με 299 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας) ή 1:30 σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας. Εάν αναμένεται μεγάλη ποσότητα VTG, μπορεί να χρειαστούν πρόσθετες ή μεγαλύτερες αραιώσεις. Προσπαθήστε να διατηρήσετε το B/B_o εντός της περιοχής των προτύπων. Για δείγματα χωρίς υπολογίσιμη VTG, π.χ. αρσενικά και θηλυκά μάρτυρες (τα οποία είναι όλα ανώριμα), χρησιμοποιήστε την αραίωση 1:30. Δείγματα που αραιώνονται σε αναλογίες μικρότερες από αυτή μπορεί να εμφανίσουν ανεπιθύμητα φαινόμενα μήτρας.

Επιπλέον, συνιστάται να χρησιμοποιείτε ένα δείγμα θετικού μάρτυρα σε κάθε τρυβλίο. Το δείγμα αυτό προέρχεται από δεξαμενή πλάσματος που περιέχει υψηλά επίπεδα VTG από επαγωγή. Η δεξαμενή αραιώνεται αρχικά σε NGS, διαιρείται σε μερίδες και φυλάσσεται στους -80°C. Για κάθε τρυβλίο, μία μερίδα αποψύχεται, αραιώνεται περαιτέρω σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας και χρησιμοποιείται κατά τον ίδιο τρόπο με το δείγμα δοκιμής.

Επώαση με το 1ο αντίσωμα

Το 1ο Ab παρασκευάζεται μέσω αραίωσης ορού προ-προσροφημένου 1ου Ab 1:2000 σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας (π.χ. 8 μl σε 16 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας). Συνδυάστε 300 μl διαλύματος 1ου Ab με 300 μl δείγματος/προτύπου σε γυάλινο σωληνάριο. Το σωληνάριο B_o ετοιμάζεται με παρόμοιο τρόπο με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και 300 μl αντισώματος. Επίσης, θα πρέπει να ετοιμαστεί σωληνάριο NSB με χρήση 600 μl μόνο ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, δηλ. χωρίς Ab. Καλύψτε τα σωληνάρια με Parafilm και περιδινήστε ήπια για να αναμιχθούν. Επωάστε σε υδατόλουτρο στους 37°C επί 1 ώρα.

Έκπλυση του τρυβλίου

Ακριβώς πριν ολοκληρωθεί η επώαση του 1ου Ab, εκπλύνετε το τρυβλίο. Αυτό γίνεται τινάζοντας το τρυβλίο για να φύγει το περιεχόμενο και ταμπονάροντας ελαφρά με απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσει. Στη συνέχεια, γεμίστε τις κοιλότητες με 350 μl διαλύματος έκπλυσης, αδειάστε και ταμπονάρετε ελαφρά. Σε αυτό το στάδιο είναι χρήσιμη μια πολυκάναλη πιπέτα ή συσκευή έκπλυσης τρυβλίων. Το στάδιο της έκπλυσης επαναλαμβάνεται δύο φορές ώστε να γίνουν συνολικά τρεις εκπλύσεις.

Φόρτωση του τρυβλίου

Μετά την έκπλυση του τρυβλίου, αφαιρέστε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο και περιδινήστε ελαφρά. Προσθέστε 200 μl από κάθε σωληνάριο δείγματος, προτύπου, B_o και NSB σε διπλές κοιλότητες του τρυβλίου. Καλύψτε το τρυβλίο με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί επί 1 ώρα στους 37°C.

Επώαση με το 2ο αντίσωμα

Μετά το τέλος της επώασης του προηγούμενου σταδίου, το τρυβλίο θα πρέπει να εκπλυθεί εκ νέου τρεις φορές, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το αραιωμένο 2ο Ab παρασκευάζεται με ανάμιξη 2,5 μl του 2ου Ab με 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας. Προσθέστε 200 μl αραιωμένου 2ου Ab σε κάθε κοιλότητα, καλύψτε με αυτοκόλλητο όπως παραπάνω, και επωάστε επί 1 ώρα στους 37°C.

