II

(Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EU) 2019/1390,

annettu 31 päivänä heinäkuuta 2019,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 liitteen muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N: o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) ja erityisesti sen 13 artiklan 2 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 440/2008 ([2]) vahvistetaan asetuksen (EY) N:o 1907/2006 soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät, joilla määritellään kemikaalien fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.

(2) Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö OECD laatii yhdenmukaistettuja ja kansainvälisesti sovittuja testiohjeita kemikaalien testaamiseksi sääntelytarkoituksissa. OECD hyväksyy säännöllisesti uusia ja tarkistettuja testiohjeita, joissa otetaan huomioon alalla tapahtunut tieteen kehitys.

(3) Jotta otetaan huomioon tekniikan kehitys ja aina kun se on mahdollista vähennetään tieteellisissä tarkoituksissa käytettävien eläinten määrää asetuksen (EY) N:o 1907/2006 13 artiklan 2 kohdan mukaisesti ja koska OECD on hyväksynyt asiaa koskevat testiohjeet, olisi vahvistettava kaksi uutta testimenetelmää ekotoksisuuden arviointia varten ja yhdeksän uutta testimenetelmää, joilla määritellään myrkyllisyyttä ihmisten terveydelle; lisäksi olisi ajantasaistettava seitsemän testimenetelmää. Yksitoista näistä testimenetelmistä liittyy iho- ja silmä-ärsytystä, ihon herkistymistä, genotoksisuutta ja hormonaalisia haittavaikutuksia koskeviin in vitro -testeihin. Sidosryhmiä on kuultu ehdotetuista muutoksista.

([1]) EUVL L 396, 30.12.2016, s. 1.

([2]) Komission asetus (EY) N:o 440/2008, annettu 30 päivänä toukokuuta 2008, testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla (EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1).

(4) Sen vuoksi asetusta (EY) N:o 440/2008 olisi muutettava.

(5) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä.*

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 31 päivänä heinäkuuta 2019.

Komission puolesta
Puheenjohtaja
Jean-Claude JUNCKER

LIITE

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite seuraavasti:

1) Korvataan B osassa oleva B.4 luku seuraavasti:

"B.4 **AKUUTTI IHOÄRSYTTÄVYYS/-SYÖVYTTÄVYYS**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 404 (2015). Kemikaalien testaamiseen tarkoitettuja OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti, jotta varmistetaan, että ne vastaavat parhaita käytettävissä olevia tieteellisiä menetelmiä. OECD:n testiohjeen 404 tarkistuksessa on erityisesti pyritty ottamaan huomioon eläinten hyvinvoinnin parantamiseen liittyvät näkökohdat sekä kaikkien testikemikaalista aiemmin saatujen tietojen arviointi, jotta voidaan välttää tarpeettomia eläinkokeita. OECD:n testiohjeen 404 (hyväksytty ensimmäisen kerran vuonna 1981, tarkistettu vuosina 1992, 2002 ja 2015) päivitetty versio sisältää viittauksia ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden testausta ja arviointia koskevat yhdennetyt lähestymistavat -ohjeeseen (1), jossa esitellään modulaarinen lähestymistapa ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden testaukseen. Yhdennetyissä lähestymistavoissa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan i) ohjeita siitä, miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen (1). Lisäksi kyseisessä ohjeessa suositellaan, että tarvittaessa *in vivo* -alkutestissä eläimelle asetetaan kolme testilappua peräkkäin eikä samanaikaisesti.

2. Ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden määritelmät esitetään tämän testimenetelmän lisäyksessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Järkevien tieteellisten menettelytapojen ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi *in vivo* -testausta ei tule tehdä, ennen kuin kaikkien testikemikaalin mahdollisen ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden kannalta oleellisten tietojen painoarvo on arvioitu ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevien ohjeiden mukaisesti. Tämä koskee tämän ohjeen kolmea osaa ja niitä vastaavia moduuleja (1). Osassa 1 aiempia tietoja käsitellään seitsemässä moduulissa, jotka koskevat ihmisillä saatuja tuloksia, *in vivo* -tietoja, *in vitro* -tietoja, fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia koskevia tietoja (esimerkiksi pH-arvoa ja varsinkin voimakasta happamuutta tai emäksisyyttä) ja muita kuin testaukseen perustuvia menetelmiä. Osassa 2 tehdään painoarvoanalyysi. Jos tietojen painoarvosta ei saada varmuutta, on jatkettava osaan 3, jossa tehdään lisätestejä *in vitro* -menetelmillä, ja *in vivo* -testausta käytetään vasta viimesijaisena keinona. Tällä analyysilla pyritään siis vähentämään *in vivo* -testien tarvetta sellaisten testikemikaalien kohdalla, joiden ihoärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä aiempi tutkimus on jo tuottanut riittävästi todisteita.

IN VIVO -TESTIN PERIAATE

4. Testikemikaali annostellaan yhtenä annoksena koe-eläimen iholle; eläimen ihon käsittelemättömät alueet toimivat kontrollina. Ärsyttävyyden/syövyttävyyden aste todetaan ja pisteytetään määrävälein, ja vauriota kuvaillaan vaikutusten arvioinnin täydentämiseksi. Testin on kestettävä niin pitkään, että havaittujen vaikutusten korjautuvuus tai korjautumattomuus voidaan arvioida.

5. Eläimet, joissa havaitaan merkkejä jatkuvasta vakavasta kärsimyksestä ja/tai kivusta missä tahansa testin vaiheessa, on lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testikemikaalin arvioinnissa. Kuolevien ja kärsivien eläinten lopettamiskriteereihin sovelletaan OECD:n erillistä ohjetta (2).

IN VIVO -TESTIN VALMISTELU

Eläinlajin valinta

6. Suositeltava koe-eläinlaji on albiinokaniini. Kokeessa käytetään nuoria ja terveitä täysikasvuisia yksilöitä. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

Eläinten valmistelu

7. Noin 24 tuntia ennen testiä eläinten selkäpuolen karva ajetaan pois. Ihoa on varottava hankaamasta. Testissä voidaan käyttää vain eläimiä, joiden iho on terve ja vahingoittumaton.

8. Joillakin kaniinikannoilla esiintyy tiheitä karvalaikkuja, jotka ovat tavallista voimakkaampia tiettyinä vuodenaikoina. Tällaisia tiheäkarvaisia alueita ei pidä käyttää testikohtina.

Koe-eläintilat ja ruokinta

9. Jokaisella eläimellä on oltava oma häkki. Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava kaniineilla 20 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

TESTIMENETTELY

Testikemikaalin annostelu

10. Testikemikaali annostellaan pienelle ihoalueelle (noin 6 cm^2) ja peitetään sideharsolapulla, joka kiinnitetään ihoa ärsyttämättömällä teipillä. Jos suora annostelu ei ole mahdollinen (esimerkiksi nesteiden tai joidenkin tahnojen kohdalla), testikemikaali annostellaan ensin sideharsolapulle, joka asetetaan iholle. Lappu on pidettävä kevyessä kosketuksessa ihoon sopivan, puolitiiviin siteen avulla koko altistusjakson ajan. Jos testikemikaali annostellaan lappuun, se on kiinnitettävä ihoon siten, että aine on hyvin kosketuksessa ihoon ja leviää tasaisesti. Eläimen yltäminen lappuun ja testikemikaalin nieleminen tai hengittäminen on estettävä.

11. Nestemäisiä testikemikaaleja käytetään yleensä laimentamattomina. Testattaessa kiinteitä aineita (jotka voidaan tarvittaessa jauhaa) testikemikaali on kostutettava mahdollisimman pienellä määrällä vettä (tai tarvittaessa jollain muulla sopivalla kantaja-aineella), jotta saadaan hyvä ihokosketus. Jos käytetään muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineen mahdollisen vaikutuksen testikemikaalin aiheuttamaan ihoärsytykseen pitäisi olla olematon tai mahdollisimman vähäinen.

12. Altistusjakso kestää tavallisesti neljä tuntia, ja sen lopussa ylimääräinen testikemikaali on poistettava, jos se on käytännössä mahdollista, vedellä tai sopivalla liuottimella muuttamatta orvaskeden senhetkistä vastetta tai eheyttä.

Annostaso

13. Testikohtaan annostellaan 0,5 ml nestettä tai 0,5 g kiinteää ainetta tai tahnaa.

Alkutesti (ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden *in vivo* -testi yhdelle eläimelle)

14. Kun testikemikaali on määritetty painoarvoanalyysin tai aiemman *in vitro* -testauksen perusteella syövyttäväksi, ärsyttäväksi tai luokittelemattomaksi, muuta *in vivo* -testausta ei yleensä tarvita. Jos kuitenkin katsotaan, että kemikaalista tarvitaan lisää tietoa, *in vivo* -testi tehdään aluksi yhdellä eläimellä ja seuraavassa kuvattua lähestymistapaa noudattaen. Enintään kolme testilappua asetetaan yksi toisensa jälkeen eläimen iholle. Ensimmäinen niistä poistetaan kolmen minuutin kuluttua. Jos vakavaa ihoreaktiota ei havaita, toinen lappu asetetaan iholle eri kohtaan ja poistetaan tunnin kuluttua. Jos havainnot osoittavat tässä vaiheessa, että altistusta voidaan inhimillisesti jatkaa neljään tuntiin asti, kolmas lappu asetetaan paikoilleen ja poistetaan neljän tunnin kuluttua. Vaste pisteytetään.

15. Jos syövyttävä vaikutus havaitaan minkä tahansa kolmen peräkkäisen altistuksen aikana, testi lopetetaan heti. Jos syövyttävää vaikutusta ei havaita viimeisen lapun poistamisen jälkeen, eläintä tarkkaillaan 14 päivän ajan, mikäli syöpymistä ei kehity sitä ennen.

16. Jos testikemikaalin ei odoteta aiheuttavan syöpymistä vaan ärsytystä, eläimelle asetetaan yksi lappu neljän tunnin ajaksi.

Vahvistustesti (ihoärsyttävyyden *in vivo* -testi useille eläimille)

17. Jos alkutestissä ei havaita syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä kaksi eläintä. Kummallekin asetetaan lappu neljän tunnin altistusjakson ajaksi. Jos ärsyttävä vaikutus havaitaan alkutestissä, vahvistustesti voidaan tehdä peräkkäistestinä tai altistamalla kaksi lisäeläintä yhtäaikaisesti. Jos alkutestiä ei poikkeuksellisesti tehdä, kahdelle tai kolmelle eläimelle voidaan asettaa yksi lappu, joka poistetaan neljän tunnin kuluttua. Kun käytetään kahta eläintä, lisätestiä ei tarvita, jos molemmille kehittyy sama vaste. Muussa tapauksessa testataan myös kolmas eläin. Epäselvät vasteet täytyy mahdollisesti arvioida testaamalla lisää eläimiä.

Havainnointijakso

18. Tarkkailujakson on oltava riittävän pitkä, jotta havaittujen vaikutusten korjautuvuus voidaan arvioida kokonaisuudessaan. Testi on kuitenkin lopetettava heti, jos eläin osoittaa jatkuvia merkkejä kovasta kärsimyksestä tai kivusta. Vaikutusten korjautuvuuden määrittämiseksi eläimiä on tarkkailtava enintään 14 päivän ajan lappujen poistamisen jälkeen. Jos korjautuvuus todetaan ennen kuin 14 päivää on kulunut, testi on lopetettava silloin.

Kliiniset havainnot ja ihoreaktioiden pisteytys

19. Kaikista eläimistä tutkitaan eryteeman ja ödeeman merkit ja vasteet pisteytetään ensiksi 60 minuutin jälkeen ja sitten 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua lapun poistamisesta. Yhdelle eläimelle tehtävän alkutestin jälkeen testikohta tutkitaan myös heti lapun poistamisen jälkeen. Ihoreaktiot pisteytetään ja kirjataan jäljempänä esitetyn taulukon asteikon mukaan. Jos iholla esiintyy vaurioita, joita ei voida tunnistaa ärsytykseksi tai syöpymiseksi 72 tunnin kuluttua, havainnointia voi olla tarpeen jatkaa päivään 14 asti, jotta vaikutusten korjautuvuus voidaan todeta. Ärsytyksen lisäksi kaikki paikalliset toksiset vaikutukset, kuten ihon rasvan liukeneminen ja mitkä tahansa systeemiset haittavaikutukset (esimerkiksi vaikutukset kliinisiin toksisuuden merkkeihin ja painoon), on kuvattava ja kirjattava täydellisesti. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

20. Ihovasteiden pisteytys on väistämättä subjektiivista. Ihovasteiden pisteytyksen yhdenmukaistamiseksi sekä testilaboratorioiden ja havaintoja tekevien ja tulkitsevien henkilöiden työn helpottamiseksi havaintoja tekevä henkilöstö on perehdytettävä käytettävään pisteytysjärjestelmään (ks. jäljempänä oleva taulukko). Kuvitettu opas ihoärsytyksen ja muiden vaurioiden asteista voi olla hyödyllinen (3).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

21. Tutkimuksen tulokset on esitettävä taulukkona lopullisessa testiraportissa, ja niiden on sisällettävä kaikki kohdassa 24 luetellut asiat.

Tulosten arviointi

22. Ihoärsytyspisteet on arvioitava yhdessä vaurioiden luonteen ja vakavuuden sekä niiden korjautuvuuden tai korjautumattomuuden kanssa. Yksittäiset pisteet eivät edusta aineen ärsyttävyysominaisuuksien absoluuttista tasoa, koska myös testikemikaalin muut vaikutukset arvioidaan. Sen sijaan yksittäisiä pisteitä voidaan tarkastella viitearvoina, jotka on arvioitava kaikkien muiden tutkimuksessa tehtyjen havaintojen yhteydessä.

23. Ihovaurioiden korjautuvuus on otettava huomioon ärsytysvastetta arvioitaessa. Jos vasteet, kuten kaljuuntuminen (suppealla alueella), liikasarveistuminen, liikakasvu ja hilseily, jatkuvat 14 päivän tarkkailujakson loppuun asti, testikemikaali on luokiteltava ihoa ärsyttäväksi.

Testiraportti

24. Testiraportissa on oltava seuraavat tiedot:

Perustelut in vivo -testin tekemiselle:

— aiemmista tutkimuksista saatujen testitulosten painoarvoanalyysi, myös vaiheittaisen menettelyn tulokset

— aiemmista testeistä saatujen relevanttien tulosten kuvaus

— testausstrategian kustakin vaiheesta saadut tulokset

— kuvaus tehdyistä *in vitro* -testeistä, myös yksityiskohtaiset tiedot menettelyistä ja testi-/vertailuaineista saadut tulokset

— painoarvoanalyysi *in vivo* -testiä varten.

Testikemikaali:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— Useammasta ainesosasta koostuva aine, seos ja koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit (UVCB-aineet): luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, pitoisuus (tarvittaessa), käytetty tilavuus

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläin (-eläimet):

— käytetty laji/kanta, perustelut muiden eläinten kuin albiinokaniinien käytölle

— uros- ja naaraseläinten määrä

— eläinyksilöiden paino(t) testin alussa ja lopussa

— eläinten ikä testin alussa

— eläimen (eläinten) alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio jne.

Testiolosuhteet:

— lapun asettamiskohdan valmistelumenetelmä

— käytettyjen lappumateriaalien ja lappujen asettamismenetelmän yksityiskohdat

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, annostelusta ja iholta poistamisesta.

Tulokset:

— kunkin eläimen ärsytys-/syöpymisvasteen pisteytys jokaiselta mittauskerralta taulukkona

— kuvaus kaikista havaituista vaurioista

— sanallinen kuvaus havaitun ärsytyksen/syöpymisen luonteesta ja asteesta sekä mahdolliset histopatologiset löydökset

— kuvaus muista paikallisista haittavaikutuksista (esimerkiksi ihon rasvan liukeneminen) ja systeemisistä vaikutuksista ihoärsytyksen-/syöpymisen lisäksi.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Taulukko

Ihoreaktioiden pisteytys

Eryteeman ja karstan muodostus

Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava tai vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus) – karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

Ödeeman (turvotuksen) muodostus

Ei ödeemaa	0
Hyvin lievä ödeema (tuskin havaittava)	1
Lievä ödeema (selvärajainen alue, jonka reunat ovat koholla)	2
Keskivakava ödeema (noin 1 mm koholla)	3
Vakava ödeema (enemmän kuin 1 mm koholla ja levinnyt altistuskohtaa laajemmalle)	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

Epäselvien vaurioiden tapauksessa voidaan tehdä histopatologinen tutkimus.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali on aine tai seos.

Ihoärsytys tarkoittaa korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia sen jälkeen, kun testikemikaalia on annosteltu.

Ihon syöpyminen tarkoittaa korjautumattoman ihovaurion syntymistä eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantumista enintään neljä tuntia sen jälkeen, kun testikemikaalia on annosteltu. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden tapauksessa olisi harkittava histopatologista tutkimusta.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.”

2) Korvataan B osassa oleva B.17 luku seuraavasti:

"B.17 ***IN VITRO*-GEENIMUTAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUILLA HPRT- JA XPRT-GEENEJÄ KÄYTTÄEN**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 476 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Tämä tarkistettu versio testimenetelmästä B.17 perustuu lähes 30 vuoden kokemukseen tästä testistä sekä sellaisen erillisen uuden menetelmän kehittämistyön tuloksiin, jossa tehdään *in vitro* -geenimutaatiotestejä nisäkässoluilla tymidiinikinaasigeeniä käyttäen. Testimenetelmä B.17 on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. OECD on laatinut asiakirjan (1), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Nisäkässoluilla tehtävän *in vitro* -geenimutaatiotestin tarkoituksena on havaita kemikaalien aiheuttamia geenimutaatioita. Näissä testeissä käytettävissä solulinjoissa mitataan forward-mutaatioita reportterigeeneissä, erityisesti endogeenisessa hypoksantiini-guaniini-fosforibosyylitransferaasigeenissä (jyrsijöiden soluissa Hprt, ihmisen soluissa HPRT; tässä testimenetelmässä niistä käytetään nimityksiä Hprt-geeni ja HPRT-testi), ja ksantiini-guaniinifosforibosyylitransferaasin siirtogeenissä (gpt) (jäljempänä 'XPRT-testi'). HPRT- ja XPRT-mutaatiotesteillä voidaan havaita erilaisia geneettisiä tapahtumia. HPRT-testillä havaittujen mutaatiotapahtumien (mm. pistemutaatioiden, lukukehyksen siirtymien, pienten deleetioiden ja insertioiden) lisäksi autosomissa sijaitsevan gpt:n siirtogeenin avulla voidaan havaita myös suurista deleetioista ja mahdollisesti mitoottisesta rekombinaatiosta johtuvia mutaatioita, joita HPRT-testillä ei havaita, koska Hprt-geeni sijaitsee X-kromosomissa (2) (3) (4) (5) (6) (7). Tällä hetkellä XPRT-testiä käytetään sääntelytarkoituksissa vähemmän kuin HPRT-testiä.

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA POHDINTOJA JA RAJOITUKSET

4. *In vitro* -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita.

5. On huolehdittava siitä, että vältetään olosuhteet, jotka voisivat johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin (ts. mahdollinen yhteisvaikutus testausjärjestelmän kanssa), jotka eivät johdu testikemikaalien ja solun geneettisen materiaalin suorasta yhteisvaikutuksesta. Tällaisiin olosuhteisiin sisältyvät pH:n tai osmolaliteetin muutokset (8) (9) (10), yhteisvaikutus kasvatusliuoksen komponenttien kanssa (11) (12) tai liian korkeat sytotoksisuustasot (13). HPRT-testissä sytotoksisuutta pidetään liian korkeana, jos se ylittää 19 kohdassa määritetyt sytotoksisuuden enimmäistasot.

6. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

7. Mutantit solut, joista puuttuu Hprt-entsyymitoiminta HPRT-testissä tai xprt-entsyymitoiminta XPRT-testissä, ovat resistenttejä puriinianalogi 6-tioguaniinin sytostaattisille vaikutuksille. Hprt:n (HPRT-testissä) tai gpt:n (XPRT-testissä) läsnä ollessa solut ovat herkkiä tioguaniinille, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut kykenevät siis lisääntymään tioguaniinin läsnä ollessa, kun taas normaalit, Hprt-entsyymiä (HPRT-testissä) tai gpt-entsyymiä (XPRT-testissä) sisältävät solut eivät kykene.

8. Suspensiossa tai yksikerrosviljelmissä olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi (3–6 tunniksi) testikemikaalille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä (ks. 14 kohta) ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota (14) (15) (16) (17). Sytotoksisuus määritetään yleensä mittaamalla viljelmien suhteellinen eloonjääneisyys (kloonaustehokkuus) heti altistuksen jälkeen ja mukauttamalla se mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon negatiiviseen kontrolliin verrattuna (18 kohta ja lisäys 2). Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusliuoksessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle solutyypille ominainen, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (yleensä vähintään 7–9 päivää). Fenotyypin ilmentymisen jälkeen mutaationopeus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttipesäkkeiden toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle ja toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella mutanttien selektion aikaisella kloonaustehokkuudella korjattuna.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Solut

9. HPRT- ja XPRT-testeissä on käytettävä solutyyppejä, joiden on osoitettu olevan herkkiä kemiallisille mutageeneille ja joilla on hyvä kloonaustehokkuus, stabiili karyotyyppi ja stabiili spontaanimutaationopeus. HPRT-testissä yleisimmin käytettyjä solulinjoja ovat kiinanhamsterin solulinjat CHO, CHL ja V79, hiiren lymfoomasolulinja L5178Y ja ihmisen lymfoblastoidisolulinja TK6 (18) (19). XPRT-testissä käytetään CHO-linjasta peräisin olevia AS52-soluja, jotka sisältävät gpt-siirtogeenin (ja joista Hprt-geeni on poistettu) (20) (21); HPRT-testiä ei voida tehdä AS52-soluilla, koska hprt-geeni on poistettu. Muiden solulinjojen käyttö on perusteltava ja validoitava.

10. Solulinjoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei mykoplasmakontaminaatiota ole (22) (23). Soluja ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa on määritettävä ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen. Myös isäntäsolukannan spontaani mutaationopeus on tarkistettava, eikä kantaa tule käyttää, ellei mutaationopeus ole hyväksyttävä.

11. Ennen kuin viljelmiä käytetään tässä testissä, niistä voi olla tarpeen poistaa olemassa olevat mutanttisolut esimerkiksi viljelemällä HAT-liuoksessa (HPRT-testi) ja MPA-liuoksessa (XPRT-testi) (5) (24) (ks. lisäys 1). Puhdistetut solut voidaan kylmäsäilöä ja sulattaa käytettäviksi varastokantoina. Sulatettua varastokantaa voidaan käyttää testaukseen, kun normaalit kaksinkertaistumisajat ovat umpeutuneet. XPRT-testiä tehtäessä AS52-solujen rutiiniviljelyssä on käytettävä sellaisia olosuhteita, joiden avulla varmistetaan gpt-siirtogeenin säilyminen (20).

Kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet

12. Soluviljelmiä on viljeltävä soveltuvassa kasvatusliuoksessa ja asianmukaisissa inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, kosteutettu ilma, jonka CO_2-pitoisuus on 5 prosenttia, ja 37 °C:n inkubointilämpötila). Soluviljelmät on pidettävä aina sellaisissa olosuhteissa, joiden avulla varmistetaan, että ne kasvavat log-vaiheessa. On erityisen tärkeää valita sellaiset kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja optimaalisen kloonaustehokkuuden sekä mutanteille että ei-mutanteille soluille.

Soluviljelmien valmistelu

13. Solulinjat kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään kasvatusliuokseen sellaiseen tiheyteen, että suspensioissa tai yksikerrosviljelmissä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti altistus- ja ilmentymisaikana (esimerkiksi konfluenssia on vältettävä yksikerrosviljelmissä kasvavien solujen osalta).

Metabolinen aktivaatio

14. Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä. Yleisimmin käytetty järjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei toisin toimiminen ole perusteltua, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (25) (26) (27) (28) tai fenobarbitaalin ja β-naftoflavonin (29) (30) (31) (32) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen kanssa (33), ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254 (29) (31). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 tilavuusprosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiliuoksessa. Testattavien aineiden luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää (34) (35) (36).

Testikemikaalin valmistus

15. Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä (ks. 16 kohta). Nestemäiset testikemikaalit voidaan lisätä suoraan testijärjestelmään ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmässä käsittelyä. Kaasujen tai haihtuvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä tarvittavia muutoksia; kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (37) (38). Testikemikaali on valmistettava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

KOE-OLOSUHTEET

Liuottimet

16. Liuotin on valittava siten, että testikemikaalien liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä se haittaa testin suorittamista esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai haittaamalla metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai soluviljelmän kasvatusliuoksen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Vakiintuneita liuottimia ovat esimerkiksi vesi tai dimetyylisulfoksidi. Yleensä orgaanisten liuottimien osuus ei saa ylittää yhtä ja vesipitoisten liuottimien (suolaliuos tai vesi) kymmentä tilavuusprosenttia lopullisessa käsittelyaineessa. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia (esimerkiksi etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne, testikemikaalit ja testijärjestelmä sopivat yhteen ja etteivät ne ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Tällaisten perustelevien tietojen puuttuessa on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1), jotka osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta mitään haitallisia tai mutageenisiä vaikutuksia.

Sytotoksisuuden mittaus ja altistuspitoisuuksien valinta

17. Päätettäessä suurimmasta testikemikaalin pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 20 kohta), saostumista kasvatusliuokseen (ks. 21 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 5 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä kasvatusliuoksen pH-arvon merkittävän muuttumisen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen käsittelyliuos väärien positiivisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

18. Pitoisuuden valinta perustuu sytotoksisuuteen ja muihin näkökohtiin (ks. 22–22 kohta). Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä saattaa olla hyödyllinen, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Vaikka alustava sytotoksisuustesti tehtäisiin, sytotoksisuus on kunkin viljelmän osalta silti mitattava myös pääasiallisessa kokeessa. Sytotoksisuus on arvioitava käyttämällä suhteellista eloonjääneisyyttä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuutta heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna solumäärän perusteella verrattuna negatiivisten kontrollien kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %) (ks. kaavio lisäyksestä 2).

19. Vähintään neljää hyväksymisperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (pois lukien liuotinkontrolli ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, kunkin testattavan pitoisuuden yhteydessä voidaan käyttää joko rinnakkaisviljelmiä tai yhtä viljelmää. Riippumattomista rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset on raportoitava erikseen, mutta ne voidaan yhdistää tietojen analyysia varten (17). Sellaisten testikemikaalien kohdalla, jotka osoittavat vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta, sopiva pitoisuusväli on yleensä noin 2–3. Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli sytotoksisuuden esiintymispitoisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja jotta saataisiin tietoja sytotoksisuuden koko vaihteluvälistä tai voitaisiin tutkia annosvastesuhdetta tarkasti, voi olla tarpeen käyttää pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja useampaa kuin neljää pitoisuutta erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 43 kohta). Useamman kuin neljän pitoisuuden käyttö voi olla erityisen tärkeää silloin, kun käytetään yksittäisiä viljelmiä.

20. Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmalla pitoisuudella pitäisi saavuttaa 20 ja 10 prosentin välillä vaihteleva suhteellinen eloonjääneisyys. Vain 10 prosentin tai sitä pienempään suhteelliseen eloonjääneisyyteen viittaavia positiivisia tuloksia on tulkittava varoen (43 kohta).

21. Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienempinä pitoisuuksina, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalille altistumisen päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla nähtävää sameutta tai saostumista. Vaikka sytotoksisuutta esiintyisi pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suositeltavaa testata ainoastaan yksi sameutta tai näkyvää saostumista tuottava pitoisuus, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Saostumista aiheuttavissa pitoisuuksissa on huolehdittava siitä, ettei saostuminen vaikuta testin suorittamiseen. Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän kasvatusliuokseen.

22. Jos saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta ei esiinny, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (39) (40). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali (UVCB-aine) (41) taikka ympäristöstä otettu näyte, suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esimerkiksi 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (42).