Προσθήκη υποστρώματος

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση με το 2ο Ab, εκπλύνετε το τρυβλίο τρεις φορές όπως περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια, προσθέστε 100 μl υποστρώματος TMB σε κάθε κοιλότητα. Αφήστε την αντίδραση να εξελιχθεί επί 10 λεπτά, κατά προτίμηση μακριά από έντονο φως. Διακόψτε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl φωσφορικού οξέος 1 M. Το χρώμα θα αλλάξει από μπλε σε έντονο κίτρινο. Μετρήστε την απορρόφηση στα 450 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων.

Υπολογισμός του B/Bo

Αφαιρέστε τη μέση τιμή NSB από όλες τις μετρήσεις. Το B/B_o για κάθε δείγμα και πρότυπο υπολογίζεται με διαίρεση της τιμής απορρόφησης (B) διά της μέσης απορρόφησης του δείγματος B_o.

Χάραξη πρότυπης καμπύλης και προσδιορισμός άγνωστων ποσοτήτων

Χαράξτε μια πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια λογισμικού σχεδίασης γραφικών παραστάσεων (π.χ. Slidewrite™ ή Sigma Plot®) η οποία θα υπολογίζει μέσω παρεκβολής την ποσότητα από το B/B_o δείγματος με βάση το B/B_o των προτύπων. Συνήθως η ποσότητα χαράσσεται σε λογαριθμική κλίμακα και η καμπύλη έχει σιγμοειδές σχήμα. Ωστόσο, μπορεί να φαίνεται γραμμική όταν χρησιμοποιείται μικρό εύρος προτύπων. Διορθώστε τις ποσότητες δειγμάτων ως προς τον συντελεστή αραίωσης και αναφέρατε την ποσότητα σε mg VTG/ml πλάσματος.

Προσδιορισμός των ελάχιστων ορίων ανίχνευσης (MDL)

Συχνά, ιδίως στα φυσιολογικά αρσενικά, δεν θα είναι σαφής ο τρόπος αναφοράς των αποτελεσμάτων από χαμηλές τιμές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα όρια εμπιστοσύνης 95 % προκειμένου να προσδιοριστεί εάν μια τιμή θα πρέπει να αναφερθεί ως μηδενική ή ως κάποιος άλλος αριθμός. Εάν το αποτέλεσμα του δείγματος βρίσκεται εντός της περιοχής του διαστήματος εμπιστοσύνης του μηδενικού προτύπου (B_o), το αποτέλεσμα θα πρέπει να αναφέρεται ως μηδενικό. Το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης θα είναι το χαμηλότερο πρότυπο που είναι σταθερά διαφορετικό από το μηδενικό πρότυπο· με άλλα λόγια, τα δύο διαστήματα εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται. Για οποιοδήποτε αποτέλεσμα δείγματος που βρίσκεται εντός των ορίων εμπιστοσύνης του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης, ή πάνω από αυτό, θα αναφέρεται η υπολογισθείσα τιμή. Εάν ένα δείγμα βρίσκεται μεταξύ των διαστημάτων εμπιστοσύνης του μηδενικού προτύπου και του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης, ως τιμή για το εν λόγω δείγμα θα πρέπει να δίνεται το ήμισυ του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

Προσάρτημα 7

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Από τη LAGDA προκύπτουν τρεις τύποι δεδομένων προς στατιστική ανάλυση: 1) ποσοτικά συνεχή δεδομένα, 2) δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν για τους ρυθμούς ανάπτυξης (χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF) και 3) διατάξιμα δεδομένα υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων από ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις. Στον πίνακα 1 φαίνεται το συνιστώμενο διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης για τη LAGDA. Επίσης, στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένες σημειώσεις που μπορεί να είναι χρήσιμες για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων της LAGDA. Όσον αφορά το διάγραμμα αποφάσεων ανάλυσης, τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τη θνησιμότητα, τη σωματική αύξηση (βάρος και μήκος) και τον ηπατοσωματικό δείκτη (LSI) θα πρέπει να αναλύονται σύμφωνα με το σκέλος «Άλλες παράμετροι».

Συνεχή δεδομένα

Τα δεδομένα για συνεχείς παραμέτρους θα πρέπει πρώτα να ελέγχονται ως προς τη μονοτονικότητα μέσω μετασχηματισμού των δεδομένων κατά βαθμίδα, την προσαρμογή σε μοντέλο ANOVA και τη σύγκριση γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων. Εάν τα δεδομένα είναι μονοτονικά, θα πρέπει να εφαρμόζεται έλεγχος τάσεων Jonckheere-Terpstra αποκλιμάκωσης στις διάμεσες τιμές των πανομοιότυπων δειγμάτων, και δεν θα πρέπει να διενεργούνται επακόλουθες αναλύσεις. Μια εναλλακτική μέθοδος για δεδομένα που εμφανίζουν κανονική κατανομή με ομοιογενείς διασπορές είναι ο έλεγχος Williams αποκλιμάκωσης. Εάν τα δεδομένα δεν είναι μονοτονικά (η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική δεν είναι), θα πρέπει να αναλύονται με χρήση μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων. Στη συνέχεια, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα (κατά προτίμηση με χρήση του ελέγχου Shapiro-Wilk ή Anderson-Darling) και την ομοιογένεια της διασποράς (κατά προτίμηση με χρήση του ελέγχου Levene). Και οι δύο έλεγχοι εκτελούνται επί των καταλοίπων του μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων. Η γνώμη ενός ειδικού μπορεί να αντικαταστήσει αυτούς τους τυπικούς ελέγχους όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς, ωστόσο προτιμάται η διεξαγωγή τυπικών ελέγχων. Εάν τα δεδομένα εμφανίζουν κανονική κατανομή με ομοιογενή διασπορά, τότε οι παραδοχές του μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων επαληθεύονται και μια σημαντική επίδραση της αγωγής προσδιορίζεται με τον έλεγχο Dunnett. Σε περίπτωση μη κανονικότητας ή έλλειψης ομοιογένειας της διασποράς, οι παραδοχές του ελέγχου Dunnett παραβιάζονται και θα πρέπει να αναζητείται μετασχηματισμός κανονικοποίησης και σταθεροποίησης της διασποράς. Εάν δεν βρεθεί παρόμοιος μετασχηματισμός, τότε μια σημαντική επίδραση αγωγής προσδιορίζεται με έλεγχο Dunn. Όποτε είναι εφικτό, θα πρέπει να διενεργείται μονόπλευρος αντί για αμφίπλευρο έλεγχο, ωστόσο χρειάζεται κρίση ειδικού για να προσδιοριστεί ποιος από τους δύο τύπους ελέγχου είναι ο κατάλληλος για μια δεδομένη παράμετρο.

Θνησιμότητα

Τα δεδομένα θνησιμότητας θα πρέπει να αναλύονται για τη χρονική περίοδο που καλύπτει ολόκληρη τη δοκιμή, και θα πρέπει να εκφράζονται ως αναλογία ζώων που πέθαναν σε μια συγκεκριμένη δεξαμενή. Οι γυρίνοι που δεν ολοκληρώνουν το στάδιο της μεταμόρφωσης εντός του καθορισμένου χρονικού πλαισίου, οι γυρίνοι που ανήκουν στην κοόρτη υποδείγματος προνυμφών, οι νεαροί βάτραχοι που θανατώνονται επιλεκτικά και τα ζώα που τυχόν πεθαίνουν λόγω σφάλματος του πειραματιστή θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως λογοκριμένα δεδομένα και να μην περιλαμβάνονται στον παρονομαστή του υπολογισμού ποσοστών. Πριν από τη διενέργεια στατιστικών αναλύσεων, για τις αναλογίες θνησιμότητας θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας τόξου ημιτόνου. Μια εναλλακτική λύση είναι η χρήση του ελέγχου Cochran-Armitage αποκλιμάκωσης, πιθανώς με προσαρμογή Rao-Scott εάν υπάρχει υπερδιασπορά.

Βάρος και μήκος (δεδομένα σωματικής αύξησης)

Τα αρσενικά και τα θηλυκά δεν είναι σεξουαλικώς διμορφικά κατά τη μεταμόρφωση και, κατά συνέπεια, τα δεδομένα σωματικής αύξησης του υποδείγματος προνυμφών θα πρέπει να αναλύονται ανεξάρτητα από το φύλο. Τα δεδομένα σωματικής αύξησης των νεαρών ατόμων, αντιθέτως, θα πρέπει να αναλύονται χωριστά με βάση το γενετικό φύλο. Για τις παραμέτρους αυτές μπορεί να χρειάζεται λογαριθμική προσαρμογή, δεδομένου ότι η λογαριθμική κανονικότητα των δεδομένων μεγέθους δεν είναι ασυνήθης.