Kontrollit

23. Kaikkiin testiolosuhteisiin on sisällytettävä samanaikaiset negatiiviset kontrollit (ks. 16 kohta), jotka koostuvat pelkästään käsittelyliuoksessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

24. Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan osoittamaan laboratorion kyky tunnistaa mutageenejä käytetyn testisuunnitelman olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus, kun tämä on tarpeen. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään jäljempänä taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää perustelluissa tapauksissa. Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenitoksisuustestit ovat riittävän standardoidut, testit, joissa käytetään käsittelyjä eksogeenisen metabolisen aktivaation kanssa tai ilman sitä, voidaan tehdä käyttäen vain yhtä positiivista kontrollia, joka vaatii metabolista aktivaatiota. Tässä tapauksessa tämä yksittäinen positiivinen kontrollivaste osoittaa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän toiminnan että testausjärjestelmän herkkyyden. Kutakin positiivista kontrollia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa oleva lisääntyminen taustaan verrattuna. Näin voidaan osoittaa testausjärjestelmän herkkyys, ja tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso ei saa vaarantaa vasteen luotettavuutta (ks. 20 kohta).

Taulukko 1

Vertailuaineet, joita suositellaan laboratorion pätevyyden arvioimiseksi ja positiivisten kontrollien valintaan

Metabolinen aktivaatio	Lokus	Aine ja CAS-nro
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	*Hprt*	Etyylimetaanisulfonaatti [CAS-nro 62-50-0] Etyylinitrosourea [CAS-nro 759-73-9] 4-nitrokinoliini-1-oksidi [CAS-nro 56-57-5]
	xprt	Streptonigriini [CAS-nro 3930-19-6] Mitomysiini C [CAS-nro 50-07-7]
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	*Hprt*	3-metyylikolantreeni [CAS-nro 56-49-5] 7,12-dimetyylibentsantraseeni [CAS-nro 57-97-6] Bentso[a]pyreeni [CAS-nro 50-32-8]
	xprt	Bentso[a]pyreeni (CAS-nro 50-32-8)

MENETTELY

Käsittely testikemikaalilla

25. Lisääntyvät solut altistetaan testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (asianmukainen aika on yleensä 3–6 tuntia).

26. Jokaisessa testiviljelmässä (kontrolli ja altistus) kussakin testivaiheessa käytettävien solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaaniin mutaationopeuteen. Yleisohje on altistaa ja siirrostaa riittävästi soluja, jotta jokaisessa viljelmässä on testin jokaisessa vaiheessa 10 spontaanimutaatiota (17). Spontaani mutaationopeus on yleensä 5–20 × 10-6. Jotta spontaani mutaationopeus olisi 5 × 10-6 ja jotta spontaanimutaatioita olisi riittävästi (vähintään 10) myös niissä viljelmissä, jotka on altistettu pitoisuuksille, jotka aiheuttavat 90 prosentin sytotoksisuutta käsittelyn aikana (suhteellinen eloonjääneisyys 10 prosenttia), on käsiteltävä vähintään 20 × 106 solua. Lisäksi on viljeltävä riittävä määrä soluja (aina kuitenkin vähintään 2 miljoonaa) ilmentymisaikana, ja solut on maljattava mutanttien selektiota varten (17).

Fenotyypin ilmentymisaika ja mutaationopeuden mittaus

27. Altistusjakson jälkeen solut viljellään mutanttifenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi. Vähintään 7–9 päivää on yleensä riittävä, jotta hiljattain aiheutettujen Hprt- ja xprt-mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (43) (44). Tänä aikana soluja jatkoviljellään säännöllisesti, jotta niiden eksponentiaalinen kasvu jatkuisi. Fenotyypin ilmentymisen jälkeen solut maljataan uudelleen selektiivistä ainetta (6-tioguaniinia) sisältävään kasvatusliuokseen, jotta voidaan määrittää mutanttien määrä ja kloonaustehokkuus selektion aikana. Yksikerrosviljelyssä voidaan käyttää maljoja tai suspensiossa olevien solujen osalta mikrokuoppalevyjä. Mutanttien selektion yhteydessä solut on maljattava sellaiseen tiheyteen, että mutanttien talteenotto voidaan varmistaa (ts. välttää metabolinen yhteisvaikutus) (17). Levyjä inkuboidaan optimaalisen pesäkekasvun kannalta riittävän pitkä aika (esimerkiksi 7–12 päivää), minkä jälkeen pesäkkeet lasketaan. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella mutanttien selektion aikaisella kloonaustehokkuudella korjattuna (ks. kaavat lisäyksestä 2).

Laboratorion pätevyys

28. Jotta laboratoriolla voidaan todeta olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion täytyy olla suorittanut useita kokeita positiivisilla vertailuaineilla, jotka vaikuttavat eri mekanismien välityksellä (ainakin yksi metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja yksi ilman sitä vaikuttava aine, jotka valitaan taulukossa 1 luetelluista aineista), sekä useita negatiivisia kontrolleja (erilaisia liuottimia/kantaja-aineita käyttäen). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden olisi oltava yhdenmukaisia lähdekirjallisuuden kanssa. Tätä ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta eli joista on 30–33 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

29. Tiettyjä positiivisia kontrolliaineita (ks. 25 kohdassa oleva taulukko 1) on tutkittava ilman metabolista aktivaatiota ja sen läsnä ollessa, jotta osoitetaan pätevyys havaita mutageenisia kemikaaleja, määrittää metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus ja osoittaa solujen käsittelyn aikaisten kasvuolosuhteiden, fenotyypin ilmentymisen, sekä mutanttien selektion asianmukaisuus ja laskentamenetelmien soveltuvuus. Valittujen aineiden eri pitoisuudet on valittava siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, koejärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

30. Laboratorion on määritettävä:

— aikaisempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

31. Kun ensimmäisen kerran saadaan tietoja aikaisemman negatiivisen kontrollin jakaumasta, samanaikaisten negatiivisten kontrollien pitäisi olla julkaistujen kontrollitietojen mukaisia (22). Kun kontrollin jakaumaan lisätään enemmän kokeellista tietoa, samanaikaisten negatiivisten kontrollien tulisi mieluiten sijoittua kyseisen jakauman 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (17) (45) (46).

32. Laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeella, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa testiolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (47)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja sen osoittamiseksi, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (46). Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksymisperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (45).

33. Negatiivisten kontrollitietojen on koostuttava mutaationopeuksista yhdessä viljelmässä tai mieluiten rinnakkaisviljelmissä 23 kohdan mukaisesti. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (17) (45) (46). Jos samanaikaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 prosentin kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisempien kontrollien jakaumaan edellyttäen, että ne eivät ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. edellä) ja että kyse ei ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

34. Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon järjestelyn yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aikaisempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aikaisempien kontrollien tietokanta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

35. Tulokset on esitettävä siten, että ne sisältävät kaikki sytotoksisuuden laskemiseen tarvittavat tiedot (suhteellisella eloonjääneisyydellä ilmaistuna). Sekä altistettuja että kontrolliviljelmiä koskevien tietojen on sisällettävä solujen lukumäärä altistuksen päättyessä, heti altistuksen jälkeen maljattujen solujen lukumäärä sekä pesäkkeiden lukumäärä (tai pesäkkeettömien kuoppien lukumäärä mikrokuoppalevymenetelmässä). Suhteellinen eloonjääneisyys on ilmaistava jokaisen viljelmän osalta prosenttiosuutena samanaikaiseen liuotinkontrolliin nähden (ks. määritelmät lisäyksestä 1).

36. Tulokset on esitettävä siten, että ne sisältävät kaikki mutaationopeuden laskemiseen tarvittavat tiedot. Sekä altistettuja että kontrolliviljelmiä koskevien tietojen on sisällettävä 1) selektiivisen aineen kanssa ja ilman sitä maljattujen solujen lukumäärä (silloin, kun solut maljataan mutanttien selektiota varten) ja 2) laskettujen pesäkkeiden lukumäärä (tai pesäkkeettömien kuoppien lukumäärä mikrokuoppalevymenetelmässä) maljoista, joissa on tai ei ole selektiivistä ainetta. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella (maljat, joissa on selektiivistä ainetta) kloonaustehokkuudella korjattuna (maljat, joissa ei ole selektiivistä ainetta). Mutaationopeus on ilmaistava mutanttien solujen lukumäärällä miljoonaa elinkykyistä solua kohti (ks. määritelmät lisäyksestä 1).

37. Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkona.

Hyväksymisperusteet

38. Testin hyväksymisperusteet ovat seuraavat:

— Samanaikaisten negatiivisten kontrollien tietoja pidetään hyväksyttävinä lisättäviksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 33 kohdassa kuvatun mukaisesti.

— Samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 24 kohta) on aiheutettava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin.

— Testissä käytettiin kahdenlaisia testiolosuhteita (ts. metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä, ellei ensimmäinen niistä tuottanut positiivisia tuloksia (ks. 25 kohta).

— Riittävä määrä soluja ja pitoisuuksia on analysoitavissa (25, 26 ja 19 kohta).

— Suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 20, 21 ja 22 kohdassa kuvattuja perusteita.

Tulosten arviointi ja tulkinta

39. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista testiolosuhteista:

— vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

— kasvu riippuu pitoisuudesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

— mikä tahansa tuloksista on aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 33 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan aiheuttaa geenimutaatioita viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopivimmista tilastomenetelmistä (46) (48).

40. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos kaikissa tutkituissa testiolosuhteissa:

— mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— pitoisuudesta riippuvaa kasvua ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

— kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman rajoissa (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 33 kohta).

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi aiheuttaa geenimutaatioita viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä.

41. Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

42. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen edellä kuvatulla tavalla tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvion ja /tai lisätutkimusten avulla. Kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja testiolosuhteita (esimerkiksi pitoisuusvälit, muut metaboliset aktivaatiojärjestelmät [kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä]) saattaa olla hyödyllistä.

43. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Tällöin testikemikaalin vaste jää epäselväksi (sen tulkitaan olevan yhtä todennäköisesti positiivinen tai negatiivinen).

Testiraportti

44. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon mittaus, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen pitoisuus lopullisessa kasvatusliuoksessa.

Solut:

Laboratorion kantaviljelmät:

— solulinjojen tyyppi ja lähde

— siirrostusten lukumäärä, jos saatavilla, ja taustatiedot laboratoriossa

— karyotyypin ominaisuudet ja/tai kromosomien modaalinen lukumäärä

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät

— mykoplasman puuttuminen

— solujen kaksinkertaistumisajat.

Testiolosuhteet:

— pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— kasvatusliuosten koostumus, hiilidioksidipitoisuus, kosteustaso

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena kasvatusliuoksessa (esim. µg tai mg/ml tai mM kasvatusliuoksessa)

— kasvatusliuokseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubointilämpötila

— inkubointiaika

— altistuksen kesto

— solutiheys altistuksen aikana

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa kasvatusliuoksessa, S9-jakeen laadunvalvonta)

— positiiviset ja negatiiviset kontrolliaineet, kunkin käsittelyolosuhteen lopulliset pitoisuudet

— ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä sekä jatkoviljelmät ja kasvatusliuoksen vaihtoajat tarvittaessa)

— selektiivisen aineen tunnistetiedot ja sen pitoisuus

— testien hyväksymisperusteet

— elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät

— sytotoksisuuden mittauksessa käytetyt menetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— inkubointiaikojen kesto maljauksen jälkeen

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— pH:n, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät.

Tulokset:

— altistettujen solujen lukumäärä ja jokaisesta viljelmästä jatkoviljeltyjen solujen lukumäärä

— sytotoksisuusmittaukset ja mahdolliset muut havainnot

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta

— selektiiviseen ja ei-selektiiviseen kasvatusliuokseen maljattujen solujen lukumäärä

— ei-selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien pesäkkeiden lukumäärä ja selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien resistenttien pesäkkeiden lukumäärä ja niihin liittyvät mutaationopeudet

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aiemmat negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot, vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat sekä luottamusväli (esimerkiksi 95 prosenttia) ja tietojen määrä

— tilastoanalyysit (yksittäisistä viljelmistä ja yhdistetyistä rinnakkaisviljelmistä, jos tarpeen) sekä mahdolliset p-arvot.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, s. 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. (Tekeillä oleva käsikirjoitus.)

(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. Teoksessa: *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, s. 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). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus, Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP). Saatavana osoitteessa [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. Teoksessa: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

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

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (testiohjeet 473, 476 ja 487). Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(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. Saatavana osoitteessa [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. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat emäsparien korvautumisen DNA:ssa.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kloonaustehokkuus: Niiden harvakseltaan maljattujen solujen prosentuaalinen osuus, jotka pystyvät kasvamaan pesäkkeeksi, joka voidaan laskea.

Pitoisuudet: Testikemikaalin lopulliset pitoisuudet kasvatusliuoksessa

Sytotoksisuus: Tämän testimenetelmän mukaisissa analyyseissä sytotoksisuus määritetään aineelle altistettujen solujen suhteellisen eloonjääneisyyden pienentymisenä verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. tätä koskeva kohta).

Forward-mutaatio: Geenin mutaatio parentaalisesta tyypistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama valkuaisaine menettää entsymaattisen aktiivisuutensa tai sen entsyymiaktiivisuus muuttuu.

Lukukehyksensiirtomutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

Genotoksinen: Yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa DNA:n katkeamiselle, addukteille, uudelleenjärjestäytymiselle, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

HAT-liuos: Hypoksantiinia, aminopteriinia ja tymidiiniä sisältävä liuos, jota käytetään Hprt-mutanttien puhdistukseen.

Mitoottinen rekombinaatio: Mitoosin aikana tapahtuva kahden homologisen kromatidin rekombinaatio, joka voi saada aikaan DNA:n kahden säikeen katkeamisen tai heterotsygoottisuuden häviämisen.

MPA-liuos: Ksantiinia, adeniinia, tymidiiniä, aminopteriinia ja mykofenolihappoa sisältävä liuos, jota käytetään Xprt-mutanttien puhdistukseen.

Mutageeninen: Aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa (-rakenteissa) tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Mutaationopeus: Selektiiviselle alustalle maljatuista soluista todettujen mutanttipesäkkeiden lukumäärä korjattuna selektion aikaisella kloonaustehokkuudella (tai elinkykyisyydellä).

Fenotyypin ilmentymisaika: Altistuksen jälkeinen aika, jona geneettinen muutos kiinnittyy genomiin ja mahdolliset aikaisemmat geenituotteet poistuvat siten, että fenotyyppinen ominaisuus muuttuu.

Suhteellinen eloonjääneisyys: Suhteellista eloonjääneisyyttä käytetään altistukseen liittyvän sytotoksisuuden mittarina. Suhteellinen eloonjääneisyys on maljattujen solujen kloonaustehokkuus heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna ja verrattuna negatiivisten kontrollien kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %).

Maksasta eristetty S9-jae: Maksahomogenaatin supernatantti 9 000 g:n sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemätön maksanäyte.

S9-seos: Maksasta eristetyn S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Liuotinkontrolli: Yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Käsittelemätön kontrolli: Soluviljelmät, joita ei altisteta (eli joihin ei lisätä testikemikaalia eikä liuotinta), mutta jotka käsitellään samanaikaisesti samalla tavoin kuin testikemikaalia saavat soluviljelmät.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

Lisäys 2

KAAVAT SYTOTOKSISUUDEN JA MUTAATIONOPEUDEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

Sytotoksisuus määritetään suhteellisena eloonjääneisyytenä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuudella heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna ja verrattuna negatiivisten kontrollien mukautettuun kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %) (ks. suhteellisen eloonjääneisyyden kaava jäljempänä).

Testikemikaalille altistetun viljelmän mukautettu kloonaustehokkuus lasketaan näin:

$$\text{Mukautettu kloonaustehokkuus (CE]} = \frac{\text{Solujen määrä käsittelyn lopussa}}{\text{Solujen määrä käsittelyn alussa}}$$

Testikemikaalille altistetun viljelmän suhteellinen eloonjääneisyys lasketaan näin:

$$\text{Suhteellinen eloonjääneisyys (RS]} = \frac{\text{Mukautettu kloonastehokkuus käsitellyssä viljelmässä}}{\text{Mukautettu kloonaustehokkuus liuotinkontrollissa}} \times 100$$

Mutaationopeus on selektiivisessä kasvatusliuoksessa todettujen mutanttipesäkkeiden kloonaustehokkuus jaettuna ei-selektiivisellä kasvatusliuoksessa todettujen pesäkkeiden kloonaustehokkuudella samassa viljelmässä selektion aikana.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Mutanttipesäkkeiden kloonaustehokkuus selektiivisessä kasvatusliuoksessa}}{\text{Kloonaustehokkuus ei — selektiivisessä kasvatusliuoksessa}}$$

Kun kloonaustehokkuuden määrittämisessä käytetään maljoja:

Kloonaustehokkuus (CE) = pesäkkeiden lukumäärä / maljattujen solujen lukumäärä.

Kun kloonaustehokkuuden määrittämisessä käytetään mikrokuoppalevyjä:

Pesäkkeiden lukumäärä kuoppaa kohti mikrokuoppalevyissä noudattaa Poissonin jakaumaa.

Kloonaustehokkuus = -LnP(0) / maljattujen solujen lukumäärä kuoppaa kohti

Tässä kaavassa -LnP(0) on tyhjien kuoppien todennäköinen lukumäärä kylvetyistä kuopista, ja sitä kuvataan seuraavalla kaavalla:

LnP(0)= -Ln (tyhjien kuoppien lukumäärä / maljattujen kuoppien lukumäärä)”

3) Korvataan B osassa oleva B.22 luku seuraavasti:

"B.22 **DOMINOIVA LETAALITESTI JYRSIJÖILLÄ**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 478 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Tämä muokattu versio testimenetelmästä perustuu yli 30 vuoden kokemukseen tästä testistä ja mahdollisuuteen liittää tai yhdistää tämä testi muihin toksisuustesteihin, joita ovat esimerkiksi kehitys-, lisääntymis- tai genotoksisuustutkimukset. Koska tällä testillä on rajoituksensa ja koska siinä pitää käyttää paljon koe-eläimiä, sitä ei ole tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisena menetelmänä vaan pikemminkin täydentävänä testimenetelmänä, jota voidaan käyttää vain, jos sille ei ole vaihtoehtoa sääntelyvaatimusten kannalta. Kun toksisuustestejä yhdistetään, suuret määrät koe-eläimiä välttyvät toksisuustesteissä käyttämiseltä. OECD on laatinut asiakirjan (1), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Dominoivan letaalitestin tarkoituksena on tutkia, tuottavatko kemikaalit mutaatioita, jotka johtuvat itusolujen kromosomipoikkeavuuksista. Lisäksi dominoiva letaalitesti on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat vaikuttaa vasteisiin. Kun testikemikaalille altistus aiheuttaa dominoivia letaalimutaatioita, on syytä olettaa, että kemikaalilla on testattavan lajin sukusoluihin kohdistuvia vaikutuksia.

3. Dominoivat letaalimutaatiot aiheuttavat alkio- tai sikiökuolemia. Kun testikemikaalille altistus aiheuttaa dominoivia letaalimutaatioita, on syytä olettaa, että kemikaalilla on testattavan lajin itusoluihin kohdistuvia vaikutuksia.

4. Dominoiva letaalitesti on hyödyllinen, kun täytyy vahvistaa positiiviset tulokset testeistä, joissa on käytetty somaattisia in vivo -päätetapahtumia, ja se on myös merkityksellinen päätetapahtuma ihmisiin kohdistuvien vaarojen ja itulinjan kautta välittyvien geneettisten sairauksien riskin ennustamisessa. Tässä testissä pitää kuitenkin käyttää paljon koe-eläimiä, ja se vaatii myös paljon työvoimaa. Näin ollen testin tekeminen on hyvin kallista ja aikaa vievää. Koska dominoivien letaalimutaatioiden spontaani esiintymistaajuus on melko korkea, testin herkkyys havaita mutaationopeuden pientä lisääntymistä on yleisesti rajallinen.

5. Keskeisten termien määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Testi tehdään useimmiten hiirillä (2) (3) (4) mutta myös muut lajit, kuten rotta (5) (6) (7) (8), voivat olla toisinaan asianmukaisia, jos niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua. Dominoivat letaalivaikutukset johtuvat yleensä merkittävistä kromosomipoikkeavuuksista (rakenteelliset ja numeeriset poikkeavuudet) (9) (10) (11), mutta geenimutaatioitakaan ei voida sulkea pois. Dominoiva letaalimutaatio on sellainen mutaatio, jota esiintyy pelkästään itusolussa, tai sellainen, joka kehittyy varhaisvaiheen alkiossa hedelmöittymisen jälkeen mutta ei aiheuta sukusolun toimintahäiriöitä vaan on letaali hedelmöittyneelle munasolulle tai kehittyvälle alkiolle.

7. Yksittäiset urokset pariutetaan peräkkäin astuttamattomien naaraiden kanssa määräajoin. Altistuksen jälkeisten parittelujen lukumäärä määräytyy dominoivan letaalitutkimuksen perimmäisen tavoitteen mukaan (23 kohta), ja sillä on määrä varmistaa, että dominoivat letaalivaikutukset arvioidaan uroksen itusolujen kaikissa kypsymisvaiheissa (12).

8. Jos on näyttöä siitä, että testikemikaali tai sen metaboliitti (metaboliitit) ei(vät) pääse kiveksiin, tätä testiä ei pidä käyttää.

TESTIN PERIAATE

9. Tässä testissä altistetaan yleensä urokset testikemikaalille asianmukaista reittiä pitkin ja pariutetaan ne altistamattomien ja astuttamattomien naaraiden kanssa. Erityyppisiä itusoluja voidaan testata jaksottamalla paritteluvälit. Parittelun jälkeen naaraat lopetetaan jonkin ajan kuluttua, ja niiden kohdut tutkitaan, jotta voidaan laskea kiinnittyneiden sekä elävien ja kuolleiden alkioiden lukumäärä. Testikemikaalin dominoiva letaalisuus määritetään vertaamalla, montako elävää kiinnittynyttä alkiota kullakin testiryhmän naaraalla on kantaja-aine-/liuotinkontrolliryhmän kunkin naaraan eläviin kiinnittyneisiin eläviin alkioihin nähden. Kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden lisääntyminen testiryhmän naarasta kohden verrattuna kontrolliryhmän naaraisiin kertoo siitä, että testikemikaali aiheuttaa alkiokuolemia kiinnittymisen jälkeen. Kiinnittymisen jälkeiset alkiokuolemat lasketaan määrittämällä kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärästä testiryhmässä ja vertaamalla sitä vastaavaan osuuteen kontrolliryhmässä. Ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat voidaan arvioida laskemalla munasarjojen keltarauhaset, joista vähennetään kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärä tai kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärä naarasta kohden testiryhmässä ja kontrolliryhmässä.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

10. Laboratorion on todistettava tätä testiä koskeva pätevyytensä osoittamalla, että se pystyy tuottamaan dominoivien letaalivaikutusten esiintymistaajuuksia julkaistuista tiedoista (esimerkiksi (13) (14) (15) (16) (17) (18)) positiivisilla kontrolliaineilla (heikot vasteet mukaan luettuina), esimerkiksi niillä, jotka on lueteltu taulukossa 1, ja kantaja-ainekontrolleilla, ja negatiivisten kontrollien esiintymistaajuuksia, joita koskevien tietojen vaihteluväli on johdonmukaisesti hyväksyttävä (ks. viitteet edellä) tai laboratorion aiemman kontrollien jakauman mukainen, jos se on saatavilla.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläinlajin valinta

11. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia terveitä sukukypsiä eläimiä. Yleensä käytetään hiiriä, mutta myös rotat voivat olla sopivia. Kaikkia muita sopivia nisäkäslajeja voidaan käyttää, jos raportissa esitetään sille tieteellinen perustelu.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

12. Jyrsijöiden kohdalla koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa se, miten siihen voidaan sekoittaa sopiva määrä testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Ennen altistusta tai parittelua jyrsijät on sijoitettava samaa sukupuolta edustaviin pienryhmiin (enintään viisi eläintä), ellei aggressiivista käyttäytymistä ole odotettavissa tai havaittu, mieluiten kiinteisiin häkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

13. Terveet, sukukypsät ja täysikasvuiset uros- ja naaraseläimet jaetaan satunnaisesti testi- ja kontrolliryhmiin. Eläimet merkitään yksilöllisesti inhimillisellä, mahdollisimman vähän invasiivisella toimenpiteellä (esimerkiksi rengastamalla, korvamerkillä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnisteella, mutta ei varpaita tai korvia leikkaamalla), ja niitä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun on oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 prosenttia kummankin sukupuolen keskimääräisestä painosta.

Annosten valmistelu

14. Kiinteät testikemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testikemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitysteiden kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet

Liuotin/kantaja-aine

15. Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan kemikaalin kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy.

Positiiviset kontrollit

16. Samanaikaisia positiivisia kontrollieläimiä on käytettävä aina, ellei laboratorio ole osoittanut pätevyyttään testin tekemisessä ja ellei se ole käyttänyt testiä rutiininomaisesti viime aikoina (esimerkiksi viiden viime vuoden aikana). Positiivisia kontrollieläimiä ei kuitenkaan tarvitse altistaa samaa reittiä kuin testikemikaalia saavia eläimiä, eikä näytteitä tarvitse ottaa kaikilta parittelujaksoilta. Positiivisten kontrolliaineiden on tiedettävä tuottavan dominoivia letaalivaikutuksia testissä käytetyissä olosuhteissa. Altistusta lukuun ottamatta kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin testiryhmien eläimiä.

17. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että ne tuottavat lieviä tai kohtalaisia vaikutuksia, jotta testin tehokkuutta ja herkkyyttä voidaan arvioida kriittisesti, mutta annosten on kuitenkin tuotettava jatkuvasti positiivisia dominoivia letaalivaikutuksia. Taulukossa 1 on esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista ja asianmukaisista annoksista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista

Aine [CAS-numero] (viitenumero)	Vaikuttavan annoksen vaihteluväli (mg/kg) (jyrsijälajit)	Antoaika (päivää)
Trietyleenimelamiini [51-18-3] (15)	0,25 (hiiret)	1
Syklofosfamidi [50-18-0] (19)	50–150 (hiiret)	5
Syklofosfamidi [50-18-0] (5)	25–100 (rotat)	1
Etyylimetaanisulfonaatti [62-50-0] (13)	100–300 (hiiret)	5
Monomeerinen akryyliamidi [79-06-1] (17)	50 (hiiret)	5
Klorambusiili [305-03-3] (14)	25 (hiiret)	1

Negatiiviset kontrollit

18. Negatiivisia kontrollieläimiä, joille annetaan pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita käsitellään muuten samalla tavalla kuin testiryhmiä, on sisällytettävä kuhunkin näytteenottokertaan (20). Jos käytettävissä ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja, joissa osoitetaan, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta dominoivia letaalivaikutuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, kullakin näytteenottokerralla olisi käytettävä myös altistamattomia kontrollieläimiä, jotta kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys voidaan todeta.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä

19. Yksittäiset urokset pariutetaan peräkkäin mieluiten yhden astuttamattoman naaraan kanssa määräajoin (esimerkiksi viikon välein, ks. 21 ja 23 kohta). On huolehdittava etukäteen siitä, että kussakin ryhmässä on riittävästi uroksia (kullakin parittelujaksolla astutettujen naaraiden määrään nähden), jotta saadaan aikaan tarvittava tilastollinen voima vähintään dominoivien letaalivaikutusten esiintymistiheyden kaksinkertaistumisen havaitsemiseksi (44 kohta).

20. Myös naaraiden määrä yhtä parittelujaksoa kohti on määritettävä etukäteen tilastollista voimaa koskevilla laskelmilla, jotta voidaan havaita vähintään dominoivien letaalivaikutusten esiintymistiheyden kaksinkertaistuminen (ts. riittävästi tiineitä naaraita, jotka tuottavat yhteensä vähintään 400 kiinnittynyttä alkiota) (20) (21) (22) (23) ja jotta odotettavissa on vähintään yksi kuollut kiinnittynyt alkio analyysiyksikköä (ts. annoskohtaista pariutumisryhmää) kohti (24).

Altistusjakso ja parittelujaksot

21. Altistusohjelma määrää altistamisen jälkeisten parittelujaksojen määrän. Paritteluja olisi oltava niin monta, että kaikista uroksen itusolun kypsymisvaiheista voidaan arvioida dominoivien letaalivaikutusten aiheutuminen (12) (25). Yhdessä altistuksessa, jossa annetaan enintään viisi annosta päivässä, on oltava 8 (hiiret) tai 10 (rotat) parittelua viikon välein viimeisen altistuksen jälkeen. Jos testissä annetaan useampia annoksia, parittelujaksojen määrää voidaan vähentää altistusajan pitenemisen mukaan. Tavoitteena tulee kuitenkin olla kaikkien spermatogeneesin vaiheiden arviointi (esimerkiksi 28 vuorokauden altistuksen jälkeen vain neljä parittelua viikossa riittää, jotta voidaan arvioida hiiren spermatogeneesin kaikki vaiheet). Kaikki altistus- ja parittelusuunnitelmat on perusteltava tieteellisesti.

22. Naaraita on pidettävä urosten luona vähintään yhden kiimakierron ajan (yksi kiimakierto kestää sekä hiirillä että rotilla yhden viikon). Naaraita, jotka eivät paritelleet viikon parittelujaksolla, voidaan käyttää seuraavalla parittelujaksolla tai siihen saakka, kunnes parittelun on todettu tapahtuneen emättimessä esiintyvän sperman tai emätintulpan perusteella.

23. Altistus- ja paritteluohjelma on suunniteltava dominoivia letaalivaikutuksia koskevan tutkimuksen perimmäisen tavoitteen mukaan. Jos tavoitteena on selvittää, aiheuttaako tietty kemikaali dominoivia letaalimutaatioita, hyväksyttävä menetelmä olisi altistaa yksi spermatogeneesikierto kokonaan (ts. hiirellä 7 viikkoa, 5–7 altistusta viikossa) ja antaa eläimen paritella vasta kierron lopussa. Mutta jos tavoitteena on selvittää, minkä tyyppinen itusolu on herkkä dominoivien letaalivaikutusten aikaansaamiselle, ensisijainen menetelmä on yhden tai viiden päivän altistus ja viikoittainen parittelu.

Annostasot

24. Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska sopivia tietoja ei ole vielä käytettävissä opastamaan annoksen valinnassa, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa (26). Tutkimuksessa on pyrittävä määrittämään suurin siedetty annos. Sillä tarkoitetaan suurinta annosta, jota siedetään ilman näyttöä tutkimusta rajoittavasta toksisuudesta tutkimuksen kestoon nähden (esimerkiksi annos, joka aiheuttaa poikkeavaa käyttäytymistä tai poikkeavia reaktioita, vähäistä painonlaskua tai verta muodostavan kudoksen sytotoksisuutta), mutta joka ei aiheuta kuolemaa eikä sellaista kipua, tuskaa tai kärsimystä, jonka vuoksi eläin olisi lopetettava inhimillisesti (27).

25. Suurin siedetty annos ei myöskään saa haitata parittelun onnistumista (21).

26. Testikemikaalit, joilla on tiettyjä biologisia vaikutuksia pieninä myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), ja kemikaalit, joissa esiintyy toksikokineettisten ominaisuuksien saturaatiota, voivat olla annoksen määrittämistä koskevien kriteerien osalta poikkeustapauksia, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

27. Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivinen kontrolliryhmä ja vähintään kolme annostasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2 mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuutta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurin kerta-annos pitäisi olla 2 000 mg/painokilo. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuutta, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla suurin annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, joka aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan toksisuutta. Myrkyttömien kemikaalien yhteydessä vähintään 14 päivän mittaisen altistusjakson raja-annos on 1 000 mg painokiloa kohti päivässä. Jos altistusjakso on vähemmän kuin 14 päivää, raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti päivässä.

Antotapa

28. Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi altistusreitiksi voidaan perustellusti valita esimerkiksi ravinto tai juomavesi, ihonalainen, suonensisäinen tai topikaalinen reitti, altistus hengitysteitse tai oraalisesti (letkuruokinnalla) taikka implantaatio. Joka tapauksessa reitti on valittava siten, että voidaan varmistaa kohdekudosten riittävä altistus. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, koska sitä ei ole tarkoitettu ihmisen altistumisreitiksi, ja sitä tulisi käyttää vain erityisten tieteellisien perusteiden nojalla. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on kerta-annoksesta, on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden saannin ja parittelun välillä on riittävä, jotta vaikutukset voidaan havaita (31 kohta). Se, kuinka paljon nestettä voidaan enintään antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona, määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Yleensä määrä saa olla enintään 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäismäärä voi olla 2 ml/100 g. Tätä suurempien määrien käyttö (jos eläinsuojelulainsäädäntö sen sallii) on perusteltava. Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta, jotta varmistetaan, että tilavuus on painoon nähden sama kaikilla annostasoilla.

Havainnot

29. Koe-eläimistä tulee tehdä yleisiä kliinisiä havaintoja ja niiden kliinisiä oireita tulee kirjata vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä, ja tässä on otettava huomioon, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava vähintään kahdesti vuorokaudessa annostelun aikana. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa, ja eläinten lopetuksen yhteydessä. Ravinnon kulutus olisi mitattava ainakin kerran viikossa. Jos testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutus on mitattava veden vaihdon yhteydessä tai vähintään kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta toksisuudesta, olisi lopetettava ennen tutkimusjakson päättymistä (27).

Kudosnäytteet ja niiden käsittely

30. Naaraat lopetetaan tiineyden toisella puoliskolla, hiiret tiineyspäivänä 13 ja rotat tiineyspäivänä 14 tai 15. Niiden kohdut tutkitaan dominoivien letaalivaikutusten osalta kiinnittyneiden alkioiden, elävien ja kuolleiden alkioiden ja keltarauhasten määrän selvittämiseksi.

31. Kohdunsarvet ja munasarjat avataan keltarauhasten laskemiseksi, ja sikiöt poistetaan, lasketaan ja punnitaan. Kohdusta on tutkittava huolellisesti myös mahdolliset elävien sikiöiden peittämät resorptiot, ja on varmistettava, että kaikki resorptiot lasketaan. Sikiökuolleisuus kirjataan. Myös hedelmöittyneiden naaraiden ja kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärä, ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat ja kiinnittymisen jälkeinen kuolleisuus (sekä varhain että myöhemmin tapahtuneet resorptiot) kirjataan. Lisäksi näkyvissä olevat sikiöt voidaan säilöä Bouinin fiksatiiviin vähintään kahden viikon ajaksi, jonka jälkeen ne tutkitaan selvien ulkoisten epämuodostumien varalta (28). Näin saadaan lisätietoa testiaineen vaikutuksista lisääntymiseen ja kehitykseen.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

32. Tulokset esitetään taulukossa, josta ilmenee paritelleiden urosten, tiineiden naaraiden sekä hedelmöittymättömien naaraiden lukumäärä. Kaikkien parittelujen tulokset sekä kunkin uroksen ja naaraan tunnistetiedot on esitettävä erikseen. Lisäksi on laskettava paritteluväli, altistettujen urosten annostaso sekä elävien kiinnittyneiden alkioiden ja kuolleiden alkioiden lukumäärä kunkin naaraan osalta.

33. Kiinnittymisen jälkeiset alkiokuolemat lasketaan määrittämällä kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus kaikista kiinnittyneistä alkioista testiryhmässä ja vertaamalla sitä vastaavaan osuuteen kantaja-ainetta tai liuotinta saaneessa kontrolliryhmässä.

34. Ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat voidaan määrittää keltarauhasten ja kiinnittyneiden alkioiden määrän välisenä erotuksena tai kiinnittymisten keskimäärän vähenemisenä naarasta kohden kontrolliryhmän parittelutuloksiin verrattuna. Jos ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat on arvioitu, tämä on ilmoitettava.

35. Dominoiva letaalikerroin arvioidaan näin: (kiinnittymisen jälkeiset alkiokuolemat / kiinnittymisten kokonaismäärä naarasta kohti) × 100.

36. Tiedot toksisuudesta ja kliinisistä oireista (29 kohdan mukaisesti) on ilmoitettava.

Hyväksymisperusteet

37. Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

— Samanaikainen negatiivinen kontrolli on aikaisempia negatiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien ja laboratorion aiempien kontrollitietojen (jos niitä on saatavilla) mukainen (ks. 10 ja 18 kohta).

— Samanaikaiset positiiviset kontrollit aiheuttavat vasteita, jotka ovat aikaisempia positiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien tai laboratorion aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan (jos saatavilla) mukaisia, ja niiden tuottama kasvu on tilastollisesti merkitsevä negatiiviseen kontrolliin verrattuna (17 ja 18 kohta).

— Asianmukainen määrä kiinnittymisiä ja annoksia on analysoitu (20 kohta).

— Suurimman annoksen valintaperusteet vastaavat 24 ja 27 kohdassa kuvattuja perusteita.

Tulosten arviointi ja tulkinta

38. Vähintään kolmea annosryhmää on analysoitava, jotta saadaan riittävästi tietoa annos-vastesuhdetta koskevaa analyysia varten.

39. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

— ainakin yksi testiannoksista ilmentää tilastollisesti merkitsevää kasvua samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna

— kasvu riippuu annoksesta vähintään yksissä testiolosuhteissa (esimerkiksi viikon välein tapahtuva parittelu), kun sitä arvioidaan asianmukaisella testillä sekä

— mikä tahansa tuloksista on negatiivisten kontrollitietojen jakauman tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja), jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin testikemikaalin katsotaan pystyvän aiheuttamaan dominoivia letaalimutaatioita koe-eläinten itusoluissa. Suosituksia sopivimmista tilastomenetelmistä on 44 kohdassa; muita suositeltuja tilastollisia lähestymistapoja on myös lähdekirjallisuudessa (20) (21) (22) (24) (29). Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on pidettävä eläintä.

40. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, mikäli:

— mikään testiannoksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— annoksesta riippuvaista kasvua ei esiinny missään testiolosuhteissa ja

— kaikki tulokset ovat negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja) mukaisia, jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali pysty aiheuttamaan dominoivia letaalimutaatioita koe-eläinten itusoluissa.

41. Selvästi positiivista tai selvästi negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

42. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esimerkiksi heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava kasvu), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai olemassa olevaan kokeelliseen tietoon perustuvissa lisätutkimuksissa, joissa esimerkiksi arvioidaan, onko positiivinen tulos negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen hyväksyttävän jakauman ulkopuolella (30).

43. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Niitä pidetään tästä syystä epäselvinä tapauksina.

44. Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on pidettävä urospuolista eläintä. Vaikka on mahdollista, että lukumääräaineisto (esimerkiksi kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti) voi noudattaa Poissonin jakaumaa ja/tai osuudet (esimerkiksi kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus) voivat noudattaa binomijakaumaa, tällaisissa tiedoissa voi kuitenkin usein olla ylihajontaa (31). Sen vuoksi tilastollisessa analyysissa tulisi ensin tehdä yli- tai alihajontatesti käyttämällä varianssitestejä, kuten Cochranin binomiaalisen vaihtelun testiä (32) tai ylihajontaa koskevaa Taronen C(α)-testiä (31) (33). Jos poikkeamaa binomijakaumasta ei havaita, osuuksien trendejä kaikilla annostasoilla voidaan testata käyttämällä Cochran-Armitagen trenditestiä (34). Parivertailuja kontrolliryhmään voidaan testata Fisherin tarkalla testillä (35). Samalla tavoin jos poikkeamaa Poissonin jakaumasta ei havaita, lukumäärien trendejä voidaan testata käyttämällä Poissonin regressiota (36). Parivertailuja kontrolliryhmään voidaan testata Poissonin mallin yhteydessä käyttämällä parittaisia kontrasteja (36). Jos merkittävää yli- tai alihajontaa havaitaan, suositellaan käytettävän parametrittomia menetelmiä (23) (31). Niitä ovat esimerkiksi järjestykseen perustuvat testit, kuten Jonckheere-Terpstran trenditesti (37) ja Mann-Whitneyn testit (38) parivertailuista kantaja-aine-/liuotinkontrolliryhmän kanssa sekä permutaatio-, uudelleenotanta- tai bootstraptestit trendi- ja parivertailuihin kontrolliryhmän kanssa (31) (39).

45. Positiivisesta dominoivien letaalivaikutusten testistä saadaan näyttöä testikemikaalin genotoksisuudesta testieläinlajin altistetun uroksen itusoluille.

46. Vasteen biologisen merkityksellisyyden arvioinnissa apua voi olla sen tarkastelemisesta, ovatko havaitut arvot aikaisemman kontrollivaihteluvälin sisällä vai sen ulkopuolella (40).

Testiraportti

47. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Yhteenveto

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus soluviljelmän kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus:

— perustelut kantaja-aineen valinnalle

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiilisuus liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisuus, nimellispitoisuudet), kun niitä käytetään.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— eläinten yksilöintimenetelmä

— lyhytkestoiset tutkimukset: kunkin urospuolisen eläimen paino testin alkaessa ja päättyessä yli viikon kestävät tutkimukset: yksilölliset painot tutkimuksen aikana ja ravinnon kulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— annosalueen määritystutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— antotavan valintaperusteet

— eläimille aiheutuneiden myrkyllisten vaikutusten mittaamista koskevat menetelmät, tarvittaessa myös histopatologiset tai hematologiset analyysit, ja tiedot siitä, kuinka usein eläimiä koskevat havainnot tehtiin ja eläimet punnittiin

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali kulkeutui kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohdat häkkien virikkeellisestä ympäristöstä

— yksityiskohtaiset tiedot altistus- ja näytteenottoaikataulusta ja perustelut valinnoille

— kivunlievitysmenetelmät

— lopettamistapa

— kudosten eristämis- ja säilömismenetelmät

— kaikkien mittaussarjojen ja reagenssien lähde ja eränumerot (tarvittaessa)

— dominoivien letaalivaikutusten laskentamenetelmät

— paritteluaikataulu

— parittelun toteamistapa

— eläimen lopetusajankohta

— dominoivien letaalivaikutusten pisteytysperusteet (keltarauhaset, kiinnittyneet alkiot, resorptiot ja ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat sekä elävät ja kuolleet kiinnittyneet alkiot).

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana sekä toksisuusoireet

— uroksen paino altistus- ja parittelujaksojen aikana

— paritelleiden naaraiden lukumäärä

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisen ja aikaisemman negatiivisen kontrollin tiedot, joihin sisältyvät vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonta

— samanaikaisen positiivisen kontrollin tiedot

— taulukoidut tiedo t jokaisesta naaraasta: keltarauhasten lukumäärä naarasta kohti kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti resorptioiden ja ennen kiinnittymistä tapahtuneiden alkiokuolemien lukumäärä naarasta kohti elävien kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti sikiöiden painot

— yhteenveto edellä kuvatuista tiedoista jokaiselta parittelujaksolta ja jokaisesta annoksesta sekä tiedot dominoivista letaalitaajuuksista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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.) s. 235–334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., 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, s. 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 Acute Inhalation Toxicity Testing. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 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. Teoksessa *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), s. 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali: Aine tai seos

Keltarauhanen (-rauhaset): Munasarjaan munasolun irtoamisen jälkeen munarakkulan tilalle muodostuva hormonia erittävä rakenne. Munasarjoissa olevien keltarauhasten määrä vastaa irronneiden munasolujen määrää.

Dominoiva letaalimutaatio: Itusolussa esiintyvä tai siihen hedelmöittymisen jälkeen kiinnittyvä mutaatio, joka aiheuttaa sikiö- ja alkiokuolemia.

Hedelmällisyysluku: Paritelleiden tiineiden naaraiden lukumäärä paritelleiden naaraiden lukumäärään nähden.

Parittelujakso: Altistettujen urosten altistuksen päättymisen ja parittelun välinen aika. Tätä jaksoa seuraamalla voidaan arvioida kemikaalien vaikutuksia erityyppisiin itusoluihin. Hiirten paritellessa viikoilla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ja 8 altistuksen päättymisen jälkeen havaittiin vaikutuksia spermassa, kondensoituneissa spermatideissä, pyöreätumaisissa spermatideissä, pakyteenivaiheen spermatideissä, varhaisvaiheen spermatosyyteissä, erilaistuneissa spermatogonioissa, erilaistuvissa spermatogonioissa ja kantasoluista muodostuvissa spermatogonioissa.

Ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat: Kiinnittyneiden alkioiden määrän ja keltarauhasten määrän välinen erotus. Se voidaan arvioida myös vertailemalla kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärää yhtä naarasta kohti testi- ja kontrolliryhmissä.

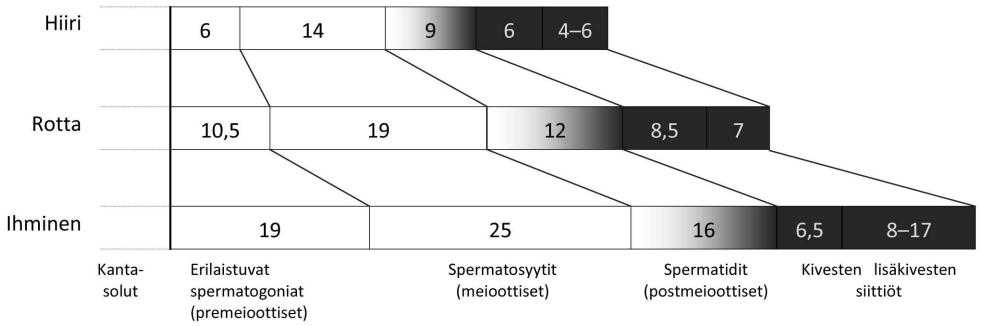
Kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet alkiokuolemat: Kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärästä testiryhmässä verrattuna vastaavaan osuuteen kontrolliryhmässä.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

Lisäys 2

SPERMATOGENEESIN AJOITUS NISÄKKÄILLÄ



Kuva 1: Vertailu hiirien, rottien ja ihmisten miespuolisten itusolujen kehityksen kestosta (päivinä). DNA:n korjausta ei tapahdu varjostuksella korostetuilla ajanjaksoilla.

Yllä on esitetty kaaviokuva hiiren, rotan ja ihmisen spermatogeneesistä (lähde: Adler, 1996). Erilaistumattomia spermatogonioita ovat yksittäiset A-spermatogoniat, parilliset A-spermatogoniat (Apr) ja ketjuttuneet (Aal) spermatogoniat (Hess ja de Franca, 2008). Varsinaisina kantasoluina pidetään yksittäisiä A-spermatogonioita. Jotta kantasoluihin kohdistuvia vaikutuksia voidaan arvioida, viimeisen testikemikaali-injektion ja parittelun välissä on oltava vähintään 49 päivää (hiirellä).

Viitteet

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. Teoksessa: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1–15.”

4) Korvataan B osassa oleva B.23 luku seuraavasti:

"B.23 **NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 483 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Tämä muokattu versio testimenetelmästä perustuu useiden vuosien kokemukseen tästä testistä ja mahdollisuuteen liittää tai yhdistää tämä testi muihin toksisuus- tai genotoksisuustesteihin. Kun toksisuustestejä yhdistetään, niissä voidaan mahdollisesti käyttää tavallista vähemmän koe-eläimiä. Tämä testimenetelmä kuuluu geneettisen toksikologian testimenetelmiin. OECD on laatinut asiakirjan (1), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Tämän nisäkkäiden spermatogonioilla tehtävän *in vivo* -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa kemikaalit, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia nisäkkäiden spermatogoniaalisissa soluissa (2) (3) (4). Lisäksi tämä testi on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat vaikuttaa vasteisiin. Tätä testimenetelmää ei ole suunniteltu mittaamaan numeerisia poikkeavuuksia; testiä ei käytetä siihen tavanomaisesti.

3. Tämä testi mittaa (sekä kromosomi- että kromatidityyppisiä) rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia jakautuvissa spermatogoniaalisissa itusoluissa, joten sen odotetaan voivan ennustaa itusolujen periytyvien mutaatioiden kehittymistä.

4. Keskeisten termien määritelmät esitetään liitteessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Tässä testissä käytetään yleensä jyrsijöitä, mutta muut lajit voivat olla joissain tapauksissa sopivia, jos niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua. Jyrsijätestien sytogeneettiset vakiovalmisteet aiheuttavat mitoottisia (spermatogoniat) ja meioottisia (spermatosyytit) metafaaseja. Mitoottiset ja meioottiset metafaasit määritetään kromosomien morfologian perusteella (4). Tämä *in vivo* -sytogeneettinen testi paljastaa rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet spermatogonioiden mitooseissa. Tällä menetelmällä ei tutkita muita kohdesoluja.

6. Spermatogoniaalisten solujen kromatidityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on tutkittava ensimmäistä mitoottista solunjakautumista altistuksen jälkeen, ennen kuin nämä poikkeavuudet häviävät myöhemmissä solunjakautumisissa. Altistetuista spermatosyyteistä voidaan saada lisätietoja tekemällä meioottisia kromosomianalyysejä kromosomityyppisten rakenteellisten poikkeavuuksien toteamiseksi diakineesi-metafaasi I:ssä ja metafaasi II:ssa.

7. Kiveksissä on yhtaikaa monia spermatogonioiden sukupolvia (5), ja näiden erilaisten itusolutyyppien herkkyys kemiallisten aineiden vaikutuksille voi vaihdella. Havaitut poikkeavuudet edustavat siis altistettujen spermatogoniaalisten solupopulaatioiden yhdistettyä vastetta. Suurin osa kivespreparaattien mitoottisista soluista ovat B-spermatogonioita, joiden solukierto on noin 26 tuntia (3).

8. Jos on näyttöä siitä, että testikemikaali tai sen metaboliitti ei (metaboliitit eivät) pääse kiveksiin, tätä testiä ei pidä käyttää.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

9. Eläimet altistetaan testikemikaalille soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esimerkiksi kolkisiinia tai Colcemidia®). Tämän jälkeen itusoluista valmistetaan kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevista soluista analysoidaan kromosomipoikkeavuudet.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

10. Tämän testin pätevyys on varmistettava osoittamalla, että sillä voidaan tuottaa uudestaan odotuksenmukaiset tulokset spermatogonioiden rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien taajuuksista esimerkiksi taulukossa 1 lueteltuja positiivisia kontrolliaineita käyttäen (mukaan luettuina heikot vasteet) ja saada sellaisia negatiivisten kontrollien taajuuksia, jotka ovat julkaistussa kirjallisuudessa esitettyjen kontrollitietojen hyväksyttävyysalueen mukaisia (esimerkiksi (2) (3) (6) (7) (8) (9)(10)) tai laboratorion aikaisemman kontrollijakauman mukaisia, jos se on saatavilla.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläinlajin valinta

11. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Yleensä käytetään uroshiiriä, mutta myös muiden soveltuvien nisäkäslajien uroksia voidaan käyttää, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos tämä testi on tarkoitus tehdä yhdessä jonkin toisen testimenetelmän kanssa. Raportissa on esitettävä tieteelliset perustelut muiden lajien kuin jyrsijöiden käytölle.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

12. Jyrsijöiden kohdalla koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa se, miten siihen voidaan sekoittaa sopiva määrä testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Jyrsijät on sijoitettava pienryhmiin (enintään viisi eläintä häkkiä kohti), ellei aggressiivista käyttäytymistä ole odotettavissa, mieluiten kiinteisiin lattiahäkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

13. Yleensä käytetään terveitä, nuoria ja täysikasvuisia uroseläimiä (8–12 viikon ikäiset käsittelyn alkaessa), jotka jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmiin. Eläimet merkitään yksilöllisesti inhimillisellä, mahdollisimman vähän invasiivisella toimenpiteellä (esimerkiksi rengastamalla, korvamerkillä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnisteella, mutta ei korvia tai varpaita leikkaamalla), ja niitä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 %.

Annosten valmistelu

14. Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitysteiden kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet - liuotin/kantaja-aine

15. Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttö saa aiheuttaa mahdollisia kemiallisia reaktioita testikemikaalien kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosan suolaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy. Jos ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja siitä, ettei valittu epätyypillinen liuotin/kantaja-aine aiheuta rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, on tehtävä alustava tutkimus, jolla voidaan määrittää liuotin-/kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys.

Positiiviset kontrollit

16. Samanaikaisia positiivisia kontrollieläimiä on käytettävä aina, ellei laboratorio ole osoittanut pätevyyttään testin tekemisessä ja ellei se ole käyttänyt testiä rutiininomaisesti viime aikoina (esimerkiksi viiden viime vuoden aikana). Jos samanaikaista positiivisen kontrollin ryhmää ei ole, kuhunkin kokeeseen on sisällytettävä pisteytyskontrollit (kiinteät ja värjätyt objektilasit). Nämä voidaan saada sisällyttämällä tutkimuksen pisteytykseen asianmukaiset vertailunäytteet, jotka on saatu erillisestä määräajoin (esimerkiksi 6–18 kuukauden välein) tehtävästä positiivisen kontrollin kokeesta ja joita säilytetään laboratoriossa, jossa koe tehdään, esimerkiksi pätevyyden testaamisen aikana ja säännöllisesti sen jälkeen, jos tarpeen.

17. Positiivisten kontrolliaineiden pitäisi luotettavasti tuottaa havaittavaa lisääntymistä rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuuksissa spontaanitasoihin verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti laskijoille koodattujen näytteiden identiteettiä. Taulukossa 1 on esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista

Aineet [CAS-numero] (viitenro)
Syklofosfamidi (monohydraatti) [CAS-nro 50-18-0 (CAS-nro 6055-19-2)] (9)
Sykloheksylamiini [CAS-nro 108-91-8] (7)
Mitomysiini C [CAS-nro 50-07-7] (6)
Monomeerinen akryyliamidi [CAS 79-06-1] (10)
Trietyleenimelamiini [CAS-nro 51-18-3] (8)

Negatiiviset kontrollit

18. Negatiivisia kontrollieläimiä, joille annetaan pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita käsitellään muuten samalla tavalla kuin testiryhmiä, on sisällytettävä kuhunkin näytteenottokertaan. Jos käytettävissä ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja, joissa osoitetaan, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta kromosomipoikkeavuuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, kullakin näytteenottokerralla olisi käytettävä myös altistamattomia kontrollieläimiä, jotta kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys voidaan todeta.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä

19. Tutkimuksen alussa ryhmien koot pitäisi valita niin, että yhdessä ryhmässä on vähintään viisi urospuolista eläintä. Tätä ryhmäkohtaista eläinmäärää pidetään asianmukaisen tilastollisen voiman tuottamisen kannalta riittävänä (ts. jotta testissä voidaan yleensä havaita vähintään kromosomipoikkeavuuksien esiintymistaajuuden kaksinkertaistuminen, kun negatiivinen kontrollitaso on 1,0 tai suurempi ja kun todennäköisyys on 80 prosenttia ja merkitsevyystaso 0,05) (3) (11). Eläinten tyypillisen enimmäismäärän osalta voidaan todeta ohjeellisesti, että tutkimuksessa, jossa on kaksi näytteenottokertaa, kolme annosryhmää ja samanaikainen negatiivinen kontrolliryhmä sekä positiivinen kontrolliryhmä (kussakin ryhmässä on viisi eläintä), tarvitaan 45 eläintä.

Altistusohjelma

20. Testikemikaaleja annetaan yleensä kerran (ts. kerta-altistuksena); myös muita annosteluohjelmia voidaan käyttää, jos se on tieteellisesti perusteltua.

21. Suurinta annosta saavassa ryhmässä käytetään kahta näytteenottokertaa altistuksen jälkeen. Koska testikemikaali(e)n soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solukierron kinetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, on otettava yksi varhainen näyte 24 tunnin kuluttua ja toinen myöhempi näyte 48 tunnin kuluttua altistuksesta. Muiden annosten kuin suurimman annoksen osalta on noudatettava aikaisempaa näytteenottoaikaa eli 24:ää tuntia (joka on lyhyempi tai yhtä pitkä kuin B-spermatogonioiden solukiertoaika, jolloin ensimmäisten altistuksen jälkeisten metafaasien arvioimisen todennäköisyys on optimaalinen) altistuksen jälkeen, ellei jonkin toisen näytteenottoajan tiedetä olevan asianmukaisempi ja perustellumpi.