Ηπατοσωματικός δείκτης (LSI)

Τα βάρη ήπατος θα πρέπει να κανονικοποιούνται ως αναλογία έναντι του βάρους ολόκληρου του σώματος (LSI) και να αναλύονται χωριστά με βάση το γενετικό φύλο.

Χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF

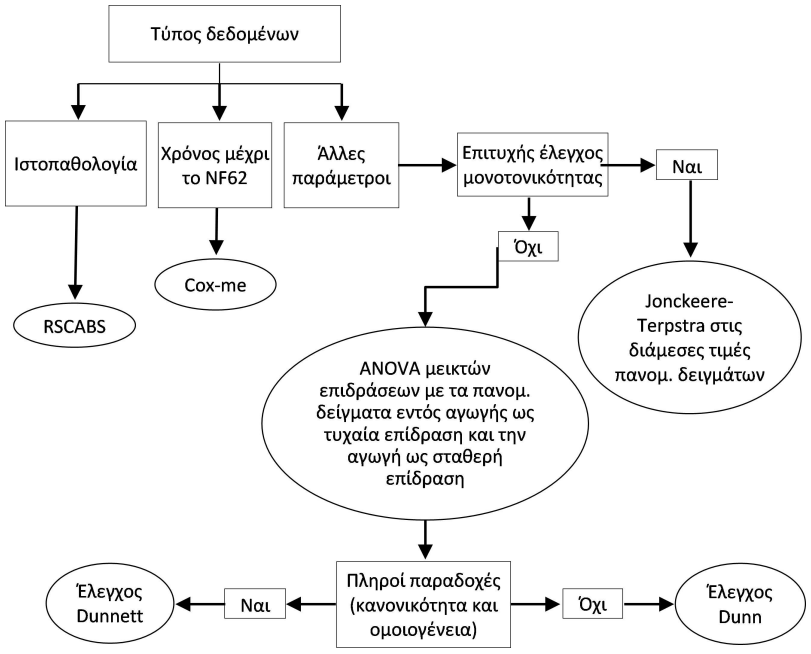
Τα δεδομένα για τον χρόνο μέχρι τη μεταμόρφωση θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα χρόνου έως το συμβάν, με τυχόν θανάτους ή άτομα που δεν φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF μέσα σε 70 ημέρες να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα λογοκριμένα εκ δεξιών (δηλ. η πραγματική τιμή είναι μεγαλύτερη από 70 ημέρες αλλά η μελέτη σταματά προτού τα ζώα φθάσουν στο στάδιο 62 κατά NF σε 70 ημέρες). Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης σταδίου 62 κατά NF στους μάρτυρες νερού αραίωσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ημερομηνίας λήξης της δοκιμής. Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης μπορεί να προσδιορίζεται με εκτιμητές γινομένου-ορίου Kaplan-Meier. Η παράμετρος αυτή θα πρέπει να αναλύεται με χρήση μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox μεικτών επιδράσεων το οποίο λαμβάνει υπόψη τη δομή πανομοιότυπων δειγμάτων της μελέτης.

Δεδομένα ιστοπαθολογίας (βαθμολογίες σοβαρότητας και αναπτυξιακά στάδια)