22. Myös muita näytteenottoaikoja voidaan käyttää. Varhaisemmat näytteenottoajat (esimerkiksi alle 24 tuntia) saattavat olla asianmukaisia esimerkiksi sellaisten kemikaalien yhteydessä, joilla voi olla S-vaiheesta riippumattomia vaikutuksia.

23. Myös toistuvan annoksen altistusohjelmaa voidaan käyttää esimerkiksi sellaisen toista päätetapahtumaa koskevan testin yhteydessä, jossa käytetään 28 päivän annosteluohjelmaa (esimerkiksi testimenetelmä B.58). Tällöin tarvitaan kuitenkin lisää eläinryhmiä eri näytteenottoaikojen vuoksi. Tällaisen ohjelman asianmukaisuus on kuitenkin perusteltava tieteellisesti ja tapauskohtaisesti.

24. Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos kemikaalia, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esimerkiksi Colcemidia® tai kolkisiinia). Elämistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä ja rotilla tämä väli on noin 3–5 tuntia.

Annostasot

25. Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska muista tutkimuksista ei ole saatavilla soveltuvia tietoja, jotka auttaisivat annoksen valinnassa, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää, annoksenmääritystutkimusta koskevien suositusten mukaisesti (12). Tässä tutkimuksessa pitäisi pyrkiä määrittämään suurin siedetty annos (MTD-arvo) eli annos, joka aiheuttaa lievästi toksisen vaikutuksen suhteessa tutkimusjakson kestoon (esimerkiksi epänormaalia käytöstä tai reagointia, vähäistä painonlaskua tai hematopoieettisen järjestelmän sytotoksisuutta), mutta ei kuolemaa tai merkkejä kivusta, kärsimyksestä tai stressistä, joka edellyttäisi eläinten lopettamista (13).

26. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin toksisuuteen viittaavia muutoksia spermatogoniaalisissa soluissa (esimerkiksi spermatogonioiden mitoosien osuus ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin nähden pienenee). Tämä pieneneminen saa olla enintään 50 prosenttia.

27. Kemikaalit, joilla on tiettyjä biologisia vaikutuksia pieninä myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), ja kemikaalit, joissa esiintyy toksikokineettisten ominaisuuksien saturaatiota, voivat olla annoksen määrittämistä koskevien kriteerien osalta poikkeustapauksia, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

28. Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivinen kontrolliryhmä (18 kohta) ja vähintään kolme annostasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2 mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuusvaikutusta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurin annos kerta-annostelulle pitäisi olla 2 000 mg/painokilo. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuutta, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla suurin annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, joka aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan toksisuutta. Kun kohdekudoksessa (ts. kiveksissä) havaitaan toksisuutta kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä täydentävä tutkimus myrkyttömillä annoksilla. Tutkimukset, joiden tarkoituksena on kuvata täydellisesti määrällisiä annos-vastetietoja, voivat vaatia täydentäviä annosryhmiä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyntyyppisten testikemikaalien osalta (esimerkiksi ihmisten lääkkeet), jotka kuuluvat erityisvaatimusten piiriin. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuutta, on valittava raja-annos ja kaksi pienempää annosta (edellä kuvatun mukaisesti). Vähintään 14 päivän mittaisen altistusjakson raja-annos on 1 000 mg painokiloa kohti päivässä. Jos altistusjakso on vähemmän kuin 14 päivää, raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti päivässä.

Antotapa

29. Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi altistusreitiksi voidaan perustellusti valita esimerkiksi ravinto tai juomavesi, topikaalinen ihonalainen, suonensisäinen tai oraalinen (letkuruokinta) reitti, hengitystiet taikka implantaatio. Joka tapauksessa reitti on valittava siten, että voidaan varmistaa kohdekudosten asianmukainen altistuminen. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, ellei se ole tieteellisesti perusteltua, sillä se ei ole ihmisen altistumisen kannalta fysiologisesti merkittävä altistumisreitti. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on yhdestä annoksesta, vaikutuksien havaitsemiseksi on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden kulutuksen ja näytteenoton välillä on riittävä (ks. 33 kohta). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Yleensä määrä saa olla enintään 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäismäärä voi olla 2 ml/100 g. Tätä suurempien määrien käyttö (jos eläinsuojelulainsäädäntö sen sallii) on perusteltava. Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta, jotta varmistetaan, että tilavuus on painoon nähden sama kaikilla annostasoilla.

Havainnot

30. Koe-eläimistä tulee tehdä yleisiä kliinisiä havaintoja ja niiden kliinisiä oireita tulee kirjata vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä, ja tässä on otettava huomioon, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa ja lopetettaessa. Vähintään viikon kestävissä tutkimuksissa ravinnonkulutuksen mittaus on tehtävä vähintään viikoittain. Jos testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutus on mitattava veden vaihdon yhteydessä tai vähintään kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta toksisuudesta, olisi lopetettava ennen tutkimusjakson päättymistä (13).

Kromosomipreparaattien valmistus

31. Heti eläinten lopettamisen jälkeen toisesta kiveksestä tai molemmista kiveksistä otetaan itusolususpensioita, jotka pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan vahvistettujen menettelyjen mukaisesti (esimerkiksi (2) (14) (15)). Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään (16) (17). Kaikki lasit on koodattava siten, ettei laskija tiedä niiden identiteettiä.

Analyysi

32. Jokaisesta eläimestä on laskettava vähintään 200 hyvin levinnyttä metafaasia (3) (11). Jos aikaisempien negatiivisten kontrollien taajuus on < 1 %, on laskettava yli 200 solua eläintä kohti tilastollisen voiman kasvattamiseksi (3). On käytettävä sellaisia värjäysmenetelmiä, joiden yhteydessä sentromeeri voidaan tunnistaa.

33. Kromosomi- ja kromatidityyppiset poikkeavuudet on kirjattava erikseen ja luokiteltava alatyypin mukaan (katkeamiset, vaihdokset). Määritettäessä, aiheuttaako kemikaali sellaisten solujen lisääntymistä, joissa on kromosomipoikkeavuuksia, on kirjattava aukot, mutta niitä ei tarvitse ottaa huomioon. Laboratoriossa käytettävillä menettelyillä on varmistettava, että kromosomipoikkeavuuksien analyysin tekevät hyvin koulutetut laskijat. Koska objektilasien valmistelu johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja siten kromosomien häviämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua $2n \pm 2$, jossa n on kyseisen lajin haploidinen kromosomiluku.

34. Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidisten ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen esiintymistaajuudet, mikäli näitä esiintyy (ks. 44 kohta).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

35. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot on esitettävä taulukossa. Jokaisesta eläimestä on arvioitava rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien lukumäärä solua kohti. Alatyyppeihin luokitellut kromatidi- ja kromosomityyppiset poikkeavuudet (katkeamiset, vaihdokset) on lueteltava erikseen, ja niiden lukumäärät ja esiintymistaajuudet testi- ja kontrolliryhmissä on mainittava. Aukot kirjataan erikseen. Aukkojen esiintymistaajuus ilmoitetaan, mutta sitä ei yleensä sisällytetä rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuden analyysiin. Polyploidian ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen prosenttiosuus ilmoitetaan, jos näitä havaitaan.

36. Tiedot toksisuudesta ja kliinisistä oireista (30 kohdan mukaisesti) on ilmoitettava.

Hyväksymisperusteet

37. Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

— Samanaikainen negatiivinen kontrolli on aikaisempia negatiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien (joiden mukaan yleensä odotetaan, että > 0 ja ≤ 1,5 prosentissa soluista on kromosomipoikkeavuuksia) ja laboratorion aiempien kontrollitietojen (jos niitä on saatavilla) mukainen (ks. 10 ja 18 kohta).

— Samanaikaiset positiiviset kontrollit aiheuttavat vasteita, jotka ovat aikaisempia positiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien tai laboratorion aiempien positiivisten kontrollien tietokannan (jos saatavilla) mukaisia, ja niiden tuottama kasvu on tilastollisesti merkitsevä negatiiviseen kontrolliin verrattuna (ks. 17 ja 18 kohta).

— Soluja ja annoksia on analysoitu riittävät määrät (ks. 28 ja 32 kohta).

— Suurimman annoksen valintaperusteet vastaavat 25 ja 26 kohdassa kuvattuja perusteita.

38. Jos havaitaan sekä mitoosia että meioosia, spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on määritettävä sytotoksisuuden mittana kaikista altistetuista eläimistä ja negatiivisista kontrollieläimistä yhteensä 100 jakautuvan solun näytteestä eläintä kohti. Jos tarkastellaan ainoastaan mitoosia, mitoosi-indeksi on määritettävä vähintään 1 000 solusta jokaista eläintä kohti.

Tulosten arviointi ja tulkinta

39. Vähintään kolmea annosryhmää on analysoitava, jotta saadaan riittävästi tietoa annos-vastesuhdetta koskevaa analyysia varten.

40. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

— ainakin yksi testiannoksista ilmentää tilastollisesti merkitsevää kasvua samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna

— kasvu riippuu annoksesta ainakin yhdellä näytteenottokerralla sekä

— mikä tahansa tuloksista on aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja), jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin testikemikaalin katsotaan pystyvän aiheuttamaan kromosomipoikkeavuuksia koe-eläinten spermatogoniaalisissa soluissa. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia myös sopivimmista tilastomenetelmistä (11) (18). Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on pidettävä eläintä.

41. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, mikäli:

— mikään testiannoksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— annoksesta riippuvaista kasvua ei esiinny missään testiolosuhteissa sekä

— kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja) mukaisia, jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali pysty aiheuttamaan kromosomipoikkeavuuksia koe-eläinten spermatogoniaalisissa soluissa. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia myös sopivimmista tilastomenetelmistä (11) (18). Negatiivinen tulos ei sulje pois mahdollisuutta, että kemikaali saattaa aiheuttaa kromosomipoikkeavuuksia myöhemmissä kehitysvaiheissa, joita ei ole tutkittu, tai geenimutaatioita.

42. Selvästi positiivista tai selvästi negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

43. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esimerkiksi heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava kasvu), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai olemassa olevaan kokeelliseen tietoon perustuvissa lisätutkimuksissa, joissa esimerkiksi arvioidaan, onko positiivinen tulos negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen hyväksyttävän jakauman ulkopuolella (19).

44. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Niitä pidetään tästä syystä epäselvinä tapauksina.

45. Polyploidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaalilla pystytään estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia (20). Endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaali kykenee estämään solukierron etenemisen (21) (22), joka on erilainen numeerisia kromosomimuutoksia aiheuttava mekanismi kuin mitoottisten prosessien estäminen (ks. 2 kohta). Siksi polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut on kirjattava erikseen.

Testiraportti

46. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Yhteenveto.

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus soluviljelmän kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus:

— perustelut kantaja-aineen valinnalle

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulaatioiden analyyttiset määritykset (esimerkiksi stabiilius, homogeenisuus, nimellispitoisuudet), jos ne on tehty.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen käytölle

— eläinten määrä ja ikä

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— eläinten yksilöintimenetelmä

— lyhytkestoiset tutkimukset: kunkin eläimen paino testin alkaessa ja päättyessä yli viikon kestävät tutkimukset: yksilölliset painot tutkimuksen aikana ja ravinnon kulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— mahdollisen raja-annostutkimuksen tulokset

— annostason valintaperusteet

— antoreitin valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— eläinten lopettamisajankohtien perustelut

— eläimille aiheutuneiden myrkyllisten vaikutusten mittaamista koskevat menetelmät, tarvittaessa myös histopatologiset tai hematologiset analyysit, ja tiedot siitä, kuinka usein eläimiä koskevat havainnot tehtiin ja eläimet punnittiin

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali kulkeutui kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näytteenottoaikataulusta ja perustelut valinnoille

— lopettamistapa

— kivunlievitysmenetelmä (jos sitä on käytetty)

— kudosten eristämismenetelmät

— metafaasin pysäyttämisessä käytetty kemikaali, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto

— objektilasien valmistusmenetelmät

— kromosomipoikkeavuuksien laskentaperusteet

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana sekä toksisuusoireet

— ruumiin ja elinten painot lopetuksen yhteydessä (jos kyse on useammasta altistuksesta, ruumiinpaino punnitaan altistusohjelman aikana)

— toksisuuden merkit

— mitoosi-indeksi

— spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäisiin ja toisiin meioottisiin metafaaseihin tai muut todisteet kohdekudoksen altistumisesta

— kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

— samanaikaisten negatiivisten kontrollien tiedot

— aikaisemmat negatiivisten kontrollien tiedot, vaihteluvälit, keskiarvot, keskihajonnat ja 95 prosentin luottamusväli (jos saatavilla) tai testitulosten hyväksyttävyyden arvioinnissa käytetyt julkaistut tiedot aikaisemmista negatiivisista kontrolleista

— samanaikaisen positiivisen kontrollin tiedot

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy, myös polyploidian ja/tai endoreduplikoituneiden solujen esiintymistaajuudet.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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. Teoksessa: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington D.C., s. 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. Teoksessa: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, s. 1–15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368–379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Teoksessa: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, s. 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, teoksessa: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommitte on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, teoksessa: 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, s. 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.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Aneuploidia: Yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Sentromeeri: Kromosomin alue (alueet), johon (joihin) sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Kemikaali: Aine tai seos

Kromosomien diversiteetti: Kromosomien muotojen (esimerkiksi metasentrinen, akrosentrinen jne.) ja kokojen diversiteetti.

Kromatidipoikkeavuus: Rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: Rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Klastogeeni: Mikä tahansa kemikaali, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solupopulaatioissa tai organismeissa.

Aukko: Akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Genotoksinen: Yleisnimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamisille, deleetioille, addukteille, nukleotidien muutoksille ja sidoksille, uudelleenjärjestäytymisille, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Mitoosi-indeksi (MI): Suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mitoosi: Solutuman jakautuminen, joka jaetaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mutageeninen: Aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa (-rakenteissa) tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Numeerinen poikkeavuus: Testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: Haploidisen kromosomimäärän (*n*) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (3*n*, 4*n* jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: Kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina, fragmentteina ja vaihdoksina.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali”

5) Korvataan B osassa oleva B.40 luku seuraavasti:

"B.40. ***IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYS -TESTIMENETELMÄ (TER)**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 430 (2015). Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan pysyvän ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantumista testiaineen annostelun jälkeen [Yhdistyneiden kansakuntien yhdenmukaistetussa kemikaalien luokittelu- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti]. Tässä päivitetyssä testimenetelmässä B.40 kuvataan in vitro -menetelmä, jolla voidaan tunnistaa syövyttämättömät ja syövyttävät aineet ja seokset YK:n GHS-järjestelmän (1) ja

2. Ihosyövyttävyyden arvioinnissa on yleensä käytetty koe-eläimiä (testimenetelmä B.4, joka vastaa OECD:n testiohjetta 404, hyväksytty ensimmäisen kerran 1981 ja tarkistettu 1992, 2002 ja 2015) (2). Nykyisen testimenetelmän B.40 lisäksi muita kemikaalien ihosyövyttävyyspotentiaalin testaamiseen validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro* -testimenetelmiä ovat testimenetelmät B.40 a (vastaa OECD:n testiohjetta 431) (3) ja B.65 (vastaa OECD:n testiohjetta 435) (4). Myös näillä menetelmillä voidaan tarvittaessa tunnistaa syövyttävien kemikaalien alakategorioita. Useita validoituja *in vitro* -testimenetelmiä on hyväksytty testimenetelmäksi B.46 (vastaa OECD:n testiohjetta 439) (5), jota voidaan käyttää ihoärsytyksen testaukseen. Ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja sisältävässä OECD:n ohjeasiakirjassa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty erilaisia tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan ohjeita siitä, i) miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen (6).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihosyövyttävyyttä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Kyseessä on rotan ihon sähkövastukseen perustuva testimenetelmä. Siinä käytetään ihonäytteitä tunnistamaan syövyttäviä aineita, jotka pystyvät tuhoamaan normaalin marraskeden eheyden ja läpäisynestokyvyn. Vastaava OECD:n testiohje hyväksyttiin alun perin vuonna 2004, ja sitä päivitettiin vuonna 2015 ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjen lähestymistapojen mukaiseksi.

4. Sääntelytarkoituksiin käytettävien in vitro -ihosyövyttävyystestien arvioimiseksi tehtiin validointia edeltäviä tutkimuksia (7), joiden jälkeen tehtiin virallinen validointitutkimus ihosyövyttävyyden arvioinnissa käytettävästä rotan ihon sähkövastusmääritykseen perustuvasta testimenetelmästä (8) (9) (10) (11). Näiden tutkimusten tulosten perusteella annettiin suositus, jonka mukaan sähkövastusmääritysmenetelmää (joka on nimetty validoiduksi vertailumenetelmäksi) voidaan käyttää sääntelytarkoituksissa *in vivo* -ihosyövyttävyyden arviointiin (12) (13) (14).

5. Ennen kuin sääntelytarkoituksissa voidaan käyttää muuta ihosyövyttävyyden arviointiin ehdotettua samankaltaista tai muutettua *in vitro* -sähkövastusmääritysmenetelmää kuin validoitua vertailumenetelmää, on selvitettävä ehdotetun menetelmän luotettavuus, merkityksellisyys (tarkkuus) ja sen ehdotetun käytön rajoitukset, jotta voidaan varmistua siitä, että se on samanlainen kuin validoitu vertailumenetelmä, suoritusvaatimusten mukaisesti (15). OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä taataan vasta, kun ehdotettu uusi tai päivitetty suoritusvaatimusten mukainen testimenetelmä on tarkistettu ja sisällytetty OECD:n vastaavaan testiohjeeseen.

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Validointitutkimuksessa (10) ja muissa julkaistuissa tutkimuksissa (16) (17) on todettu, että rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmällä pystytään erottelemaan tunnetut ihoa syövyttävät ja syövyttämättömät aineet siten, että 122 ainetta sisältävän tietokannan osalta kokonaisherkkyys on 94 prosenttia (51/54) ja spesifisyys 71 prosenttia (48/68).

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1, mukaisesti.

8. Tällä testimenetelmällä tarkastellaan ihosyövyttävyyttä *in vitro*. Sen perusteella voidaan tunnistaa syövyttämättömiä ja syövyttäviä testikemikaaleja YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti. Validointitutkimuksissa (8) (9) (10) (11) osoitetun mukaisesti tämän testimenetelmän rajoitus on kuitenkin se, ettei sillä voida luokitella syövyttäviä aineita ja seoksia YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisiin alaluokkiin. Siitä, miten tätä testimenetelmää käytetään, määrätään sovellettavassa sääntelykehyksessä. Tällä testimenetelmällä ei saada asianmukaista tietoa ihoärsytyksestä, mutta testimenetelmä B.46 koskee nimenomaan terveysvaikutusta ihoärsytys *in vitro* (5). Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (6).

9. Tämän testimenetelmän perusteena olevassa validointitutkimuksessa on testattu laaja joukko kemikaaleja, jotka ovat pääasiassa aineita, ja validointitutkimuksen empiirinen tietokanta sisälsi 60 ainetta, jotka kuuluvat hyviin moniin kemikaaliluokkiin (8) (9). Kaikkien saatavilla olevien tietojen perusteella tätä testimenetelmää voidaan soveltaa hyvin moniin kemikaaliluokkiin ja aineiden fysikaalisiin olomuotoihin, myös nesteisiin, puolikiinteisiin ja kiinteisiin aineisiin sekä vahamaisiin aineisiin. Koska tiettyjen testiaineiden fysikaalisten olomuotojen testauksesta ei ole vielä saatavilla sopivia vertailutietoja, on syytä mainita, että validoinnissa arvioitiin melko pieni määrä vahoja ja syövyttäviä kiinteitä aineita. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Jos voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen aineluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Sen ohella, että tämä testimenetelmä soveltuu aineiden testaamiseen, sen oletetaan soveltuvan myös seosten testaamiseen. Koska seokset kattavat laajan joukon luokkia ja koostumuksia ja koska seosten testaamisesta on tällä hetkellä saatavilla vain vähän tietoa, niissä tapauksissa, joissa voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen aineluokkien kanssa (esimerkiksi Eskesin ja muiden (2012) ehdottaman strategian mukaisesti (18)), testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksissa (8) (9). Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata sähkövastusmääritysmenetelmällä, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei kuitenkaan voida testata.

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaalia levitetään enintään 24 tunnin ajaksi ihonäytteiden orvaskesipinnalle kaksikammioisessa testijärjestelmässä, jossa ihonäytelevyt toimivat kammioiden välisenä erotusseinänä. Ihonäytteet otetaan inhimillisellä tavalla lopetetuista 28–30 päivän ikäisistä rotista. Kemikaalin katsotaan olevan syövyttävä, jos se pystyy tuhoamaan normaalin marraskeden eheyden ja läpäisynestokyvyn, mikä mitataan ihon sähkövastuksen pienenemisenä tietyn raja-arvon alapuolelle (16) (ks. 32 kohta) Rotan ihon sähkövastuksen raja-arvoksi valittiin 5 kΩ. Valinta perustui laajoihin tietoihin useista aineista, joissa suurin osa arvoista selvästi joko ylitti kyseisen arvon (usein > 10 kΩ) tai alitti sen (usein < 3 kΩ) (16). Yleensä testikemikaalit, jotka eivät ole syövyttäviä eläimille mutta jotka voivat olla joko ärsyttäviä tai ärsyttämättömiä, eivät laske ihon sähkövastusta tämän raja-arvon alle. Lisäksi muiden ihonäytteiden tai muiden laitteiden käyttö voi muuttaa raja-arvoa, mikä edellyttää lisävalidointia.

11. Testimenetelmä sisältää väriaineensitomisvaiheen, jotta voidaan vahvistaa positiiviset tulokset tapauksissa, joissa sähkövastusarvo on noin 5 kΩ. Väriaineensitomisvaiheessa voidaan määrittää, johtuuko ionien läpäisykyvyn lisääntyminen marraskeden rakenteen tuhoutumisesta. Rotan ihoa käyttävän sähkövastusmenetelmän on osoitettu kykenevän ennustamaan syövyttävyyttä *in vivo* kanissa, jota käytettiin koe-eläimenä testimenetelmän B.4 mukaisessa testissä (2).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

12. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tämän rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmän mukaista menetelmää rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 1 suositellut 12 ainetta oikein. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelosta (16)), kunhan sovelletaan taulukossa 1 kuvattuja samoja valintaperusteita.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet [1]

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka [2]	YK:n GHS / CLP Lk. *in vivo* -tulosten perusteella [3]	VVM Lk. *in vitro* -tulosten perusteella	Olomuoto	pH [4]
In vivo syövyttävät aineet						
N,N'-dimetyyli-dipropyleenitriamiini	10563-29-8	orgaaninen emäs	1A	6 × C	N	8,3
1,2-diaminopropaani	78-90-0	orgaaninen emäs	1A	6 × S	N	8,3
Rikkihappo (10 %)	7664-93-9	epäorgaaninen happo	(1A/)1B/1C	5 × S 1 × x ES	N	1,2
Kaliumhydroksidi (10 % aq.)	1310-58-3	epäorgaaninen emäs	(1A/)1B/1C	6 × S	N	13,2
Oktaanihappo (kapryylihappo)	124-07-2	orgaaninen happo	1B/1C	4 × S2 - × ES	N	3,6
2-tert-butyylifenoli	88-18-6	Fenoli	1B/1C	4 × S 2 × ES	N	3,9
In vivo syövyttämättömät aineet						
Isosteariinihappo	2724-58-5	Orgaaninen happo	ES	6 × ES	N	3,6
4-amino-1,2,4-triatsoli	584-13-4	Orgaaninen emäs	ES	6 × ES	K	5,5
Fenetyylibromidi	103-63-9	Elektrofiili	ES	6 × ES	N	3,6
4-(metyylitio)-bentsaldehydi	3446-89-7	Elektrofiili	ES	6 × ES	N	6,8
1,9-dekadieeni	1647-16-1	Neutraali orgaaninen aine	ES	6 × ES	N	3,9
Tetrakloorietyleeni	127-18-4	Neutraali orgaaninen aine	ES	6 × ES	N	4,5

Lyhenteet: aq = vesiliuos; CASRN = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; VVM = validoitu vertailumenetelmä; S= syövyttävä ES=syövyttämätön.

(1) Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet, joista on esitetty ensin syövyttävät ja sitten syövyttämättömät aineet sekä syövyttävyyden alakategoria ja kemiallinen luokka, valittiin ECVAMin tekemässä rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmän validointitutkimuksessa käytetyistä aineista (8) (9). Ellei muuta ole mainittu, aineet testattiin sillä puhtaustasolla, joka niillä oli kaupallisesta lähteestä ostettuina (8). Mahdollisuuksien mukaan valikoimassa oli aineita, jotka i) edustavat syövyttävyysvasteiden vaihteluväliä (ts. syövyttämättömiä sekä heikosti ja voimakkaasti syövyttäviä aineita), joka voidaan mitata tai ennustaa vaihtoehtoisella vertailumenetelmällä, ii) edustavat validointitutkimuksessa käytettyjä kemikaaliluokkia, iii) kuvastavat vaihtoehtoisen vertailumenetelmän suorituskykyominaisuuksia, iv) ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä, v) antavat varmoja tuloksia *in vivo* -vertailutestimenetelmällä, vi) ovat kaupallisesti saatavilla ja vii) joiden hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

(2) Kemikaaliluokka Barrattin *ym.* mukaan (8).

(3) YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisia luokkia 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmät ovat I, II ja III.

(4) pH-arvot otettiin julkaisuista Fentem *ym.* (9) ja Barratt *ym.* (8).

MENETTELY

13. Ihon syövyttävyyden tutkimisessa käytettävälle rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmälle on laadittu vakiotoimintamenettelyt (19). Tämän testimenetelmän mukaisten rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmien on oltava seuraavien edellytysten mukaiset:

Eläimet

14. Koe-eläiminä on käytettävä rottia, koska aiemmissa tutkimuksissa (12) niiden ihon on osoitettu olevan herkkä tällä testimenetelmällä tutkittaville aineille ja tämä on ainoa iholähde, joka on virallisesti validoitu (8) (9). Rotan ikä (jolloin ihonäyte otetaan) ja kanta ovat erityisen tärkeitä, jotta voidaan varmistaa, että rottien karvatupet ovat vielä uinuvassa tilassa ennen aikuisen yksilön karvankasvun alkua.

15. Nuorten (noin 22 päivän ikäisten) uros- tai naarasrottien (Wistar tai vastaava kanta) selästä ja kyljistä ajetaan karvat tarkasti pienillä karvaleikkureilla. Sen jälkeen eläimet pestään huolellisesti pyyhkimällä, ja alue, jolta on poistettu karvat, käsitellään antibioottiliuoksella (jossa on esimerkiksi streptomysiiniä, penisilliiniä, kloramfenikolia ja amfoterisiiniä bakteerikasvua tehokkaasti estävinä pitoisuuksina). Eläimet pestään jälleen antibioottiliuoksella kolmantena tai neljäntenä päivänä ensimmäisen pesun jälkeen ja käytetään kokeisiin kolmen päivän sisällä toisesta pesusta, kun marraskesi on toipunut karvojen poistosta.

Ihonäytteiden valmistus

16. Eläimet lopetetaan inhimillisesti 28–30 päivän ikäisinä; ikävaatimus on ehdoton. Kunkin eläimen selkä- ja kylkinahka poistetaan ja nahasta kuoritaan tarkasti ylimääräinen ihonalainen rasva. Ihosta otetaan läpimitaltaan noin 20 mm:n suuruiset näytteet. Ihonäytteet voidaan varastoida ennen niiden käyttöä, jos voidaan osoittaa, että positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatavat tiedot vastaavat tuoreilla näytteillä saatuja.