Τα δεδομένα ιστοπαθολογίας έχουν μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων. Ένας έλεγχος που καλείται RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) χρησιμοποιεί έλεγχο τάσεων Cochran-Armitage προσαρμοσμένο στον έλεγχο Rao-Scott αποκλιμάκωσης σε κάθε επίπεδο σοβαρότητας μιας ιστοπαθολογικής απόκρισης (Green *et al.*, 2014). Με την προσαρμογή Rao-Scott ενσωματώνεται στον έλεγχο ο πειραματικός σχεδιασμός δοχείων πανομοιότυπων δειγμάτων. Η διαδικασία «κατά τομές» (by slices) συνεκτιμά τη βιολογική προσδοκία ότι η σοβαρότητα της επίδρασης τείνει να αυξάνεται όσο αυξάνονται οι δόσεις ή οι συγκεντρώσεις, ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται οι βαθμολογίες των επιμέρους ατόμων και αποτυπώνεται η σοβαρότητα τυχόν διαπιστωθείσας επίδρασης. Η διαδικασία RSCABS προσδιορίζει όχι μόνο τις αγωγές που είναι στατιστικά διαφορετικές από τους μάρτυρες (δηλαδή εμφανίζουν σοβαρότερες παθολογικές καταστάσεις απ' ό,τι οι μάρτυρες), αλλά και τη βαθμολογία σοβαρότητας στην οποία έγκειται η διαφορά, παρέχοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες για την ανάλυση. Κατά τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού σταδίου των γονάδων και των γεννητικών πόρων, θα πρέπει να εφαρμόζεται πρόσθετος χειρισμός των δεδομένων, καθώς μία παραδοχή της διαδικασίας RSCABS είναι ότι η σοβαρότητα της επίδρασης αυξάνεται με τη δόση. Η παρατηρούμενη επίδραση μπορεί να είναι μια καθυστέρηση ή επιτάχυνση της ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, τα δεδομένα αναπτυξιακών σταδίων θα πρέπει να αναλύονται όπως έχουν αναφερθεί, ώστε να προσδιορίζεται η επιτάχυνση της ανάπτυξης, και στη συνέχεια να αντιστρέφονται με μη αυτόματο τρόπο πριν από τη διεξαγωγή δεύτερης ανάλυσης για τον προσδιορισμό τυχόν καθυστέρησης της ανάπτυξης.

Σχήμα 1

Διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης για τα δεδομένα LAGDA



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

Προσάρτημα 8

ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΚΟΛΙΩΣΗΣ

Η ιδιοπαθής σκολίωση, η οποία εκδηλώνεται συνήθως ως κύρτωμα της ουράς στους γυρίνους *Xenopus laevis*, μπορεί να περιπλέξει τις μορφολογικές και συμπεριφορικές παρατηρήσεις επί των πληθυσμών της δοκιμής. Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες για την ελαχιστοποίηση της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης, τόσο στο απόθεμα όσο και υπό συνθήκες δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή, συνιστάται ο επιπολασμός της μέτριας και της σοβαρής σκολίωσης να μην υπερβαίνει το 10 %, ώστε να βελτιωθεί η εμπιστοσύνη στην ικανότητα της δοκιμής να ανιχνεύει αναπτυξιακές επιδράσεις που σχετίζονται με την αγωγή σε κατά τα άλλα υγιείς προνύμφες αμφίβιων.

Στο πλαίσιο καθημερινών παρατηρήσεων στη διάρκεια της οριστικής δοκιμής θα πρέπει να καταγράφεται τόσο η συχνότητα εμφάνισης (μέτρηση ατόμων) όσο και η σοβαρότητα της σκολίωσης, όταν υπάρχει. Η φύση της ανωμαλίας θα πρέπει να περιγράφεται ως προς τη θέση (π.χ. μπροστά ή πίσω από την αμάρα) και ως προς την κατεύθυνση της κυρτότητας (π.χ. πλευρική ή ραχιαία/κοιλιακή). Η σοβαρότητα μπορεί να βαθμολογηθεί ως εξής:

(NR) Μη αξιοσημείωτη: δεν υπάρχει κυρτότητα

(1) Ελάχιστη: ελαφριά, πλευρική κυρτότητα πίσω από την αμάρα· εμφανής μόνο κατά την ηρεμία

(2) Μέτρια: πλευρική κυρτότητα πίσω από την αμάρα· διαρκώς ορατή αλλά δεν εμποδίζει την κίνηση

(3) Σοβαρή: πλευρική κυρτότητα μπροστά από την αμάρα Η οποιαδήποτε κυρτότητα που εμποδίζει την κίνηση Η οποιαδήποτε ραχιαία/κοιλιακή κυρτότητα

Μια επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή FIFRA της EPA των ΗΠΑ (FIFRA SAP 2013) μελέτησε συνοπτικά δεδομένα για τη σκολίωση σε δεκαπέντε δοκιμασίες μεταμόρφωσης αμφίβιων με τον *X. laevis* (στάδιο 51 έως 60+ κατά NF) και έδωσε γενικές συστάσεις για τη μείωση του επιπολασμού της ανωμαλίας αυτής στους πληθυσμούς δοκιμής. Οι συστάσεις αφορούν τη LAGDA, παρότι η συγκεκριμένη δοκιμή αφορά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάπτυξης.