17. Kukin ihonäyte asetetaan polytetrafluoroetyleeniputken (PTFE-putken) toisen pään yli siten, että orvaskesipinta on kosketuksissa putken kanssa. Ihonäyte kiristetään paikalleen kumisella O-renkaalla, ja liika nahka leikataan pois. O-rengas tiivistetään huolellisesti PTFE-putken päähän vaseliinilla. Putki kiinnitetään jousipidikkeellä koeastian sisälle, jossa on $MgSO_4$-liuosta (154 mM) (kuva 1). Ihonäyte on upotettava $MgSO_4$-liuokseen kokonaan. Yhdestä rotan nahasta on mahdollista saada 10–15 ihonäytettä. Kuvassa 2 esitetään putken ja O-renkaan mitat.

18. Ennen testauksen alkua mitataan kahden ihonäytteen sähkövastus kunkin eläimen nahan laadunvarmistusmenettelynä. Kummankin näytteen vastusarvon on oltava yli 10 k,Ω jotta muita nahasta saatuja ihonäytteitä voidaan käyttää testissä. Jos vastusarvo on alle 10 kΩ, kaikki samasta nahasta saadut näytteet on hylättävä.

Testikemikaalin ja kontrolliaineiden annostelu

19. Kussakin testissä (kokeessa) on käytettävä samanaikaisia positiivisia ja negatiivisia kontrolleja, jotta voidaan varmistaa, että testimalli on tarpeeksi tehokas. Kussakin testissä (kokeessa) on käytettävä vain yhdestä eläimestä otettuja ihonäytteitä. Suositellut kontrolliaineet ovat 10 M suolahappo (positiivinen kontrolli) ja tislattu vesi (negatiivinen kontrolli).

20. Nestemäiset testikemikaalit (150 µl) applikoidaan tasaisesti putken sisäpuolella olevalle orvaskesipinnalle. Kun testataan kiinteitä aineita, ainetta on pantava näytteen päälle tasaisesti riittävä määrä, jotta se peittää koko orvaskesipinnan. Kiinteän aineen päälle lisätään sitten deionisoitua vettä (150 lµ), ja putkea ravistellaan varovasti. Jotta kiinteä aine olisi mahdollisimman hyvin kosketuksissa ihon kanssa, testikemikaalia voidaan sulattaa tai pehmentää lämmittämällä se 30^{0}:seen tai se voidaan jauhaa rakeiseksi tai jauhemaiseksi.

21. Kutakin testi- ja kontrollikemikaalia kohti käytetään jokaisessa testissä (kokeessa) kolme ihonäytettä. Testikemikaaleja pidetään ihonäytteissä 24 tuntia 20–23 °C:n lämpötilassa. Testikemikaali poistetaan pesemällä ihonäytettä vesihanan alla enintään huoneenlämpötilassa, kunnes ainetta ei enää irtoa.

Ihon sähkövastuksen mittaukset

22. Ihon impedanssi mitataan ihon sähkövastuksena matalajännitevaihtovirtasillalla (Wheatstone-silta) (18). Sillan yleiset eritelmät ovat: käyttöjännite 1–3 volttia, vaihtovirta 50–1 000 Hz (sini- tai suorakaideaalto) ja mittausalue vähintään 0,1–30 kΩ. Validointitutkimuksessa käytetty silta mittasi induktanssin aina arvoon 2 000 H, kapasitanssin arvoon 2 000 µF ja vastuksen arvoon 2 MΩ taajuuksilla 100 Hz tai 1 kHz sarja-arvoina tai rinnakkaisina arvoina. Syövyttävyystestissä ihon sähkövastusmäärityksen mittaukset kirjataan vastuksena taajuudella 100 Hz ja sarja-arvoina. Ennen sähkövastuksen mittausta ihon pintajännitystä pienennetään lisäämällä putkeen 70-prosenttista etanolia sen verran, että orvaskesi peittyy. Etanoli poistetaan putkesta muutaman sekunnin kuluttua, ja kudos hydratoidaan lisäämällä 3 ml $MgSO_4$-liuosta (154 mM). Mittaussillan elektrodit asetetaan ihonäytteen molemmille puolille vastuksen mittaamiseksi kilo-ohmeina (kΩ) ihonäytettä kohti (kuva 1). Elektrodien mitat ja hauenleukapidikkeen alapuolella olevan elektrodin pituus esitetään kuvassa 2. Sisemmän elektrodin pidike pidetään vastusmittauksen aikana PTFE-putken päällä sen varmistamiseksi, että sama pituus elektrodia on upotettuna $MgSO_4$-liuokseen. Ulompi elektrodi asetetaan koeastian sisälle siten, että se lepää astian pohjalla. Jousipidikkeen ja PTFE-putken pohjan välinen etäisyys pidetään vakiona (kuva 2), koska tämä etäisyys vaikuttaa mitattavaan vastuksen arvoon. Samoin sisemmän elektrodin ja ihonäytteen välisen etäisyyden on oltava vakio ja mahdollisimman pieni (1–2 mm).

23. Jos mitattu vastusarvo on yli 20 kΩ, se voi johtua siitä, että testikemikaalin jäänteet peittävät ihonäytteen orvaskesipinnan. Tätä kerrosta voidaan yrittää poistaa esim. sulkemalla PTFE-putki peukalolla (suojakäsine kädessä) ja ravistelemalla putkea noin 10 sekuntia. $MgSO_4$-liuos heitetään pois ja vastusmittaus toistetaan tuoreen $MgSO_4$-liuoksen kanssa.

24. Testauslaitteiden ominaisuudet ja mitat sekä koemenetelmä voivat vaikuttaa saatuihin ihon sähkövastusarvoihin. Viiden kΩ:n syövyttävyysraja perustuu tässä testimenetelmässä kuvatuilla erityislaitteilla ja menettelyllä saatuihin mittaustuloksiin. Jos testiolosuhteita muutetaan tai jos käytetään erilaisia laitteita, voi olla tarpeen käyttää eri raja- ja kontrolliarvoja. Siksi menetelmä ja vastuksen raja-arvot pitää kalibroida testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, jotka on valittu validointitutkimuksessa käytettyjen aineiden joukosta (8) (9) tai vastaavista kemikaaliluokista kuin testattavat kemikaalit. Taulukossa 1 on luettelo sopivista pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista.

Väriaineen sitomista mittaavat menetelmät

25. Altistus tietyille syövyttämättömille materiaaleille voi vähentää vastusta alle 5 kΩ:n raja-arvon ja mahdollistaa ionien pääsyn marraskeden läpi, jolloin sähkövastus pienenee (9). Esimerkiksi neutraalit orgaaniset aineet ja pinta-aktiiviset aineet (mm. puhdistusaineet, emulgointiaineet ja muut pinta-aktiiviset aineet) voivat poistaa ihon lipidejä ja lisätä ihon läpäisevyyttä ioneille. Jos tällaisilla kemikaaleilla saadut ihon sähkövastusarvot ovat alle tai noin 5 kΩ mutta jos ihonäytteissä ei ole näkyvää vauriota, on määritettävä väriaineen tunkeutuminen kontrollinäytteiden ja käsiteltyjen näytteiden kudokseen sen selvittämiseksi, johtuvatko ihon sähkövastusarvot ihon läpäisevyyden lisääntymisestä vai ihon syöpymästä (7) (9). Kun on kyse syöpymästä, jossa marraskesi on vaurioitunut, ihon pinnalle levitetty sulforodamiini B -väriaine tunkeutuu nopeasti ihoon ja värjää pinnanalaisen kudoksen. Kyseinen väriaine on stabiili useiden eri aineiden kanssa, eikä jäljempänä kuvattu uuttomenettely vaikuta siihen.

Sulforodamiini B -väriaineen levittäminen ja poistaminen

26. Ihon sähkövastusmäärityksen jälkeen magnesiumsulfaatti poistetaan putkesta. Tämän jälkeen tutkitaan tarkasti, onko ihossa selviä vaurioita. Jos selviä suuria vaurioita (esimerkiksi reikiä) ei ole, kunkin ihonäytteen orvaskeden pinnalle levitetään 150 µl tislatulla vedellä tehtyä 10-prosenttista (paino/tilavuus) laimennosta sulforodamiini B -väriaineesta (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-numero 3520-42-1) kahdeksi tunniksi. Sen jälkeen näitä ihonäytteitä pestään vesihanan alla huoneenlämpötilassa noin 10 sekuntia liiallisen tai sitoutumattomanväriaineen

poistamiseksi. Ihonäytteet poistetaan varovasti PTFE-putkista ja pannaan pulloon (esim. 20 ml:n lasinen tuikelaskentapullo), jossa on deionisoitua vettä (8 ml). Pulloja ravistellaan varovasti 5 minuuttia mahdollisen jäljellä olevan sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Huuhtelu toistetaan, ja sen jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista, pannaan toisiin pulloihin, joissa on 5 ml 30-prosenttista (paino/tilavuus) natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tislatussa vedessä, ja inkuboidaan yön yli 60 °C:ssa.

27. Inkubaation jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista ja heitetään pois. Jäljellä olevaa liuosta sentrifugoidaan 8 minuuttia 21 °C:ssa (suhteellinen keskipakoisvoima ~175 × g). Supernatantista otetaan 1 ml:n näyte, joka laimennetaan 1:5:een (tilavuus/tilavuus) [ts. 1 ml + 4 ml] 30-prosenttisella (paino/tilavuus) SDS:llä tislatussa vedessä. Liuoksen optinen tiheys mitataan aallonpituudella 565 nm.

Väriaineen pitoisuuden laskeminen

28. Sulforodamiini B -väriaineen pitoisuus ihonäytteessä lasketaan optisen tiheyden arvoista (9) (sulforodamiini B:n molaarinen absorptiokerroin aallonpituudella 565 nm = 8,7 × $l0^4$; molekyylipaino = 580). Väriaineen pitoisuus ihonäytteessä määritetään käyttämällä sopivaa kalibrointikäyrää, ja väriaineen keskiarvopitoisuus lasketaan sitten rinnakkaisnäytteistä.

Hyväksymisperusteet

29. Ihon sähkövastusmittausten keskiarvot hyväksytään, jos samaan aikaan mitatut positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa testilaboratoriossa. Hyväksyttävät vastusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita esitetään seuraavassa taulukossa:

Kontrolli	Aine	Vastusalue (kΩ)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo	0,5–1,0
Negatiivinen	Tislattu vesi	10–25

30. Väriaineen sitoutumiskokeen keskiarvotulokset hyväksytään, jos samaan aikaan tehtyjen kontrolliaineiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineiden hyväksyttävät väriainepitoisuusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita esitetään seuraavassa taulukossa:

Kontrolli	Aine	Väriaineen pitoisuusalue (µg/näyte)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo	40–100
Negatiivinen	Tislattu vesi	15–35

Tulosten tulkitseminen

31. Sähkövastusmäärityksen raja-arvo, jolla erotetaan syövyttävät testikemikaalit syövyttämättömistä, määritettiin testimenetelmän optimoinnin aikana, testattiin validointia edeltävässä vaiheessa ja vahvistettiin virallisessa validointitutkimuksessa.

32. Rotan ihon sähkövastusmääritykseen perustuvan ihosyövyttävyyden testimenetelmässä käytettävä ennustemalli (9) (19), joka liittyy YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokitusjärjestelmään, kuvataan alla:

Testiaineen katsotaan olevan ihoa syövyttämätön,

i) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo on suurempi kuin (>) 5 kΩ, tai

ii) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 5 kΩ ja

— ihonäytteessä ei ole ilmeisiä vaurioita (esimerkiksi reikiä) ja

— ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on pienempi (<) kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (10M HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus (ks. positiivisen kontrollin arvot 30 kohdasta).

Testiaineen katsotaan olevan ihoa syövyttävä,

i) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 5 kΩ ja ihonäytteissä on selviä vaurioita (esimerkiksi reikiä), tai

ii) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 5 kΩ ja

— ihonäytteessä ei ole selviä vaurioita (esimerkiksi reikiä), mutta

— ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on suurempi tai yhtä suuri (≥) kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (10M HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus (ks. positiivisen kontrollin arvot 30 kohdasta).

33. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, yleensä vähintään kolme kudosnäytettä käsittävä testiajo (koe) riittää. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos sähkövastusarvon keskiarvo on 5 ± 0,5 k□, on harkittava toista riippumatonta testiajoa (koetta) ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testiajon (kokeiden) tulokset poikkeavat toisistaan.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

34. Vastusarvot (kΩ) ja tarvittaessa väripitoisuusarvot (µg/näyte) sekä testikemikaalista että positiivisista ja negatiivisista kontrolleista on ilmoitettava taulukossa. Myös tiedot jokaisen testiajon (kokeen) yksittäisistä rinnakkaisnäytteistä ja keskiarvot ± keskihajonta on ilmoitettava. Niin ikään kaikki toistetut kokeet on raportoitava. Ihonäytteissä havaitut vauriot on ilmoitettava jokaisen testikemikaalin osalta.

Testiraportti

35. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrolliaineet:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aineet ja seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Koe-eläimet:

— käytetty kanta ja sukupuoli

— eläinten ikä, kun niitä käytetään luovuttajaeläiminä

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— tiedot ihonäytteestä.

Testiolosuhteet:

— testilaitteiden kalibrointikäyrät

— väriaineensitomistestin kalibrointikäyrät, optisten tiheysarvojen mittaamisessa käytetty kaistanpäästösuodatin ja mittalaitteen (esimerkiksi spektrofotometrin) optisen tiheyden lineaarisuusalue tarvittaessa

— tiedot ihon sähkövastuksen mittauksiin käytetystä testimenettelystä

— tiedot väriaineensitomistestissä käytetystä testimenettelystä (tarvittaessa)

— käytetyt testiannokset, altistusjakson (-jaksojen) kesto ja altistuslämpötila(t)

— tiedot altistusjakson jälkeen käytetystä pesumenetelmästä

— testikemikaalia ja kontrolleja (positiiviset ja negatiiviset kontrollit) kohti käytettyjen rinnakkaisihonäytteiden lukumäärä

— kuvaus testimenettelyn mahdollisista muutoksista

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi

i) positiivisten ja negatiivisten kontrollien sähkövastusarvojen (yksikössä kΩ) hyväksyttävyys verrattuna positiivisten ja negatiivisten kontrollien vastusalueisiin

ii) positiivisten ja negatiivisten kontrollien väriaineen pitoisuusarvojen (yksikössä µg/näyte) hyväksyttävyys verrattuna positiivisten ja negatiivisten kontrollien väriaineen pitoisuusalueisiin

iii) testitulosten hyväksyttävyys verrattuna rinnakkaisihonäytteiden aikaisempaan vaihteluun

— kuvaus sovelletuista päätöksentekoperusteista / käytetystä ennustemallista.

Tulokset:

— taulukko sähkövastusmäärityksen ja (tarvittaessa) väriaineensitomistestin tiedoista jokaisen testikemikaalin ja kontrollin osalta, jokaisesta testiajosta (kokeesta) ja jokaisesta rinnakkaisihonäytteestä (yksittäiset eläimet ja yksittäiset ihonäytteet), keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet

— kuvaus mahdollisista havaituista vaikutuksista

— tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavana osoitteessa [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(3) Tämän liitteen luku B.40 a, *In vitro* -ihmisihomallitesti.

(4) Tämän liitteen luku B.65, *In vitro* -kalvoestetestimenetelmä.

(5) Tämän liitteen luku B.46, *In vitro* -ihoärsyttävyys: rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(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 Workshop. *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. Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö, Pariisi.

(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.

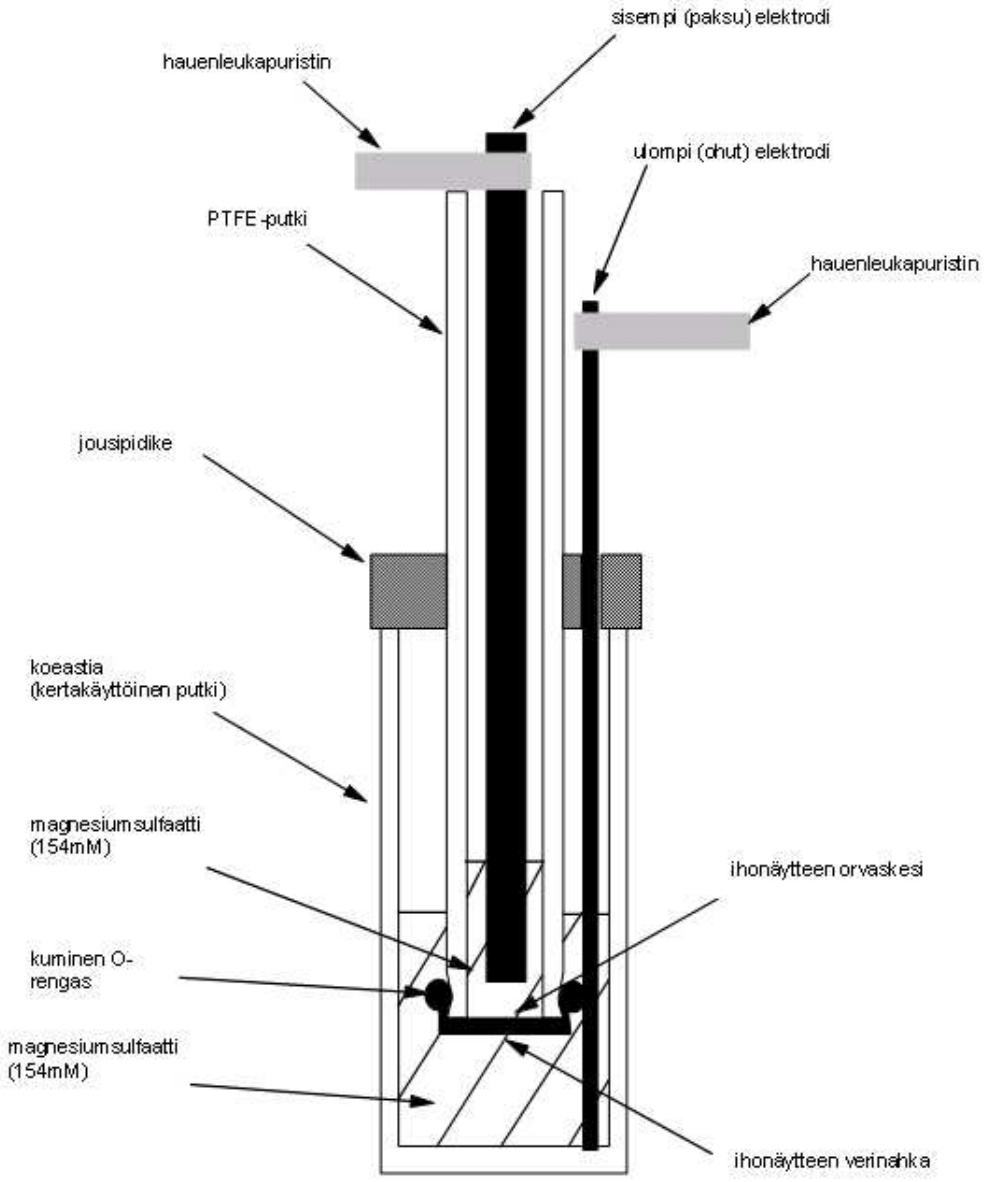
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher 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) Sähkövastusmääritystestin vakiotoimintamenettelyt (joulukuu 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.

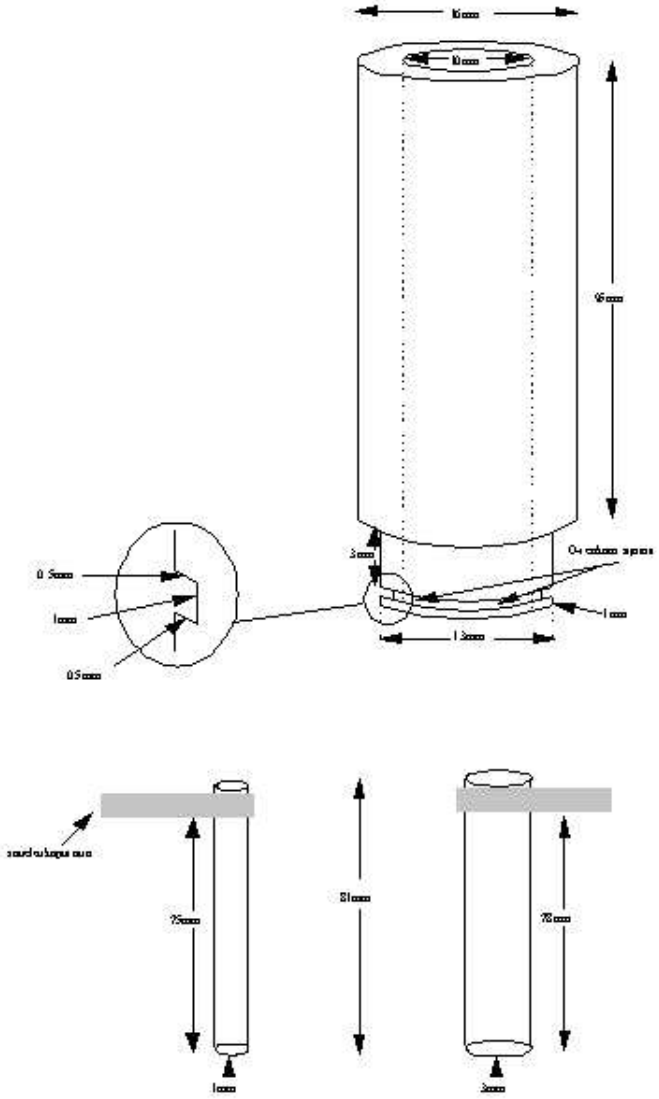
Kuva1

Rotan ihon Sähkövastuksen Määrityslaite



Kuva 2

Polytetrafluoroetyleeniputken (PTFE-Putken), Koeastioiden ja Elektrodien mitat



Yllä kuvattujen laitteiden kriittiset tekijät:

— PTFE-putken sisähalkaisija

— elektrodien pituus suhteessa PTFE-putkeen ja koeastiaan siten, että ihonäyte ei ole kosketuksissa elektrodeihin ja että vakiomitta elektrodia on kosketuksissa $MgSO_4$-liuoksen kanssa

— $MgSO_4$-liuosta on oltava koeastiassa sellainen määrä, että nesteellä on tietty syvyys suhteessa nesteen tasoon PTFE-putkessa (kuvassa 1 esitetyllä tavalla)

— ihonäyte on kiinnitettävä PTFE-putkeen tarpeeksi hyvin, jotta sähkövastus ilmentäisi ihon ominaisuuksia oikein.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (20).

S: Syövyttävä

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten tulosten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (20).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niihin liittyvät vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu vähintään kahdesta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

ES: Ei syövyttävä.

OD: Optinen tiheys.

PK: Positiivinen kontrolli, näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat, ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat luotettavuuden ja tarkkuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla.

Merkityksellisyys: Kuvaus testimenetelmän ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testimenetelmä tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testimenetelmällä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (20).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (20).

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmällä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (20).

Ihosyövyttävyys *in vivo*: Korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmällä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (20).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantoprosessein tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

(Testi)ajo: Yksittäinen testikemikaali, jota testataan samanaikaisesti vähintään kolmella rinnakkaisihonäytteellä.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Ihon sähkövastusmääritystesti (TER): Ihon sähkövastus on ihon sähköisen impedanssin mittayksikkö (kilo-ohmeina). Kyseessä on ihon suojaavan vaikutuksen arviointiin käytettävä yksinkertainen ja luotettava menetelmä, jossa rekisteröidään ihon läpi kulkevat ionit Wheatstone-siltamittauksella.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.”

6) Korvataan B osassa oleva B.40 a luku seuraavasti:

"B.40a ***IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 431 (2016). Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan pysyvän ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantumista testiaineen annostelun jälkeen [Yhdistyneiden kansakuntien yhdenmukaistetussa kemikaalien luokittelu- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti]. Tässä päivitetyssä testimenetelmässä B.40 a kuvataan *in vitro* -menetelmä, jolla voidaan tunnistaa syövyttämättömät ja syövyttävät aineet ja seokset YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti. Sen avulla voidaan myös osittain luokitella syövyttäviä aineita alaluokkiin.

2. Kemikaalien ihosyövyttävyyspotentiaalin arvioinnissa on yleensä käytetty koe-eläimiä (testimenetelmä B.4, vastaa OECD:n testiohjetta 404; hyväksytty ensimmäisen kerran vuonna 1981 ja tarkistettu vuosina 1992, 2002 ja 2015) (2). Tämän testimenetelmän B.40 a lisäksi kaksi muuta kemikaalien ihosyövyttävyyspotentiaalin testaamiseen validoitua ja hyväksyttyä *in vitro* -testimenetelmää ovat testimenetelmät B.40 (vastaa OECD:n testiohjetta 430) (3) ja B.65 (vastaa OECD:n testiohjetta 435) (4). Lisäksi *in vitro* -testimenetelmä B.46 (vastaa OECD:n testiohjetta 439) (5) on hyväksytty ihoärsyttävyyspotentiaalin testaamiseen. Ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja sisältävässä OECD:n ohjeasiakirjassa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan ohjeita siitä, i) miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen (6).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihosyövyttävyyttä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Siinä käytetään (ihmisen orvaskeden keratinosyyteistä peräisin olevilla soluilla) rekonstruoitua ihmisen orvaskettä (Reconstructed human Epidermis, RhE), joka jäljittelee läheisesti ihmisihon ylemmän kerroksen eli epidermiksen histologisia, morfologisia, biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Vastaava OECD:n testiohje hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 2004. Se päivitettiin vuonna 2013 lisäämällä siihen muita RhE-mallia hyödyntäviä testimenetelmiä ja mahdollisuus käyttää menetelmiä syövyttävien kemikaalien alaluokkiin luokittelemisen tukena. Testiohje päivitettiin myös vuonna 2015 lisäämällä siihen viittauksia testauksen ja arvioinnin yhdennettyihin lähestymistapoihin ja ottamalla käyttöön elinkykyisyyden mittaamiseen tarkoitettu vaihtoehtoinen menettely.

4. Tähän testimenetelmään sisältyy neljä validoitua kaupallisesti saatavilla olevaa RhE-mallia. Kahdesta näistä kaupallisesti saatavilla olevasta testimallista, jotka ovat EpiSkin™ Standard Model (SM) ja EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (joista käytetään jäljempänä nimitystä validoidut vertailumenetelmät eli VVM:t), on tehty validointia edeltävät tutkimukset (7) ja sen jälkeen ihosyövyttävyyden arviointia (8) (9) (10) koskeva virallinen validointitutkimus (11) (12). Näiden tutkimusten tulosten perusteella annettiin suositus, jonka mukaan näitä kahta edellä mainittua validoitua vertailumenetelmää voidaan käyttää sääntelytarkoituksissa syövyttävien ja syövyttämättömien aineiden erottamiseen ja EpiSkin™-menetelmää voidaan käyttää lisäksi syövyttävien aineiden alaluokkiin luokittelemisessa (13) (14) (15). Kahdella muulla kaupallisesti saatavilla olevalla in vitro -ihosyövyttävyyden RhE-testimallilla on saatu samanlaisia tuloksia kuin EpiDerm™-VVM:llä suoritusvaatimuksiin perustuvan validoinnin mukaan (16) (17) (18). Nämä testit ovat SkinEthic™ RHE ([2]) ja epiCS® (aikaisempi nimi oli EST-1000), ja myös niitä voidaan käyttää sääntelytarkoituksiin syövyttävien ja syövyttämättömien aineiden erottelemisessa (19) (20). RhE-mallin tekijät tekivät vuosina 2012–2014 validoinnin jälkeisiä tutkimuksia, joissa testimenettelyä oli parannettu korjaamalla epäspesifistä MTT:n pelkistyksestä johtuneet häiriöt, joita testikemikaalit aiheuttivat. Tämä paransi sekä syövyttävien ja syövyttämättömien aineiden erottelun tarkkuutta ja helpotti syövyttävien aineiden luokittelua alaluokkiin (21) (22). EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja EpiCS®-testillä tuotetuista validoinnin jälkeisistä tiedoista on tehty myös tilastoanalyyseja, jotta voidaan määrittää muitakin ennustemalleja, jotka parantavat ennustettavuutta alaluokkiin luokittelun osalta (23).

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

([2]) Lyhennettä RhE (= Reconstructed human Epidermis, rekonstruoitu ihmisorvaskesi) käytetään kaikista malleista, jotka perustuvat RhE-teknologiaan. SkinEthic™-malliin yhdistetty RHE-lyhenne tarkoittaa samaa, mutta koska se on osa tämän nimenomaisen testimenetelmän markkinoinnissa käytettävää nimeä, se kirjoitetaan isoin kirjaimin.

5. Ennen kuin sääntelytarkoituksissa voidaan käyttää muita ihosyövyttävyyden arviointiin ehdotettua samankaltaista tai muutettua *in vitro* -RhE-testimenetelmää kuin validoitua vertailumenetelmiä, on selvitettävä ehdotetun menetelmän luotettavuus, merkityksellisyys (tarkkuus) ja sen ehdotetun käytön rajoitukset, jotta voidaan varmistua siitä, että se on samanlainen kuin validoidut vertailumenetelmät (24), OECD:n ohjeasiakirjassa 34 esitettyjen periaatteiden mukaan määritettyjen suoritusvaatimusten mukaisesti (25). Tietojen vastavuoroinen hyväksyntä taataan vasta, kun ehdotettu uusi tai päivitetty suoritusvaatimusten mukainen testimenetelmä on tarkistettu ja sisällytetty vastaavaan testiohjeeseen. Maat voivat käyttää tässä testiohjeessa olevia testimalleja määrittäessään ihosyövyttävyyden *in vitro* -testimenetelmän testituloksia koskevia vaatimuksiaan, ja samalla ne voivat hyödyntää tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Tällä testimenetelmällä voidaan tunnistaa syövyttämättömät ja syövyttävät aineet ja seokset YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti. Lisäksi tästä testimenetelmästä on apua luokiteltaessa syövyttäviä aineita ja seoksia valinnaiseen alaluokkaan 1A YK:n GHS-järjestelmän (1) mukaisesti ja yhdistettyihin alaluokkiin 1B ja 1C (21) (22) (23). Tämän testimenetelmän rajoitus on se, ettei sen avulla voida erotella ihosyövyttävyyttä alaluokkiin 1B ja 1C YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti, koska alaluokkaan 1C kuuluvia tunnettuja kemikaaleja, jotka ovat syövyttäviä *in vivo*, on vähän. EpiSkin™-, EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja epiCS®-testimalleilla voidaan luokitella kemikaaleja myös alaluokkiin (ts. 1A vs. 1B ja 1C vs. syövyttämättömät aineet).

8. Tähän testimenetelmään sisältyviä, syövyttämättömien ja syövyttävien aineiden määrittämisessä käytettyjä testimalleja tukevassa validoinnissa on testattu laaja joukko kemikaaleja, jotka edustavat pääasiassa yksittäisiä aineita; validointitutkimuksen empiirisessä tietokannassa oli 60 kemikaalia, jotka kattoivat laajalti eri kemikaaliluokkia (8) (9) (10). Testimenetelmän kehittäjät tekivät testejä, joissa osoitettiin alaluokkiin luokittelua koskevan testin herkkyys, spesifisyys, tarkkuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus, ja OECD tarkasti testien tulokset (21) (22) (23). Kaikkien saatavilla olevien tietojen perusteella tätä testimenetelmää voidaan soveltaa hyvin moniin kemikaaliluokkiin ja aineiden fysikaalisiin olomuotoihin, myös nesteisiin, puolikiinteisiin ja kiinteisiin aineisiin sekä vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauheeksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Jos voidaan osoittaa, etteivät tähän testimenetelmään sisältyvät testimallit sovi käytettäväksi tiettyjen testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Sen ohella, että tämä testimenetelmä soveltuu aineiden testaamiseen, sen oletetaan soveltuvan myös seosten testaamiseen. Koska seokset kattavat laajan joukon luokkia ja koostumuksia ja koska seosten testaamisesta on tällä hetkellä saatavilla vain vähän tietoa, niissä tapauksissa, joissa voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen seosluokkien kanssa (esimerkiksi lähdeviitteessä (26) ehdotetun strategian mukaisesti), testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksissa (8) (9) (10). Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata RhE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei kuitenkaan voida testata.

9. Testikemikaalit, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituudella kuin MTT-formatsaani, ja testikemikaalit, jotka voivat suoraan pelkistää MTT-vitaaliväriä (MTT-formatsaaniksi), voivat häiritä kudoksen elinkykyisyysmittauksia, ja niiden yhteydessä on käytettävä mukautettuja kontrolleja korjauksiin. Mahdollisesti tarvittavien mukautettujen kontrollien tyyppi vaihtelee sen mukaan, millaista häiriötä testikemikaali tuottaa ja mitä menetelmää MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään (ks. 25–31 kohta).

10. Tällä testimenetelmällä ei saada asianmukaista tietoa ihoärsytyksestä, mutta testimenetelmä B.46 koskee nimenomaan terveysvaikutusta ihoärsytys *in vitro*, ja se perustuu samaan RhE-testijärjestelmään, vaikka siinä käytetään toisenlaista protokollaa (5). Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (6). Näihin lähestymistapoihin kuuluu ihosyövyttävyystestien (tässä kuvattu testimenetelmä) ja ihoärsytystestien suorittaminen *in vitro* ennen testauksen harkitsemista elävillä eläimillä. Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja.

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen rekonstruoituun ihmisorvaskesimalliin. Se koostuu ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneiden solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä ja selkeistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lamellaarisia lipidikerroksia, jotka edustavat myös *in vivo* -kokeissa havaittuja lipidiluokkia.

12. RhE-testimenetelmän periaate perustuu oletukseen, jonka mukaan syövyttäviä kemikaaleja ovat ne, jotka pystyvät tunkeutumaan marrasketeen (diffundoitumalla tai eroosion seurauksena) ja ovat myrkyllisiä alemmissa solukerroksissa oleville soluille. Solujen elinkyky mitataan siten, että entsyymit muuntavat vitaaliväri MTT:n [3-(4,5-dimetyylitiatsol-2yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi, tiatsolyylisininen; CAS-numero 298-93-1] siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti, kun se on uutettu kudoksista (27). Syövyttävät kemikaalit tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkykyä määritettyjen kynnysarvojen alle (ks. 35 ja 36 kohta). RhE-malliin perustuvan ihosyövyttävyyden testimenetelmän on osoitettu voivan ennustaa ihoa syövyttäviä vaikutuksia *in vivo* kaneilla, kun niitä on arvioitu testimenetelmän B.4 mukaisesti (2).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

13. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää mitään näistä neljästä tähän testimenetelmään kuuluvasta validoidusta RhE-testimallista rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 1 suositellut 12 ainetta oikein. Jos menetelmää käytetään alaluokkiin luokittelemiseen, pätevyys on osoitettava myös siinä. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelosta (24)), kunhan sovelletaan taulukossa 1 kuvattuja samoja valintaperusteita.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet ([1])

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka ([2])	YK:n GHS-järj. / CLP-as. luokitus. *In vivo* -tulosten perusteella ([3])	VVM Luokka, joka perustuu *in vitro* -tuloksiin ([4])	MTT-pelkistin ([5])	Fyysinen olomuoto
Alaluokka 1A *In vivo* syövyttävät aineet						
Bromietikkahappo	79-08-3	Orgaaninen happo	1A	(3) 1A	—	Ki
Booritrifluorididihydraatti	13319-75-0	Epäorgaaninen happo	1A	(3) 1A	—	N
Fenoli	108-95-2	Fenoli	1A	(3) 1A	—	Ki
Diklooriasetyyli-kloridi	79-36-7	Elektrofiili	1A	(3) 1A	—	N
Alaluokkien 1B ja 1C (*in vivo* syövyttävät aineet) yhdistelmä						
Glyoksyylihappo-monohydraatti	563-96-2	Orgaaninen happo	1B ja 1C	(3) 1B ja 1C	—	Ki

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka ([2])	YK:n GHS-järj. / CLP-as. luokitus. *In vivo* -tulosten perusteella ([3])	VVM Luokka, joka perustuu *in vitro* -tuloksiin ([4])	MTT-pelkistin ([5])	Fyysinen olomuoto
Alaluokka 1A *In vivo* syövyttävät aineet						
Maitohappo	598-82-3	Orgaaninen happo	1B ja 1C	(3) 1B ja 1C	—	N
Etanoliamiini	141-43-5	Orgaaninen emäs	1B	(3) 1B ja 1C	K	Viskoosinen
Suolahappo (14,4 %)	7647-01-0	Epäorgaaninen happo	1B ja 1C	(3) 1B ja 1C	—	N
In vivo syövyttämättömät aineet						
Fenetyylibromidi	103-63-9	Elektrofiili	ES	(3) ES	K	N
4-amino-1,2,4-triatsoli	584-13-4	Orgaaninen emäs	ES	(3) ES	—	Ki
4-(metyylitio)-bentsaldehydi	3446-89-7	Elektrofiili	ES	(3) ES	K	N
Lauriinihappo	143-07-7	Orgaaninen happo	ES	(3) ES	—	Ki

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; VVM = validoitu vertailumenetelmä; ES = ei syövyttävä K= kyllä; L=neste; Ki=kiinteä

([1]) Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet, jotka on lajiteltu syövyttäviin vs. syövyttämättömiin aineisiin, sen jälkeen syövyttävien aineiden alaluokkiin ja lopuksi kemikaaliluokan mukaan, valittiin ECVAMin validointitutkimuksissa (EpiSkin™ ja EpiDerm™) käytetyistä aineista (8) (9) (10) ja validoinnin jälkeen tehdyistä tutkimuksista, jotka perustuivat EpiSkin™- (22), EpiDerm™-, SkinEthic™- ja epiCS®-testien kehittäjien saamiin tietoihin (23). Ellei muuta ole mainittu, aineet testattiin sillä puhtaustasolla, joka niillä oli kaupallisesta lähteestä ostettuina (8) (10). Mahdollisuuksien mukaan valikoimassa oli aineita, jotka i) edustavat syövyttävyysvasteiden vaihteluväliä (ts. syövyttämättömiä sekä heikosti ja voimakkaasti syövyttäviä aineita), joka voidaan mitata tai ennustaa vaihtoehtoisella vertailumenetelmällä, ii) edustavat validointitutkimuksissa käytettyjä kemikaaliluokkia, iv) ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä, iv) tuottavat toistettavissa olevia tuloksia validoidulla vertailumenetelmällä tehdyissä tutkimuksessa, v) antavat varmoja tuloksia *in vivo* -vertailutestimenetelmällä, vi) ovat kaupallisesti saatavilla, ja vii) joiden hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

([2]) Kemikaaliluokka Barrattin *ym.* mukaan (8).

([3]) YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisia luokkia 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmät ovat I, II ja III.

([4]) Tässä taulukossa esitetyt validoiduilla vertailumenetelmillä saadut *in vitro* -ennusteet saatiin EpiSkin™- ja the EpiDerm™-testimalleilla (VVM:t) validoinnin jälkeisessä testauksessa, jonka tekivät testimenetelmän kehittäjät.

([5]) ECVAMin ihosyövyttävyyden validointitutkimuksissa saatuja elinkykyisyysarvoja ei korjattu suoran MTT-pelkistyksen osalta (validointitutkimuksissa ei käytetty kuolleita kontrolleja). Testimenetelmän kehittäjien saamat validoinnin jälkeiset tiedot, jotka on esitetty tässä taulukossa, hankittiin kuitenkin mukautettuja kontrolleja (23) käyttäen.

14. Osana pätevyyden osoittamista käyttäjän on kudosten vastaanoton jälkeen tarkastettava kudosten läpäisevyysominaisuudet RhE-mallin kehittäjän vaatimusten mukaisesti. Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun testimenetelmä on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys on osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos menetelmää käytetään säännöllisesti, läpäisevyysominaisuudet on kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

MENETTELY

15. Seuraavassa on yleinen kuvaus tämän testimenetelmän mukaisessa ihosyövyttävyyden määrittämisessä käytettävien RhE-testimallien osista ja menettelyistä. Tämän testimenetelmän mukaisesti käytettäviksi hyväksytyt tieteellisesti validit RhE-mallit (EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE ja epiCS®) (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) ovat saatavana kaupallisista lähteistä. Näille neljälle RhE-mallille on laadittu vakiotoimintamenettelyt (34) (35) (36) (37), ja niiden pääasialliset testimenetelmän osat on esitetty lisäyksessä 2. Asianmukaisia vakiotoimintamenettelyjä on syytä noudattaa, kun jotakin näistä menetelmistä käytetään laboratoriossa. Tämän testimenetelmän mukaisiin neljään RhE-testimalliin perustuvien testien on oltava seuraavien edellytysten mukaiset:

RHE-TESTIMENETELMÄN OSAT

Yleiset ehdot

16. Epiteelin valmistamiseen on käytettävä muuntamattomia ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä on oltava useita kerroksia ja olennainen lipidikoostumus, jotta se voi toimia esteenä sytotoksisten vertailukemikaalien, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopealle kulkeutumiselle ihokerrosten läpi. Läpäisynestokyky on osoitettava, ja se voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) tietyn altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}), kun vertailukemikaalia käytetään tiettynä kiinteänä pitoisuutena (ks. 18 kohta). Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy, sillä marraskeden ympärillä olevien testikemikaalien pääsy kudokseen heikentää mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. RhE-mallissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieniitiöt).

Toimintaolosuhteet

Solujen elinkyky

17. Kudoksen elinkyky määritetään MTT-määrityksellä (27). RhE-kudoksen elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n saostuneeksi siniseksi MTT-formatsaaniksi, joka uutetaan kudoksista isopropanolilla (tai muulla vastaavalla liuottimella). Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden (OD) on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida käyttämällä joko vakioabsorbanssimittausta (OD) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä (38). RhE-mallien käyttäjien on varmistettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut vaatimukset. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo). Tähän testimenetelmään sisältyvien neljän validoidun RhE-testimallin negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue esitetään taulukossa 2. HPLC-/UPLC-spektrofotometrin käyttäjän on käytettävä taulukossa 2 esitettyjä negatiivisen kontrollin OD-vaihteluvälejä negatiivisen kontrollin hyväksymisperusteena. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset tulokset OD-mittauksesta) altistusjakson ajan on dokumentoitava.

Taulukko 2

Negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue erän laadunvalvonnassa

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
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

Läpäisyn esto

18. Marraskeden ja sen lipidikoostumuksen on oltava riittävä estämään sytotoksisten vertailukemikaalien (esimerkiksi SDS:n tai Triton X-100:n) nopea läpäisy arvioituna IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä (taulukko 3). RhE-mallin kehittäjän/myyjän on osoitettava RhE-mallin jokaisen erän läpäisynestokyky, kun se toimittaa kudokset loppukäyttäjälle (ks. 21 kohta).

Morfologia

19. RhE-mallin histologinen tutkimus on tehtävä osoittamalla, että mallissa on ihmisorvaskeden kaltainen moniker-rosrakenne, joka koostuu tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksesta sekä marraskedestä ja että sen lipidikoostumus on samankaltainen kuin ihmisorvaskeden lipidikoostumus. RhE-mallin kehittäjän/myyjän on esitettävä RhE-mallin kunkin erän histologinen tutkimus, joka osoittaa, että kudosten morfologia on asianmukainen, kun kehittäjä/myyjä toimittaa kudokset loppukäyttäjälle (ks. 21 kohta).

Toistettavuus

20. Testimenetelmän käyttäjien on osoitettava testimenetelmien toistettavuus pidemmällä aikavälillä positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla. Lisäksi testimenetelmää saa käyttää vain, jos RhE-mallin kehittäjä/toimittaja on antanut tietoja, jotka osoittavat toistettavuuden pidemmällä aikavälillä esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden luettelon (taulukko 1) mukaisilla syövyttävillä ja syövyttämättömillä kemikaaleilla. Jos testimenetelmää käytetään alaluokkiin luokittelemiseen, toistettavuus on osoitettava myös sen osalta.

Laadunvalvonta

21. RhE-mallia saa käyttää vain, jos sen kehittäjä/toimittaja osoittaa, että kukin RhE-mallin erä täyttää määritellyt tuotantokriteerit, joiden joukosta *elinkykyisyyttä* (17 kohta), *läpäisyn estoa* (18 kohta) ja m*orfologiaa* (19 kohta) koskevat perusteet ovat tärkeimmät. Tätä koskevat tiedot on annettava testimenetelmän käyttäjille, jotta he voivat ilmoittaa tiedot testiraportissa. Ainoastaan laadunvalvonnassa hyväksytyillä kudoserillä saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi syövyttävyyden luokittelua varten. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä IC50- tai ET50-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo). Neljän validoidun testimallin hyväksyttävyysalueet esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Laadunvalvonnan perusteet erän vapauttamiseksi tehtaalta myyntiin

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (SM) (18 tunnin käsittely SDS:llä) (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 tuntia	ET50 = 8,7 tuntia
SkinEthic™-RhE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 tuntia	ET50 = 10,0 tuntia
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 tuntia	ET50 = 7,0 tuntia

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

22. Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolleista on käytettävä vähintään kahta rinnakkaista kudosnäytettä kullakin altistuskerralla. Sekä nestemäisiä että kiinteitä kemikaaleja käytettäessä orvaskeden pinnalle on annosteltava testikemikaalia tasaisesti riittävä määrä kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta. Kemikaalia on käytettävä vähintään 70 µl/cm^2 tai 30 µl/cm^2. Käytettävän mallin mukaan orvaskeden pinta on kostutettava deionisoidulla tai tislatulla vedellä ennen kiinteiden kemikaalien annostelua, jotta testikemikaalin ja orvaskeden pinnan välinen kosketus olisi parempi (34) (35) (36) (37). Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Annostelumenetelmän on sovelluttava testikemikaalille (katso esim. kirjallisuusviitteet 34–37). Altistusjakson jälkeen testikemikaali on huuhdeltava huolellisesti orvaskeden pinnalta sopivallavesipitoisella

puskuriliuoksella tai 0,9-prosenttisella natriumkloridilla. Sen mukaan, mitä neljästä validoidusta RhE-testimallista käytetään, testikemikaalia kohti käytetään kaksi tai kolme altistusjaksoa (kaikki neljä validoitua RhE-mallia: 3 minuuttia ja 1 tunti; EpiSkin™-menetelmää käytettäessä 4 tunnin mittainen lisäaltistusaika). Sen mukaan, mitä RhE-testimallia käytetään ja millaista altistusjaksoa arvioidaan, altistumisen aikainen inkubointilämpötila saa vaihdella huoneenlämpötilan ja 37 °C:n välillä.

23. Kussakin käsittelyssä on käytettävä samanaikaisia negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla), läpäisyn esto ja altistuksesta seuraava kudoksen herkistyminen (positiivisella kontrollilla) ovat pidemmän määritetyn aikaisemman hyväksyttävyysalueen mukaisia. Suositellut positiiviset kontrollikemikaalit ovat jääetikkahappo tai 8N KOH sen mukaan, millaista RhE-mallia käytetään. On kuitenkin syytä muistaa, että 8N KOH on suora MTT:n pelkistin, jonka käyttö voi edellyttää kontrollien mukauttamista 25 ja 26 kohdassa kuvatun mukaisesti. Suositellut negatiiviset kontrollit ovat 0,9-prosenttinen natriumkloridi tai vesi.

Solujen elinkykymittaukset

24. Tässä menetelmässä on käytettävä kvantitatiivista MTT-määritystä solujen elinkyvyn mittaamiseen (27). Kudosnäyte asetetaan kolmeksi tunniksi sopivan vahvuiseen MTT-liuokseen (esimerkiksi 0,3 tai 1 mg/ml). Saostunut sininen formatsaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esimerkiksi isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 nm:ssä käyttäen enintään ± 30 nm:n kaistanpäästösuodatinta tai käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenetelmää (ks. 30 ja 31 kohta) (38).

25. Testikemikaalit voivat häiritä MTT-määritystä joko pelkistämällä MTT:n suoraan siniseksi formatsaaniksi ja/tai väri-interferenssillä, jos testikemikaali absorboi valoa luonnostaan tai käsittelymenettelyjen takia samalla optisella tiheydellä kuin formatsaani (570 ± 30 nm, pääasiassa siniset ja violetit kemikaalit). Esimerkiksi epäspesifin MTT-pelkistinkontrollin (NSMTT) ja epäspesifin värikontrollin (NSC) kaltaisia lisäkontrolleja on käytettävä, jotta näistä testikemikaaleista johtuva mahdollinen häiriö voidaan havaita ja korjata (ks. 26–30 kohta). Tämä on tärkeää etenkin silloin, jos tiettyä testikemikaalia ei saada kokonaan pois kudoksesta huuhtelussa tai jos se tunkeutuu orvaskeden läpi, jolloin sitä on kudoksissa, kun elinkykyisyystesti MTT:llä tehdään. MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti testimalleja koskevissa vakiotoimintamenettelyissä (34) (35) (36) (37).

26. Jotta suorat MTT-pelkistimet voidaan tunnistaa, kukin testikemikaali tulee lisätä tuoreeseen MTT-liuokseen (34) (35) (36) (37). Jos testikemikaalia sisältävä MTT-seos muuttuu siniseksi tai violetiksi, testikemikaalin oletetaan olevan suora MTT:n pelkistin, jolloin on tehtävä toiminnallinen tarkastus kuolleella orvaskedellä riippumatta siitä, käytetäänkö vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä. Tässä toiminnallisessa lisätarkastuksessa käytetään kuolleita kudoksia, joiden metabolinen toiminta on vähäistä mutta jotka absorboivat testikemikaalia yhtä paljon kuin elinkykyiset kudokset. Kutakin MTT:tä pelkistävää kemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle sellaiselle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko ihosyövyttävyystestin ajan. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: MTT:n pelkistimelle altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys vähennettynä samalle MTT:n pelkistimelle altistettujen kuolleiden kudosten epäspesifisen MTT-pelkistyksen prosenttiosuutena laskettuna suhteessa negatiiviseen kontrolliin, joka testattiin samanaikaisesti korjattavan testin kanssa (%NSMTT).

27. Jotta voidaan tunnistaa värillisten testikemikaalien tai niiden testikemikaalien, jotka värjäytyvät kosketuksessa veteen tai isopropanoliin, mahdollinen interferenssi ja päättää, tarvitaanko lisäkontrolleja, testikemikaalista on tehtävä spektrianalyysi vedessä (ympäristö altistuksen aikana) ja/tai isopropanolissa (uuttoliuos). Jos vedessä ja/tai isopropanolissa oleva testikemikaali absorboi valoa alueella 570 ± 30 nm, on käytettävä useampia väriainekontrolleja tai vaihtoehtoisesti on käytettävä HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä, jolloin näitä kontrolleja ei tarvita (ks. 30 ja 31 kohta). Vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä kutakin häiritsevää värillistä testikemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle elinkykyiselle rinnakkaiskudosnäytteelle, joita käytetään koko ihosyövyttävyystestin ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta väliaineessa MTT-inkubointivaiheen aikana, jotta saadaan aikaan epäspesifi värikontrolli (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollion

tehtävä samanaikaisesti värillisellä testikemikaalilla tehtävän testin kanssa kullakin altistuskerralla (jokaisessa testiajossa) elävien kudosten luontaisen biologisen vaihtelun vuoksi. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT-liuoksessa inkuboitujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys vähennettynä häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen elävien kudosten epäspesifisen ja samanaikaisesti korjattavan testin kanssa testatun värikontrollin prosenttiosuudella (%NSC_{living}).

28. Niille testikemikaaleille, joiden todetaan tuottavan sekä suoraa MTT:n pelkistystä (ks. 26 kohta) ja väri-interferenssiä (ks. 27 kohta), tarvitaan vielä kolmas kontrollisarja edellisissä kohdissa kuvattujen NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollien lisäksi vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä. Näin on yleensä MTT-määritystä häiritsevien tummien kemikaalien (esimerkiksi sinisten, violettien, mustien) yhteydessä, koska niiden luontainen väri heikentää niiden kykyä pelkistää MTT:tä suoraan 26 kohdassa kuvatun mukaisesti. Nämä testikemikaalit voivat sitoutua sekä eläviin että kuolleisiin kudoksiin, minkä vuoksi NSMTT-kontrolli saattaa korjata paitsi testikemikaalin mahdollisesti aiheuttaman suoran MTT:n pelkistyksen myös väri-interferenssin, joka johtuu testikemikaalin sitoutumisesta kuolleisiin kudoksiin. Tämä taas voi johtaa väri-interferenssin kaksinkertaiseen korjaamiseen, koska NSC_{living}-kontrollilla korjataan jo testikemikaalin eläviin kudoksiin sitoutumisesta johtuva väri-interferenssi. Jotta vältetään väri-interferenssin mahdollinen kaksinkertainen korjaaminen, tarvitaan kolmas, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa -kontrolli (NSCkilled). Tässä lisäkontrollissa testikemikaalia laitetaan kullakin altistuskerralla vähintään kahdelle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan mutta jotka inkuboidaan väliaineessa MTT-liuoksen sijasta MTT-inkubointivaiheessa. Yksi NSC_{killed}-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta, mutta se on tehtävä samaan aikaan kuin NSMTT-kontrolli ja samalla kudoserällä, mikäli mahdollista. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: testikemikaalille altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys miinus %NSMTT miinus %NSC_{living} plus häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen kuolleiden kudosten epäspesifinen väri laskettuna suhteessa korjattavan testin kanssa samanaikaisesti tehtyyn negatiiviseen kontrolliin (%NSC_{killed}).

29. On tärkeää muistaa, että epäspesifinen MTT:n pelkistys ja epäspesifiset väri-interferenssit voivat lisätä kudosuutteiden lukemia spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi. Tämän vuoksi jokaisen laboratorion on määritettävä spektrofotometrinsä lineaarinen asteikko kaupallisesta lähteestä saatavalla MTT-formatsaanilla (CAS-nro 57360-69-7) ennen sääntelytarkoituksiin liittyvien testikemikaalien testaamisen aloittamista. Varsinkin spektrofotometrillä tehtävä vakioabsorbanssimittaus (optinen tiheys) on asianmukainen suorien MTT:n pelkistimien ja väri-interferenssiä aiheuttavien testikemikaalien määrittämisessä, jos testikemikaalilla käsiteltyjen kudosuutteiden optiset tiheydet (ilman suoran MTT:n pelkistyksen ja/tai väri-interferenssin korjaamista) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon mukaiset tai jos testikemikaalilla saadun elinkykyisyyden korjaamattoman prosenttiosuuden perusteella tiedetään, että kemikaali on syövyttävä (ks. 35 ja 36 kohta). Sellaisia testikemikaaleja, joiden tuottamat %NSMTT- ja/tai %NSC_{living}-arvot ovat negatiivisessa kontrollissa > 50 %, koskeviin tuloksiin on kuitenkin syytä suhtautua varauksellisesti.

30. Niiden värillisten testikemikaalien yhteydessä, jotka eivät sovellu vakioabsorbanssimittaukseen (optinen tiheys), koska ne häiritsevät MTT-määritystä liikaa, voidaan vaihtoehtoisesti käyttää HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä MTT-formatsaanin mittaamiseen (ks. 31 kohta) (37). HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmän avulla MTT-formatsaani voidaan erottaa testikemikaalista ennen sen kvantifiointia (38). Tästä syystä NSC_{liVing}- tai NSC_{killed}-kontrolleja ei tarvita koskaan HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä siitä riippumatta, mikä testattava kemikaali on. NSMTT-kontrolleja on kuitenkin käytettävä, jos testikemikaalin epäillään olevan suora MTT:n pelkistin tai jos sen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten hyvin se pystyy pelkistämään MTT:tä suoraan (26 kohdassa kuvatun mukaan). Jos MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään HPLC-/UPLC-spektrofotometria, kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin huippualueen prosenttiosuutena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Niiden testikemikaalien osalta, jotka pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan, kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan tällä kaavalla: testikemikaalille altistetuista elävistäkudoksista

saatu kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys miinus % NSMTT. On myös syytä muistuttaa siitä, että suoria MTT:n pelkistimiä, jotka voivat aiheuttaa myös väri-interferenssiä ja jotka pysyvät kudoksissa käsittelyn jälkeen ja pelkistävät MTT:tä niin voimakkaasti, että testattujen kudosuutteiden optiset tiheydet (vakiotiheysmittausta käyttäen) tai huippualueet (UPLC-/HPLC-spektrofotometria käyttäen) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella, ei voida määrittää, vaikka tällaista oletetaan tapahtuvan vain hyvin harvoin.