Ιστορικές επιδόσεις ωοτοκίας

Γενικά, ως ζεύγη ζευγαρώματος θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ενήλικα άτομα υψηλής ποιότητας· η εξάλειψη των ζευγών αναπαραγωγής που παράγουν απογόνους με σκολίωση μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη συχνότητα εμφάνισης με την πάροδο του χρόνου. Ειδικότερα, η ελαχιστοποίηση της χρήσης αποθέματος αναπαραγωγής που έχει αιχμαλωτιστεί από τη φύση μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμο μέτρο. Η περίοδος έκθεσης της LAGDA ξεκινά με έμβρυα σταδίου 8-10 κατά NF, και δεν είναι εφικτό να προσδιοριστεί κατά την έναρξη της δοκιμής το κατά πόσον συγκεκριμένα άτομα θα αναπτύξουν σκολίωση. Ως εκ τούτου, πέραν της παρακολούθησης της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης σε ζώα που υποβάλλονται σε δοκιμή, θα πρέπει να τεκμηριώνονται και οι ιστορικές επιδόσεις εμβρύων της ίδιας μητέρας (περιλαμβανομένης της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης σε τυχόν προνύμφες που αφέθηκαν να αναπτυχθούν). Μπορεί να είναι σκόπιμη η περαιτέρω παρακολούθηση τμήματος της κάθε ομάδας εμβρύων της ίδιας μητέρας που δεν χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένη μελέτη και η αναφορά των σχετικών παρατηρήσεων (FIFRA SAP 2013).

Ποιότητα του νερού

Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η επαρκής ποιότητα του νερού, τόσο στο εργαστηριακό απόθεμα όσο και κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Πέραν των κριτηρίων ποιότητας του νερού που αξιολογούνται στο πλαίσιο της συνήθους πρακτικής αναφορικά με τις δοκιμές τοξικότητας για τους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να είναι σκόπιμη η παρακολούθηση και η διόρθωση τυχόν ελλείψεων θρεπτικών συστατικών (π.χ. έλλειψη βιταμίνης C, ασβεστίου, φωσφόρου) ή υπερβολικών επιπέδων σεληνίου και χαλκού, τα οποία έχει αναφερθεί ότι προκαλούν σκολίωση ποικίλου βαθμού στα είδη *Rana* sp. και *Xenopus* sp. που εκτρέφονται στο εργαστήριο (Marshall *et al.* 1980, Leibovitz *et al.* 1992, Martinez *et al.* 1992, όπως αναφέρεται στο FIFRA SAP 2013). Η χρήση του κατάλληλου προγράμματος σίτισης (βλ. προσάρτημα 4) και ο τακτικός καθαρισμός των δεξαμενών βελτιώνουν κατά κανόνα την ποιότητα του νερού και την υγεία των πειραματόζωων.

Σιτηρέσιο

Συγκεκριμένες συστάσεις για πρόγραμμα σίτισης, το οποίο έχει διαπιστωθεί ότι είναι επιτυχές με τη LAGDA, περιλαμβάνονται αναλυτικά στο προσάρτημα 4. Συνιστάται οι πηγές τροφής να ελέγχονται για την ύπαρξη βιολογικών τοξινών, ζιζανιοκτόνων και άλλων φυτοφαρμάκων που είναι γνωστό ότι προκαλούν σκολίωση στον *X. laevis* ή σε άλλα υδρόβια ζώα (Schlenk και Jenkins 2013). Για παράδειγμα, η έκθεση σε ορισμένους αναστολείς της χολινεστεράσης έχει συσχετιστεί με σκολίωση στα ψάρια (Schultz *et al.* 1985) και τους βατράχους (Bacchetta *et al.* 2008).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.»