31. HPLC-/UPLC-spektrometriaa voidaan käyttää myös kaikentyyppisten testikemikaalien (värillisten, värittömien, MTT:n pelkistimien ja muiden kuin MTT:n pelkistimien) kanssa MTT-formatsaanin mittaamiseen (38). HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmien moninaisuuden vuoksi näiden järjestelmien asianmukaisuus on osoitettava ennen kuin niitä käytetään kudosuutteiden MTT-formatsaanin kvantifioimisessa. Järjestelmien on täytettävä hyväksymiskriteerit tavanomaisten laatuparametrien osalta Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston bioanalyyttisten menetelmien validointia koskevissa ohjeissa kuvatun mukaisesti (38) (39). Nämä keskeiset parametrit ja niihin liittyvät hyväksymisperusteet esitetään lisäyksessä 4. Kun lisäyksessä 4 määritetyt hyväksymisperusteet täyttyvät, kyseistä HPLC-/UPLC-spektrometriajärjestelmää pidetään asianmukaisena ja sillä voidaan mitata MTT-formatsaania tässä testimenetelmässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Hyväksymisperusteet

32. Jokaisessa testimenetelmässä, jossa käytetään valideja RhE-malleja, negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten optisen tiheyden on kuvastettava kudosten laatua taulukossa 2 kuvatun mukaisesti, eikä tämä arvo saa olla aikaisemmin määritettyjä raja-arvoja pienempi. Positiivisella kontrollilla, kuten jääetikkahapolla tai 8N KOH:lla, käsiteltyjen kudosten on kuvastettava kudosten kykyä reagoida syövyttävään kemikaaliin testimallin yhteydessä käytetyissä olosuhteissa (ks. lisäys 2). Testikemikaalilla ja/tai kontrollikemikaaleilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden vaihtelevuuden on oltava hyväksytyissä rajoissa kutakin validia RhE-mallia koskevien vaatimusten mukaisesti (ks. lisäys 2) (esimerkiksi kahden rinnakkaiskudosnäytteen välisen elinkykyisyyden erotus saa olla enintään 30 prosenttia). Jos joko testiajossa käytetyn negatiivisen kontrollin tai positiivisen kontrollin tulos on hyväksyttävän alueen ulkopuolella, testiajoa ei pidetä hyväksyttävänä ja se on toistettava. Jos testikemikaalien vaihtelua koskeva tulos on määritetyn alueen ulkopuolella, sen testaus on toistettava.

Tulosten tulkinta ja ennustemalli

33. Jokaisesta testikemikaalista saaduista OD-arvoista on laskettava solujen prosentuaalinen elinkykyisyys suhteessa negatiiviseen kontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 prosenttia. HPLC-/UPLC-spektrofotometria käytettäessä kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin huippualueen prosenttiosuutena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Solujen prosentuaalisen elinkykyisyyden raja-arvot, joiden perusteella syövyttävät ja syövyttämättömät testikemikaalit erotellaan toisistaan (tai joiden perusteella erilaiset syövyttävien kemikaalien alaluokat erotellaan), määritetään jäljempänä 35 ja 36 kohdassa jokaisen tähän testimenetelmään kuuluvan testimallin osalta. Näitä raja-arvoja on käytettävä tulosten tulkinnassa.

34. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä vähintään kaksi rinnakkaiskudosnäytettä käsittävässä testiajossa. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset, voidaan harkita toista testiajoa ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

35. Taulukossa 4 kuvataan ihosyövyttävyyttä koskevassa EpiSkin™-testimallissa käytettävä ennustemalli (9) (34) (22), joka liittyy YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokitusjärjestelmään:

Taulukko 4

EpiSkin™-ennustemalli

Elinkykyisyys mitattuna altistuksen tiettyjen aikapisteiden jälkeen (t=3, 60 ja 240 minuuttia)	Huomioon otettava ennuste
< 35 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä:** •Valinnainen alaluokka 1A (*)
< 35 % 3 minuutin altistuksen jälkeen **JA** < 35 % 60 minuutin altistuksen jälkeen **TAI** < 35 % 60 minuutin altistuksen jälkeen **JA** < 35 % 240 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä:** •Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä
≥ 35 % 240 minuutin altistuksen jälkeen	**Ei syövyttävä**

(*) RhE-testin käyttökelpoisuutta alaluokkiin luokittelemisen tukemisessa koskevasta arvioinnista saadut tiedot osoittivat, että noin 22 prosenttia alaluokkaan 1A kuuluvista EpiSkin™-testimallin tuloksista voivat olla alaluokan 1B tai 1C aineita/seoksia (ts. yliluokitukset) (ks. lisäys 3).

36. Taulukossa 5 esitetään ihosyövyttävyyttä koskevien EpiDerm™ SCT- (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE- (17) (18) (23) (36) ja epiCS® (16) (23) (37) -testimallien, jotka liittyvät YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokitusjärjestelmään, ennustemallit:

Taulukko 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS®

Elinkykyisyys mitattuna altistuksen tiettyjen aikapisteiden jälkeen (t= 3 ja 60 minuuttia)	Huomioon otettava ennuste
VAIHE 1 EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja epiCS®-testimalleissa	
< 50 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä**
≥ 50 % 3 minuutin altistuksen jälkeen **JA** < 15 % 60 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä**
≥ 50 % 3 minuutin altistuksen jälkeen **JA** ≥ 15 % 60 minuutin altistuksen jälkeen	**Ei syövyttävä**
VAIHE 2 EpiDerm™ SCT -testimallissa – vaiheessa 1 syövyttäviksi todetut aineet/seokset	
< 25 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnainen alaluokka 1A*

Elinkykyisyys mitattuna altistuksen tiettyjen aikapisteiden jälkeen (t= 3 ja 60 minuuttia)	Huomioon otettava ennuste
VAIHE 1 EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja epiCS®-testimalleissa	
≥ 25 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä
VAIHE 2 SkinEthic™ RHE -testimallissa – vaiheessa 1 syövyttäviksi todetut aineet/seokset	
< 18 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnainen alaluokka 1A*
≥ 18 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä
VAIHE 2 epiCS®-testimallissa – vaiheessa 1 syövyttäviksi todetut aineet/seokset	
< 15 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnainen alaluokka 1A*
≥ 15 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

37. Kunkin testin osalta on esitettävä taulukkona yksittäisiä rinnakkaisia testinäytteitä koskevat tiedot (esimerkiksi kunkin testikemikaalin OD-arvot ja solujen prosentuaalista elinkykyä koskevat tiedot, myös luokittelu) ja tarvittaessa myös tiedot toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä rinnakkaiskudosnäytteiden elinkykyisyyden keskiarvot ja vaihteluvälit sekä variaatiokertoimet kustakin testistä. Kunkin testikemikaalin osalta on esitettävä havaittu yhteisvaikutus MTT-reagenssin ja suorien MTT:n pelkistimien tai värillisten testikemikaalien kanssa.

Testiraportti

38. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrollikemikaalit:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aine ja seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Käytetty RhE-malli ja protokolla perusteluineen (tarvittaessa)

Testiolosuhteet:

— käytetty RhE-malli (ja eränumero)

— mittalaitteen (esimerkiksi spektrometrin) kalibrointitiedot, MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetty aallonpituus ja kaistanpäästö (tarvittaessa) sekä mittalaitteen lineaarisuusasteikko

— MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetyn menetelmän kuvaus

— HPLC-/UPLC-spektrometrijärjestelmän asianmukaisuuden kuvaus tarvittaessa

— täydelliset RhE-mallin käyttöä tukevat tiedot, myös mallin suoritusarvot. Näitä voivat olla esimerkiksi

i) elinkykyisyys

ii) läpäisyn esto

iii) morfologia

iv) toistettavuus ja ennustamiskyky

v) mallin laatukontrollit

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi laatukontrollitietojen hyväksyttävyys verrattuna aikaisempia eriä koskeviin tietoihin.

— pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla tehtyyn testaukseen perustuva osoitus pätevyydestä tämän testimenetelmän osalta ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Testimenettely:

— tiedot käytetystä testimenettelystä (myös altistusjakson jälkeen käytetyistä pesumenettelyistä)

— testikemikaalin ja käytettyjen kontrollikemikaalien annokset

— altistusjakson (-jaksojen) kesto ja altistuslämpötila(t)

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille (tarvittaessa)

— testikemikaalia ja kontrolleja kohti käytettyjen rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä (positiivinen kontrolli, negatiivinen kontrolli, NSMTT, NSCliving ja NSCkilled, tarvittaessa) altistuskertaa kohti

— kuvaus sovelletuista päätöksentekoperusteista / käytetystä ennustemallista käytetyn RhE-mallin perusteella

— kuvaus testimenettelyjen (ja pesumenettelyjen) mahdollisista muutoksista.

Testiajo ja testin hyväksymisperusteet:

— positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvot ja hyväksymisalue aikaisempien tietojen perusteella

— rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu positiivisten ja negatiivisten kontrollien osalta

— rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu testikemikaalin osalta.

Tulokset:

— Taulukkomuotoiset tiedot yksittäisistä testikemikaaleista ja kontrolleista jokaiselta altistusjaksolta, jokaisesta testiajosta ja jokaisesta rinnakkaismittauksesta sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys, kudosten keskimääräinen prosentuaalinen elinkykyisyys, rinnakkaisnäytteiden väliset erot, keskihajonnat ja/tai variaatiokertoimet tarvittaessa.

— Tarvittaessa tulokset kontrolleista, joita käytettiin suorien MTT:n pelkistimien ja/tai värjäävien testikemikaalien yhteydessä, sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, rinnakkaisnäytteiden väliset erot, keskihajonnat ja/tai variaatiokertoimet (tarvittaessa) ja lopullinen oikea kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys

— Testikemikaalista (-kemikaaleista) ja kontrollikemikaaleista saadut tulokset tietyssä testiajossa ja testin hyväksymisperusteisiin nähden.

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

— Tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

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

(2) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(3) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* -ihosyövyttävyys.

(4) Tämän liitteen luku B.65, *In vitro* -kalvoestetestimenetelmä.

(5) Tämän liitteen luku B.46, *In vitro* -ihoärsyttävyys: rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(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., 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*. Teoksessa: *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 1 000 (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). Saatavana osoitteessa [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (25).

Solujen elinkykyisyys: Parametri, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta, esimerkiksi solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kykyä pelkistää väriaine MTT (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi eli tiatsolyylisininen), joka korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn mitatun päätetapahtuman ja testimenetelmän mukaan.

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (25).

ET_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 prosenttia annosteltaessa vertailukemikaalia tiettynä määrättynä pitoisuutena; katso myös IC_{50}.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

HPLC: Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

IC_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC50) sovitun altistusajan jälkeen; katso myös ET_{50}.

Rajoittamaton annos: Orvasketeen applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan orvaskeden pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Seos: Seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta keskenään reagoimattomasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

MTT: 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi; tiatsolyylisininen tetrasoliumbromidi.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

ES: Ei syövyttävä.

NSC_{killed}-kontrolli: Epäspesifi värikontrolli kuolleissa kudoksissa.

NSC_{living}-kontrolli: Epäspesifi värikontrolli elävissä kudoksissa.

NSMTT: Epäspesifi MTT:n pelkistys.

OD: Optinen tiheys

PK: Positiivinen kontrolli, näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat, ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat luotettavuuden ja tarkkuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (25).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (25).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (25).

Testiajo: Testiajo koostuu yhden tai useamman testikemikaalin testaamisesta samanaikaista negatiivista ja positiivista kontrollia käyttäen.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmällä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (25).

Ihosyövyttävyys *in vivo*: Korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet, 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmässä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (25).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UPLC: Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Lisäys 2

IHOSYÖVYTTÄVYYDEN TESTAUKSEEN VALIDOITUJEN RHE-MALLIEN PÄÄOSAT

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Mallin pinta-ala	0,3 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä	Vähintään 2 altistuskertaa kohti	2 tai 3 altistuskertaa kohti	Vähintään 2 altistuskertaa kohti	Vähintään 2 altistuskertaa kohti
Altistusannokset ja niiden applikointi	Nestemäiset ja viskoosit aineet: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Kiinteät aineet: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl NaCl-liuosta (9 g/l) Vahamaiset/tahmeat aineet: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2), nailonverkkosuodatin	Nestemäiset aineet: 50 µl (79,4 µl/cm^2) nailonverkkosuodattimen kanssa tai ilman sitä *Testikemikaalin ja nailonverkkosuodattimen yhteensopivuus ennen testiä* Puolikiinteät aineet: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Kiinteät aineet: 25 µl H_2O (tai tarvittaessa enemmän) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vahamaiset aineet: Litteä ”levymäinen”, halkaisijaltaan n. 8 mm:n pala laitetaan 15 µl:llä vettä kostutetun kudoksen päälle.	Nestemäiset ja viskoosit aineet: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2), nailonverkkosuodatin *Testikemikaalin ja nailonverkkosuodattimen yhteensopivuus ennen testiä* Kiinteät aineet: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vahamaiset/tahmeat aineet: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2), nailonverkkosuodatin	Nestemäiset aineet: 50 µl (83,3 µl/cm^2), nailonverkkosuodatin *Testikemikaalin ja nailonverkkosuodattimen yhteensopivuus ennen testiä* Puolikiinteät aineet: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Kiinteät aineet: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (tarvittaessa enemmän) Vahamaiset aineet: Litteä ”keksimäinen”, halkaisijaltaan n. 8 mm:n pala laitetaan 15 µl:llä vettä kostutetun kudoksen päälle

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Suoraa MTT:n pelkistystä koskeva esitesti	50 µl (nestemäinen aine) tai 20 mg (kiinteä aine)+ 2 ml MTT:tä 0,3 mg/ml liuosta, 180 ± 5 min 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit veteen säilötyillä kuolleilla kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine)+ 1 ml MTT:tä 1 mg/ml liuosta 60 minuutin ajan 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit pakastetuilla kuolleilla kudoksilla.	40 µl (nestemäinen aine) tai 20 mg (kiinteä aine)+ 1 ml MTT:tä 1 mg/ml liuosta 180± 15 min., 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit pakastetuilla kuolleilla kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine)+ 1 ml MTT:tä 1 mg/ml liuosta 60 minuutin ajan 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit pakastetuilla kuolleilla kudoksilla.
	Väri-interferenssin esitesti	10 µl (nestemäinen aine) tai 10 mg (kiinteä aine) + 90 µl H_2O sekoitetaan, 15 min huoneenlämpötilassa → Jos liuos värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine) + 300 µl H_2O 60 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.	40 µl (nestemäinen aine) tai 20 mg (kiinteä aine) + 300 µl H_2O sekoitetaan, 60 min huoneenlämpötilassa → Jos testikemikaali värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.
50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine) + 300 µl H_2O 60 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.				
Altistus-aika ja lämpötila	3 min, 60 min (± 5 min) ja 240 min (± 10 min) Vetokaapissa Huoneenlämpötila (HLT, 18–28°C)	3 min HLT:ssä ja 60 min 37°C:ssa, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min HLT:ssä ja 60 min 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min HLT:ssä ja 60 min 37°C:ssa, 5 % CO_2, 95 % RH
Huuhtelu	25 ml 1x fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) (2 ml/kpl)	20 kertaa jatkuvalla pehmeällä suihkulla 1x PBS:ää	20 kertaa jatkuvalla pehmeällä suihkulla 1x PBS:ää	20 kertaa jatkuvalla pehmeällä suihkulla 1x PBS:ää

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negatiivinen kontrolli	50 µl NaCl-liuosta (9 g/l) Testataan jokaisella altistuskerralla	50 µl H_2O:ta Testataan jokaisella altistuskerralla	40 µl H_2O:ta Testataan jokaisella altistuskerralla	50 µl H_2O:ta Testataan jokaisella altistuskerralla
Positiivinen kontrolli	50 µl jääetikkahappoa Testataan vain 4 tunnin ajan	50 µl 8N KOH:ta Testataan jokaisella altistuskerralla	40 µl 8N KOH:ta Testataan vain 1 tunnin ajan	50 µl 8N KOH:ta Testataan jokaisella altistuskerralla
MTT-liuos	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT:n inkubointi aika ja lämpötila	180 min (± 15 min), 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min), 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
	Uuttoliuos	500 µl happamoitettua isopropanolia (0,04 N HCl isopropanolissa) (eristetty kudos kokonaan upoksissa)	2 ml isopropanolia (uutto insertin ylä- ja alapäästä)	1,5 ml isopropanolia (uutto insertin ylä- ja alapäästä)
	2 ml isopropanolia (uutto insertin ylä- ja alapäästä)			
Uuttoaika ja lämpötila	Yön yli HLT:ssä, valolta suojattuna	Yön yli ravistamatta HLT:ssä tai 120 min ravistamalla (~120 rpm) HLT:ssä	Yön yli ravistamatta HLT:ssä tai 120 min ravistamalla (~120 rpm) HLT:ssä	Yön yli ravistamatta HLT:ssä tai 120 min ravistamalla (~120 rpm) HLT:ssä

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
OD-lukemat	570 nm (545–595 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (tai 540 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (540–600 nm) ilman vertailusuodatinta	540–570 nm ilman vertailusuodatinta
Kudoksen laadunvalvonta	18 tunnin käsittely SDS:llä 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla 4,08 h ≤ ET_{50} ≤ 8,7 h	Käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla 4,0 h ≤ ET_{50} ≤ 10,0 h	Käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla 2,0 h ≤ ET_{50} ≤ 7,0 h
Hyväksymisperusteet	1. Negatiivisella kontrollilla (NaCl) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,6 ja ≤ 1,5 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (jääetikkahappo) neljän tunnin ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava ≤ 20 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 % ja kun OD-arvot ovat ≥ 0,3, kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkykyisyyden välinen ero saa olla enintään 30 %.	1. Negatiivisella kontrollilla (H_2O) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,8 ja ≤ 2,8 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (8N KOH) yhden tunnin ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava < 15 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 prosenttia, rinnakkaiskudosnäytteiden välisen variaatiokertoimen on oltava ≤ 30 %	1. Negatiivisella kontrollilla (H_2O) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,8 ja ≤ 3,0 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (8N KOH) yhden tunnin (tai tarvittaessa 4 tunnin) ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava < 15 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 % ja kun OD-arvot ovat ≥ 0,3, kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkykyisyyden välinen ero saa olla enintään 30 %.	1. Negatiivisella kontrollilla (H_2O) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,8 ja ≤ 2,8 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (8N KOH) yhden tunnin ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava < 20 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 % ja kun OD-arvot ovat ≥ 0,3, kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkykyisyyden välinen ero saa olla enintään 30 %.

Lisäys 3

TESTIMALLIEN SUORITUSKYKY ALALUOKKIIN LUOKITTELEMISESSA

Jäljempänä olevassa taulukossa esitetään neljän testimallin suorituskyvyt, jotka on laskettu neljän testin kehittäjien testaaman 80 kemikaalin sarjan perusteella. Laskelmat laati OECD:n sihteeristö, ja asiantuntijaryhmä tarkasti ja hyväksyi ne (21) (23).

EpiSkin™-, EpiDerm™-, SkinEthic™- ja epiCS®-testimalleilla voidaan luokitella kemikaaleja myös alaluokkiin (ts. 1A vs. 1B ja 1C vs. syövyttämättömät aineet).

Neljän testimallin suorituskyvyt, yliluokitus- ja aliluokitusasteet ja tarkkuus (ennustuskyky) perustuvat 80 kemikaalin sarjaan. Kaikki nämä kemikaalit testattiin kahdella tai kolmella testiajolla jokaisen testimallin osalta:

TILASTOT KOKO KEMIKAALISARJASTA SAADUISTA ENNUSTEISTA

(n = 80 kemikaalia, jotka testattiin epiCS®-mallin osalta kahdella riippumattomalla testiajolla tai EpiDerm™ SCT-, EpiSkin™- ja SkinEthic™ RHE -testimallien osalta kolmella riippumattomalla testiajolla; luokituksia on siis joko 159 (*) tai 240)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Yliluokitukset:				
1B ja 1C, yliluokitus 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
ES, yliluokitus 1B ja IC	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
ES, yliluokitus 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Yliluokitus korj.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Yliluokituksen kokonaisaste (kaikki luokat)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Aliluokitukset:				
1A, aliluokitus 1B ja IC	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A, aliluokitus ES	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B ja 1C, aliluokitus ES	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Aliluokituksen kokonaisaste (kaikki luokat)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Oikeat luokitukset:				
Oikein luokiteltu 1A:han	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Oikein luokiteltu 1B:hen ja 1C:hen	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Oikein luokiteltu ES:ksi	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Yleinen tarkkuus	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

ES: Ei syövyttävä

(*) Yksi kemikaali testattiin saatavuusongelmien vuoksi vain kerran EpiCS®-mallilla (23).

Lisäys 4

Keskeiset parametrit ja hyväksymisperusteet, joiden mukaan HPLC-/UPLC-spektrometriajärjestelmä voidaan hyväksyä RhE-kudoksesta uutetun MTT-formatsaanin mittaamiseen

Parametri	Protokolla peräisin FDA:n ohjeista (37) (38)	Hyväksymisperusteet
Valikoivuus	Analyysi: isopropanoli, eläviä soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute elävistä RhE-kudoksista ilman käsittelyä), kuolleita soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute kuolleista RhE-kudoksista ilman käsittelyä)	$Alue_{interferenssi}$ ≤ 20 % $Alue_{LLOQ}$ ([1]):sta
Täsmäävyys	Laatukontrollit (esim. MTT-formatsaani pitoisuuksina 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanolilla (n=5)	CV ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Tarkkuus	Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	%Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Matriisivaikutus	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=5)	85 % ≤ matriisivaikutus % ≤ 115 %
Kulkeutuminen	Isopropanolin analysointi ULOQ ([2])-standardin mukaan	$Alue_{interferenssi}$ ≤ 20 %$Alue_{LLOQ}$:sta
Toistettavuus (päivänsisäinen)	3 riippumatonta kalibrointikäyrää (perustuen 6 peräkkäiselle 1/3-laimennokselle MTT-formatsaanista isopropanolissa ULOQ-arvosta alkaen, ts. 200 µg/ml); Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	Kalibrointikäyrät: %Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta Laatukontrollit: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Toistettavuus (päivänsisäinen)	Päivä 1: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 2: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 3: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)	
MTT-formatsaanin lyhytaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja 24 tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %
MTT-formatsaanin pitkäaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa (tarvittaessa)	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja muutaman päivän kuluttua tietyssä lämpötilassa (esimerkiksi 4 °C, -20 °C, -80 °C) säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %”

([1]) LLOQ: Alempi määritysraja, määritetty kattamaan kudoksen elinkykyisyys, kun se on 1–2 prosenttia, esim. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Ylempi määritysraja, määritetty olemaan vähintään kaksi kertaa suurempi kuin suurin odotettu MTT-formatsaanipitoisuus negatiivisten kontrollien isopropanoliuutteissa, esim. 200 µg/ml.

7) Korvataan B osassa oleva B.46 luku seuraavasti:

"B.46 **IN VITRO -IHOÄRSYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 439 (2015). Ihoärsytyksellä tarkoitetaan korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen [kuten on määritelty Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals)] (1) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa Euroopan unionin asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]). Tässä testimenetelmässä selostetaan *in vitro* -menettely, jolla voidaan määrittää ärsyttävien kemikaalien (aineiden ja seosten) vaarallisuus YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti (2). Alueilla, joilla ei ole hyväksytty YK:n GHS-järjestelmän valinnaista luokkaa 3 (lievästi ärsyttävät aineet), tätä testimenetelmää voidaan käyttää myös luokittelemattomien kemikaalien määrittämiseen. Sovellettavan sääntelykehyksen ja luokitusjärjestelmän mukaan tämän testimenetelmän avulla voidaan määrittää kemikaalien ihoärsyttävyys joko yksittäisenä korvaavana testinä *in vivo* -ihoärsytystestauksen sijasta tai osittaisena korvaavana testinä tietyssä testausstrategiassa (3).

2. Ihoärsyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä [testimenetelmä B.4, vastaa OECD:n testiohjetta 404, joka hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 1981 ja jota on tarkistettu vuosina 1992, 2002 ja 2015] (4). Syövyttävyyden testaamiseen on hyväksytty kolme validoitua *in vitro* -testimenetelmää, jotka ovat EU:n testimenetelmät B.40 (vastaa OECD:n testiohjetta 430), B.40 a (vastaa OECD:n testiohjetta 431) ja B.65 (vastaa OECD:n testiohjetta 435) (5) (6) (7). Ihosyövyttävyyden ja -ärsyttävyyden testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja sisältävässä OECD:n ohjeasiakirjassa on useita moduuleita, joihin on ryhmitelty erilaisia tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä i) annetaan ohjeita siitä, miten yhdistellä ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja muita tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa ja ii) selostetaan, miten toimia, kun lisätestaus on tarpeen (3).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Tämä *in vitro* -testijärjestelmään pohjautuva menetelmä perustuu rekonstruoituun ihmisen orvasketeen (Reconstructed human Epidermis, RhE), joka jäljittelee läheisesti ihmisihon ylemmän kerroksen eli epidermiksen biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. RhE-testijärjestelmässä käytetään ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä peräisin olevia soluja, ja testissä käytetään edustavaa kudos- ja soluarkkitehtuuria. Saatavana on myös suoritusvaatimukset, joilla voidaan validoida ja arvioida samanlaisia ja muunnettuja rekonstruoituun ihmisen orvasketeen perustuvia testimenetelmiä OECD:n ohjeasiakirjassa 34 esitettyjen periaatteiden mukaisesti (8) (9). Menetelmää vastaavat testiohjeet hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 2010. Testiohje päivitettiin vuonna 2013 lisäämällä siihen uusia RhE-malleja ja vuonna 2015 lisäämällä siihen viittauksia testauksen ja arvioinnin yhdennettyihin lähestymistapoihin ja ottamalla käyttöön elinkykyisyyden mittaamiseen tarkoitettu vaihtoehtoinen menettely.

4. Validointia edeltäviä optimointi- ja validointitutkimuksia on tehty neljästä kaupallisesti saatavilla olevasta *in vitro* -testimallista (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), jotka perustuvat RhE-testijärjestelmään (herkkyys 80 %, spesifisyys 70 % ja tarkkuus 75 %). Nämä neljä testimallia sisältyvät tähän testimenetelmään, ja ne on lueteltu lisäyksessä 2, jossa on myös tietoa kyseisten testimenetelmien validoimisessa käytetyn validointitutkimuksen tyypistä. Kuten lisäyksessä 2 on todettu, tämän testimenetelmän ja sitä koskevien suoritusvaatimusten kehittämisessä on käytetty validoitua vertailumenetelmää (VVM:ää) (8).

5. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten (8) mukaisesti validoitujen testimallien osalta, jos OECD on tarkistanut ja hyväksynyt nämä testimallit. Maat voivat käyttää tässä testimenetelmässä ja sitä vastaavassa OECD:n testiohjeessa olevia testimalleja määrittäessään ihoärsyttävyyden *in vitro* -testimenetelmien testituloksia koskevia vaatimuksiaan, ja samalla ne voivat hyödyntää tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

6. Tässä asiakirjassa käytettävien termien määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

7. Kuten RhE-testimalleja arvioivassa ja luonnehtivassa täysimittaisessa prospektiivisessa validointitutkimuksessa on osoitettu (16), tämän testimenetelmän rajoituksena on se, ettei kemikaalien luokittelu YK:n valinnaiseen GHS-luokkaan 3 (lievästi ärsyttävät aineet) ole mahdollista (1). Se, miten tätä testimenetelmää käytetään, määrätään jäsenvaltioiden sääntelykehyksessä. EU:ssa luokkaa 3 ei ole sisällytetty CLP-asetuksen mukaiseen luokitukseen. Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava ihosyövyttävyyden ja -ärsytytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (3). Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

8. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Vaikka tällä testimenetelmällä ei saada riittävästi tietoja ihosyövyttävyydestä, on syytä panna merkille, että ihosyövyttävyyttä koskeva B.40a-testimenetelmä (joka vastaa OECD:n testiohjetta 431) perustuu samaan RhE-testijärjestelmään, mutta siinä käytetään toisenlaista tutkimusprotokollaa (6). Tässä selostettu menetelmä perustuu RhE-malleihin, joissa käytetään ihmisistä peräisin olevia keratinosyyttejä, jotka näin ollen edustavat tarkasteltavana olevan lajin kohde-elintä *in vitro*. Menetelmä kattaa suoraan myös aluksi esiintyvän tulehdusreaktion ja/tai reaktiomekanismin (soluvauriot ja paikalliseen vammaan johtavat kudosvauriot), joka tapahtuu *in vivo* -ärsytyksen aikana. Tämän testimenetelmän validoinnin yhteydessä on testattu useita erilaisia kemikaaleja, ja validointitutkimuksen tietokannassa on yhteensä 58 kemikaalia (16) (18) (23). Testimenetelmää voidaan käyttää kiinteisiin, nestemäisiin, puolikiinteisiin ja vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauheeksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa (29). Vaikka niitä voidaan teoriassa testata RhE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei kuitenkaan voida testata.

9. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Koska seoksia kuuluu moneen eri luokkaan ja niiden koostumukset ovat moninaisia ja koska seosten testaamisesta on tällä hetkellä saatavilla niukasti tietoa, niissä tapauksissa, joissa voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen seosluokkien kanssa (esimerkiksi Eskesin ja muiden (2012) ehdottaman strategian mukaisesti (30)), testimenetelmää ei pidä käyttää näiden seosluokkien yhteydessä. Näin on toimittava myös silloin, jos tiettyjen kemiallisten luokkien tai fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien osalta todetaan, etteivät ne sovellu tämän testimenetelmän kanssa käytettäviksi.

10. Testikemikaalit, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituudella kuin MTT-formatsaani, ja testikemikaalit, jotka voivat suoraan pelkistää MTT-vitaaliväriä (MTT-formatsaaniksi), voivat häiritä solujen elinkykyisyysmittauksia, ja niiden yhteydessä on käytettävä mukautettuja kontrolleja korjauksiin (ks. 28–34 kohta).

11. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä kolme kudosnäytettä käsittävässä testiajossa. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos keskimääräinen elinkyky on 50 ± 5 %, on harkittava toista testiajoa ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

TESTIN PERIAATE

12. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen RhE-malliin, joka koostuu ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneitten solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lamellaarisia lipidikerroksia, jotka edustavat lipidiluokkia, joita havaitaan myös in vivo -kokeissa.

13. Kemikaalien aiheuttama ihoärsytys, joka ilmenee eryteemana ja ödeemana, johtuu tapahtumasarjasta, joka käynnistyy, kun kemikaalit läpäisevät marraskeden ja alla olevat keratinosyyteistä ja muista ihosoluista koostuvat kerrokset vaurioituvat. Vaurioituneista soluista voi joko vapautua tulehduksen välittäjäaineita tai ne voivat käynnistää tulehdusreaktion, joka vaikuttaa myös verinahan soluihin, etenkin verisuonten stromaalisiin ja endoteelisoluihin. Havaitut eryteema ja ödeema johtuvat endoteelin solujen laajentumisesta ja tavallista suuremmasta läpäisevyydestä (29). Jos *in vitro* -testijärjestelmällä ei havaita verisuonittumista, RhE-tekniikkaan perustuvilla testimenetelmillä mitataan reaktion käynnistäviä tapahtumia eli solu- tai kudosvauriota (16) (17), ja arvona käytetään solujen elinkykyisyyttä.

14. RhE-malleissa solujen elinkyvyn mittaus perustuu siihen, että entsyymit muuntavat väriaine MTT:n (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi, tiatsolyylisininen; CAS-nro 298-93-1] siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti, kun se on uutettu kudoksista (31). Ärsytystä aiheuttavat kemikaalit tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkykyä määritettyjen kynnysarvojen alle (ts. ≤ 50 % YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 osalta). Kulloisenkin sääntelyjärjestelmän ja testimenetelmän sovellettavuuden mukaan voidaan katsoa, että kemikaalit, joiden yhteydessä solujen elinkyky on määritettyä kynnysarvoa suurempi, eivät ole ärsyttäviä (ts. > 50 %, ei luokitusta).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

15. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään neljää tähän testimenetelmään liittyvää validoitua testimallia (lisäys 2) rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä taulukossa 1 lueteltujen pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden avulla. Jos lueteltua ainetta ei ole saatavilla, myös muita aineita voidaan käyttää, jos niistä on saatavilla asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelossa (8)), mikäli sovelletaan samoja valintaperusteita kuin taulukossa 1 kuvatut. Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun vaihtoehtoisen aineen käyttö on perusteltava.

16. Osana pätevyyden testausta käyttäjien on kudosten vastaanoton jälkeen tarkastettava kudosten läpäisevyysominaisuudet RhE-mallin laatijan vaatimusten mukaisesti. Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun testimenetelmä on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys sen käytössä on saatu ja osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos testimenetelmää käytetään säännöllisesti, läpäisevyysominaisuudet on kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet [1]

Aine	CAS-nro	*In vivo* -tulos [2]	Fysikaalinen olomuoto	YK:n GHS-luokka
LUOKITTELEMATTOMAT AINEET (YK:N GHS: EI LUOKITUSTA)				
Naftaleenietikkahappo	86-87-3	0	Kiinteä	Ei luokitusta
Isopropanoli	67-63-0	0,3	Neste	Ei luokitusta
Metyylistearaatti	112-61-8	1	Kiinteä	Ei luokitusta
Heptyylibutyraatti	5870-93-9	1,7	Neste	Ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) [3]
Heksyylisalisylaatti	6259-76-3	2	Neste	Ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) [3]
LUOKITELLUT AINEET (YK:n GHS-luokka 2)				
Syklameenialdehydi	103-95-7	2,3	Neste	Luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	2,7	Neste	Luokka 2
Kaliumhydroksidi (5 % liuos vedessä)	1310-58-3	3	Neste	Luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	3,3	Kiinteä	Luokka 2
Heptanaali	111-71-7	3,4	Neste	Luokka 2

(1) Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet ovat joukko validointitutkimuksessa käytettyjä aineita, ja niiden valintaperusteet ovat seuraavat: i) kemikaalit ovat kaupallisesti saatavilla; ii) ne edustavat koko Draizen ärsyttävyyspisteytysasteikkoa (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään); iii) niiden kemiallinen rakenne on tarkkaan määritetty; iv) niiden kemiallinen funktio on sama kuin validointiprosessissa käytettyjen kemikaalien; v) niistä on saatu toistettavia *in vitro* -tuloksia monissa testeissä ja monissa laboratorioissa; vi) niitä koskevat ennusteet *in vitro* -testeissä olivat oikeat ja vii) niillä ei ole erittäin toksisia ominaisuuksia (esimerkiksi karsinogeenisia tai lisääntymisjärjestelmälle myrkyllisiä ominaisuuksia), eivätkä niiden hävityskustannukset ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

(2) *In vivo* -tulokset testimenetelmän B.4 mukaan (4).

(3) Tässä testimenetelmässä katsotaan, että YK:n GHS-järjestelmän valinnainen luokka 3 (lievästi ärsyttävät aineet) (1) vastaa luokitusta ”ei luokitusta”.

MENETTELY

17. Jäljempänä kuvataan ihoärsyttävyysarvioinnissa käytettävän RhE-testimenetelmän osat ja menettelyt (ks. myös kunkin testimallin parametrit lisäyksestä 3). Tämän testimenetelmän mukaiselle neljälle mallille on saatavana myös vakiotoimintamenettelyt (32) (33) (34) (35).

RHE-TESTIMENETELMÄN OSAT

Yleiset ehdot

18. Epiteelin valmistamiseen on käytettävä muuntamattomia ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä on oltava useita kerroksia ja olennainen lipidikoostumus, jotta se voi toimia esteenä sytotoksisten vertailukemikaalien, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopealle kulkeutumiselle ihokerrosten läpi. Läpäisynestokyky on osoitettava, ja se voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) tietyn altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}), kun vertailukemikaalia käytetään tiettynä kiinteänä pitoisuutena. Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy, sillä marraskeden ympärillä olevien testikemikaalien pääsy kudokseen heikentää mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. RhE-mallissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

Toimintaolosuhteet

Solujen elinkyky

19. Solujen elinkyky määritetään MTT-määritysmenetelmällä (31). RhE-kudoksen elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n saostuneeksi siniseksi MTT-formatsaaniksi, joka uutetaan kudoksista isopropanolilla (tai muulla vastaavalla liuottimella). Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden (OD) on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida käyttämällä joko vakioabsorbanssimittausta (OD) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa (36). RhE-mallien käyttäjien on varmistettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut vaatimukset. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo) (ihoärsytystestimenetelmän olosuhteissa). Tähän testimenetelmään sisältyvän neljän validoidun RhE-testimallin hyväksyttävyysalueet esitetään taulukossa 2. HPLC-/UPLC-spektrofotometrian käyttäjän on käytettävä taulukossa 2 esitettyjä negatiivisen kontrollin OD-vaihteluvälejä negatiivisen kontrollin hyväksymisperusteena. Negatiivisella kontrollikemikaalilla käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset elinkykytulokset) testin altistusjakson ajan on dokumentoitava.

Taulukko 2

Tähän testimenetelmään sisältyvien testimallien negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalueet

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
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

Läpäisynestokyky

20. Marraskeden ja sen lipidikoostumuksen on oltava riittävä vastustamaan sytotoksisten vertailukemikaalien, esimerkiksi SDS:n tai Triton X-100:n, nopeaa läpäisyä, kun sitä arvioidaan IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä (taulukko 3).

Morfologia

21. RhE-malli on tutkittava histologisesti, ja on osoitettava, että rekonstruktiolla on ihmisen orvaskeden kaltainen rakenne (myös monikerroksinen marraskesi).

Toistettavuus

22. On osoitettava, että testimenetelmän positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saadut tulokset ovat toistettavissa pidemmällä aikavälillä.

Laadunvalvonta

23. RhE-mallia tulee käyttää vain, jos RhE-mallin kehittäjä/toimittaja osoittaa, että kukin RhE-mallin erä täyttää määritetyt tuotantokriteerit, joiden joukosta elinkykyisyyttä (19 kohta), läpäisyn estoa (20 kohta) ja morfologiaa (21 kohta) koskevat perusteet ovat merkityksellisimmät. Nämä tiedot on annettava testimenetelmän käyttäjille, jotta he voivat ilmoittaa tiedot testiraportissa. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä IC_{50}- tai ET_{50}-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo). Ainoastaan hyväksytyillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi ärsytyksen luokittelua varten. Tähän testimenetelmään sisältyvän neljän testimallin hyväksyttävyysalueet esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Tähän testimenetelmään sisältyvien testimallien erän vapauttamiskriteerit laadunvalvonnassa

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (SM) (18 tunnin käsittely SDS:llä) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 tunnin käsittely SDS:llä) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

24. Kutakin testikemikaalia ja kutakin kontrollia kohti on testiajossa käytettävä vähintään kolmea näytettä. Sekä nestemäisiä että kiinteitä kemikaaleja käytettäessä testikemikaalia on annosteltava riittävä määrä tasaisesti orvaskeden pinnalle kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta. Käytettävän määrän on siis oltava 26–83 µl/cm^2 tai mg/cm^2 (ks. lisäys 3). Kiinteitä kemikaaleja käytettäessä orvaskeden pinta on kostutettava deionisoidulla tai tislatulla vedellä ennen aineen annostelua, jotta testikemikaalin ja orvaskeden pinnan välinen kosketus olisi parempi. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Tietyissä tapauksissa voidaan käyttää nailonverkkoa apuna aineen levittämisessä (ks. lisäys 3). Altistuksen jälkeen testikemikaali on huuhdeltava huolellisesti orvaskeden pinnalta sopivalla vesipitoisella puskuriliuoksella tai 0,9-prosenttisella natriumkloridilla. Sen mukaan, mitä RhE-testimallia käytetään, altistusaika vaihtelee 15 ja 60 minuutin välillä. Inkubointilämpötilan tulee olla 20–37 °C. Altistusajat ja lämpötilat on optimoitu kunkin yksittäisen RhE-mallin mukaiselle testimenetelmälle, ja ne edustavat testimallien erilaisia luontaisia ominaisuuksia (kuten läpäisyn estoa) (ks. lisäys 3).

25. Kussakin testiajossa on käytettävä samanaikaisesti negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla), läpäisyn esto ja altistuksesta seuraava kudoksen herkistyminen (positiivisella kontrollilla) ovat pidemmällä aikavälillä määritetyn hyväksyttävyysalueen mukaiset. Positiivisena kontrolliaineena suositellaan käytettäväksi 5-prosenttista SDS-vesiliuosta. Suositeltavat negatiiviset kontrolliaineet ovat vesi tai fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS).

Solujen elinkykymittaukset

26. Tärkeintä testimenettelyssä on se, että elinkykymittauksia ei tehdä heti testikemikaaleille altistamisen jälkeen, vaan vasta, kun kudokset on käsittelyn jälkeen huuhdeltu ja ne ovat olleet käsittelyn jälkeen riittävän pitkän inkubaatioajan tuoreessa kasvatusliuoksessa. Inkubaatioaika mahdollistaa sekä palautumisen heikoista sytotoksisista vaikutuksista että selkeiden sytotoksisten vaikutusten ilmaantumisen. Kahden RhE-pohjaisen testimallin optimointivaiheessa (11) (12) (13) (14) (15) todettiin, että 42 tuntia kestävä inkubaatioaika käsittelyn jälkeen on optimaalinen.

27. MTT-määritysmenetelmä on standardoitu kvantitatiivinen menetelmä, jota on käytettävä solujen elinkyvyn mittaamiseen tässä testimenetelmässä. MTT-menetelmä sopii käytettäväksi kolmiulotteisen kudosrakenteen kanssa. Kudosnäyte asetetaan kolmeksi tunniksi sopivan vahvuiseen MTT-liuokseen (esimerkiksi 0,3–1 mg/ml). Elinkykyiset solut muuntavat MTT:n siniseksi formatsaaniksi. Saostunut sininen formatsaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esimerkiksi isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 nm:ssä käyttäen enintään ± 30 nm:n kaistanpäästösuodatinta tai käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa (ks. 34 kohta) (36).

28. Testikemikaalin optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen reaktio MTT:n kanssa voivat aiheuttaa sen, että määritysmenetelmällä saadaan väärä arvio elinkyvystä (koska kemikaalit voivat estää värin muodostumisen tai vaihtoehtoisesti aiheuttaa sen). Näin voi tapahtua, jos tietty testikemikaali ei kokonaan poistu kudoksesta huuhtelemalla tai jos se imeytyy orvasketeen. Jos testikemikaali reagoi suoraan MTT:n kanssa (MTT:n pelkistin), on luonnostaan värillinen tai värjäytyy kudoksen käsittelyn aikana, on käytettävä lisäkontrolleja, jotta testikemikaalin vaikutus solujen elinkyvyn mittaustekniikkaan voidaan osoittaa ja korjata (ks. 29 ja 33 kohta). MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti kyseistä neljää, tähän testimenetelmään sisältyvää validoitua mallia koskevissa vakiotoimintamenettelyissä (32) (33) (34) (35).

29. Jotta suorat MTT:n pelkistimet voidaan tunnistaa, on jokainen testikemikaali lisättävä tuoreeseen MTT-liuokseen. Jos testikemikaalia sisältävä MTT-seos muuttuu siniseksi tai violetiksi, testikemikaalin oletetaan olevan suora MTT:n pelkistin, jolloin on tehtävä toiminnallinen tarkastus kuolleilla RhE-kudoksilla riippumatta siitä, käytetäänkö vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa. Tässä toiminnallisessa lisätarkastuksessa käytetään kuolleita kudoksia, joiden metabolinen aktiivisuus on vähäistä mutta jotka absorboivat testikemikaalia yhtä paljon kuin elinkykyiset kudokset. Kutakin MTT:tä pelkistävää testikemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle sellaiselle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan, jotta saadaan aikaan epäspesifi MTT:n pelkistys (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Yksi NSMTT-kontrolli testikemikaalia kohti riittää itsenäisesti suoritettujen testien/testiajojen lukumäärästä riippumatta. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: MTT:n pelkistimelle altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys vähennettynä samalle MTT:n pelkistimelle altistettujen kuolleiden kudosten epäspesifisen MTT-pelkistyksen prosenttiosuudella laskettuna suhteessa negatiiviseen kontrolliin, joka testattiin samanaikaisesti korjattavan testin kanssa (%NSMTT).

30. Jotta voidaan tunnistaa värillisten testikemikaalien tai kosketuksessa veteen tai isopropanoliin värjäytyvien testikemikaalien aiheuttama mahdollinen interferenssi ja päättää, tarvitaanko lisäkontrolleja, testikemikaalista on tehtävä spektrianalyysi vedessä (ympäristö altistuksen aikana) ja/tai isopropanolissa (uuttoliuos). Jos vedessä ja/tai isopropanolissa oleva testikemikaali absorboi valoa alueella 570 ± 30 nm, on käytettävä useampia väriainekontrolleja tai vaihtoehtoisesti on käytettävä HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa, jolloin näitä kontrolleja ei tarvita (ks. 33 ja 34 kohta). Vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä kutakin häiritsevää värillistä testikemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle elinkykyiselle rinnakkaiskudosnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta kasvatusaineessa MTT-inkubointivaiheen aikana, jotta saadaan aikaan epäspesifi värikontrolli (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrolli on tehtävä samanaikaisesti jokaisen värillisellä testikemikaalilla tehtävän testin kanssa (jokaisessa testiajossa) elävien kudosten luontaisen biologisen vaihtelun vuoksi, ja useampien testien yhteydessä on tehtävä riippumaton NSC_{living}-kontrolli. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT-liuoksessa inkuboitujen elävien kudosten elinkykyisyyden prosenttiosuus vähennettynä häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä kasvatusaineessa inkuboitujen elävien kudosten epäspesifisen ja samanaikaisesti korjattavan testin kanssa testatun värikontrollin prosenttiosuudella (%NSC_{living}).

31. Niille testikemikaaleille, joiden todetaan tuottavan sekä suoraa MTT:n pelkistystä (ks. 29 kohta) että väri-interferenssiä (ks. 30 kohta), tarvitaan vielä kolmas kontrollisarja edellisissä kohdissa kuvattujen NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollien lisäksi vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä. Näin on yleensä MTT-määritystä häiritsevien tummien kemikaalien (esimerkiksi sinisten, violettien ja mustien) yhteydessä, koska niiden luontainen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten ne pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan 29 kohdassa kuvatun mukaisesti. Nämä testikemikaalit voivat sitoutua sekä eläviin että kuolleisiin kudoksiin, minkä vuoksiNSMTT-kontrolli

saattaa korjata paitsi testikemikaalin mahdollisesti aiheuttaman suoran MTT:n pelkistyksen myös väri-interferenssin, joka johtuu testikemikaalin sitoutumisesta kuolleisiin kudoksiin. Tämä taas voi johtaa väri-interferenssin kaksinkertaiseen korjaamiseen, koska NSC_{living}-kontrollilla korjataan jo testikemikaalin eläviin kudoksiin sitoutumisesta johtuva väri-interferenssi. Jotta vältetään väri-interferenssin mahdollinen kaksinkertainen korjaaminen, tarvitaan kolmas, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa -kontrolli (NSC_{killed}). Tässä lisäkontrollissa testikemikaalia laitetaan vähintään kahdelle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta kasvatusliuoksessa MTT-inkubointivaiheessa. Yksi NSC_{killed}-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta, mutta se on tehtävä samaan aikaan kuin NSMTT-kontrolli ja samalla kudoserällä, mikäli mahdollista. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: testikemikaalille altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys miinus %NSMTT miinus %NSC $plus_{living}$ häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä kasvatusliuoksessa inkuboitujen kuolleiden kudosten epäspesifisen värin prosentuaalinen osuus laskettuna suhteessa korjattavan testin kanssa samanaikaisesti tehtyyn negatiiviseen kontrolliin ($\%NSC_{killed}$).

32. On tärkeää muistaa, että epäspesifinen MTT:n pelkistys ja epäspesifiset väri-interferenssit voivat kasvattaa kudosuutteiden lukemia spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi. Tämän vuoksi jokaisen laboratorion on määritettävä spektrofotometrinsä lineaarinen asteikko kaupallisesta lähteestä saatavalla MTT-formatsaanilla (CAS-nro 57360-69-7) ennen sääntelytarkoituksiin liittyvien testikemikaalien testaamisen aloittamista. Spektrofotometrillä tehtävä vakioabsorbanssimittaus (optinen tiheys) on asianmukainen suorien MTT:n pelkistimien ja väri-interferenssiä aiheuttavien testikemikaalien määrittämisessä, jos testikemikaalilla käsiteltyjen kudosuutteiden optiset tiheydet (ilman suoran MTT:n pelkistyksen ja/tai väri-interferenssin korjaamista) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon mukaiset tai jos testikemikaalilla saatu korjaamaton prosentuaalinen elinkykyisyys on jo ≤ 50 %. Sellaisia testikemikaaleja, joiden tuottamat %NSMTT- ja/tai $\%NSC_{living}$-arvot ovat ≥ 50 % negatiivisesta kontrollista, koskeviin tuloksiin on kuitenkin syytä suhtautua varauksellisesti, koska se on raja-arvo, jota käytetään luokiteltujen kemikaalien erottamiseen luokittelemattomista (ks. 36 kohta).

33. Niiden värillisten testikemikaalien yhteydessä, jotka eivät sovellu vakioabsorbanssimittaukseen (optinen tiheys), koska ne häiritsevät MTT-määritystä liikaa, voidaan vaihtoehtoisesti käyttää HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa MTT-formatsaanin mittaamiseen (ks. 34 kohta) (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmän avulla MTT-formatsaani voidaan erottaa testikemikaalista ennen sen kvantifiointia (36). Tästä syystä NSC_{living}- tai NSC_{killed}-kontrolleja ei tarvita koskaan HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä siitä riippumatta, mikä testattava kemikaali on. NSMTT-kontrolleja on kuitenkin käytettävä, jos testikemikaalin epäillään olevan suora MTT:n pelkistin tai jos sen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten hyvin se pystyy pelkistämään MTT:tä suoraan (29 kohdassa kuvatun mukaan). Jos MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa, kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin prosentuaalisena huippualueena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Niiden testikemikaalien osalta, jotka pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan, kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan tällä kaavalla: testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saatu kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys miinus %NSMTT. On myös syytä muistuttaa siitä, että suoria MTT:n pelkistimiä, jotka voivat aiheuttaa myös väri-interferenssiä ja jotka pysyvät kudoksissa käsittelyn jälkeen ja pelkistävät MTT:tä niin voimakkaasti, että testattujen kudosuutteiden optiset tiheydet (vakiotiheysmittausta käyttäen) tai huippualueet (UPLC-/HPLC-spektrofotometriaa käyttäen) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella, ei voida määrittää, vaikka tällaista oletetaan tapahtuvan vain hyvin harvoin.

34. HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa voidaan käyttää myös kaikentyyppisten testikemikaalien (värillisten, värittömien, MTT:n pelkistimien ja muiden kuin MTT:n pelkistimien) kanssa MTT-formatsaanin mittaamiseen (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmien moninaisuuden vuoksi näiden järjestelmien asianmukaisuus on osoitettava, ennen kuin niitä käytetään kudosuutteiden MTT-formatsaanin kvantifioimisessa. Järjestelmien on täytettävä tavanomaisten laatuparametrien hyväksymisperusteet Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston bioanalyyttisten menetelmien validointia koskevissa ohjeissa kuvatun mukaisesti (36) (37). Nämä keskeiset parametrit ja niihin liittyvät hyväksymisperusteet esitetään lisäyksessä 4. Kun lisäyksessä 4 määritetyt hyväksymisperusteet täyttyvät, kyseistä HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmää pidetään asianmukaisena ja sillä voidaan mitata MTT-formatsaania tässä testimenetelmässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Hyväksymisperusteet

35. Jokaisessa testimenetelmässä, jossa käytetään valideja RhE-mallieriä (ks. 23 kohta), negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten optisen tiheyden on kuvastettava sellaisten kudosten laatua, joiden osalta on toimittu kaikkien kuljetus- ja vastaanottovaiheiden ja tutkimussuunnitelman menettelyjen mukaisesti. Kontrollien OD-arvot eivät saa olla alhaisemmat kuin pitkähkön aiemman ajanjakson alemmat rajat. Vastaavasti positiivisella kontrollilla, esimerkiksi 5-prosenttisella SDS-vesiliuoksella, käsiteltyjen kudosten on ilmennettävä kudosten kykyä reagoida ärsytystä aiheuttavaan kemikaaliin tämän testimenetelmän mukaisissa olosuhteissa (ks. lisäys 3 ja lisätietoja tähän testimenetelmään sisältyvän neljän testimallin vakiotoimintamenettelyistä kirjallisuusviitteistä (32) (33) (34) (35)). Rinnakkaiskudosnäytteiden välisen vaihtelun (esimerkiksi keskihajonnat) on oltava käytettävälle testimallille vahvistettujen hyväksymisrajojen mukainen (ks. lisäys 3).

Tulosten tulkinta ja ennustemalli

36. Kullakin testikemikaalilla saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen prosentuaalinen elinkyky normalisoituna negatiiviseen kontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 %. HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin prosentuaalisena huippualueena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Solujen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo, jolla ärsyttävät testikemikaalit erotellaan luokittelemattomista testikemikaaleista, ja tulosten arviointiin ja ärsyttävien kemikaalien tunnistamiseen käytettävät tilastomenetelmät on määriteltävä selvästi ja dokumentoitava, ja niiden sopivuus on osoitettava (ks. lisätietoja testimalleja koskevista vakiotoimintamenettelyistä). Ärsyttävyyden ennustetta koskevat raja-arvot esitetään seuraavassa:

— Testikemikaalin katsotaan edellyttävän YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaista luokitusta ja merkintää (luokka 2 tai luokka 1), jos kudoksen prosentuaalinen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on keskimäärin pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 50 prosenttia. Koska tähän testimenetelmään kuuluvilla RhE-testimalleilla ei voida erotella YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisia luokkia 1 ja 2, ihosyövyttävyydestä tarvitaan lisää tietoa, jotta sen lopullinen luokitus voidaan päättää [ks. myös testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskeva OECD:n ohjeasiakirja (3)]. Jos testikemikaalin todetaan olevan syövyttämätön (esimerkiksi testimenetelmän B.40, B.40 a tai B.65 perusteella) ja jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 50 prosenttia, testikemikaalin katsotaan olevan ihoa ärsyttävä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti.

— Sen mukaan, millaista sääntelyjärjestelmää jäsenvaltioissa sovelletaan, voidaan katsoa, että testikemikaali ei aiheuta ärsytystä iholla YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokituksen ”ei luokitusta” mukaisesti, jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on suurempi kuin (>) 50 prosenttia.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

37. Kunkin testin osalta yksittäisiä rinnakkaiskudosnäytteitä koskevat mittaustulokset on esitettävä taulukkona (esimerkiksi kunkin testikemikaalin OD-arvot ja solujen prosentuaalista elinkykyä koskevat tiedot sekä luokittelu). Tarvittaessa on esitettävä myös mittaustulokset toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä kunkin käsittelyn keskiarvo ± keskihajonta. Kunkin testikemikaalin osalta on esitettävä havaittu yhteisvaikutus MTT-reagenssin ja värillisten testikemikaalien kanssa.

Testiraportti

38. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrollikemikaalit:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aine ja seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Käytetty RhE-malli ja protokolla (valinnan osalta perusteluineen, tarvittaessa)

Testiolosuhteet:

— käytetty RhE-malli (ja eränumero)

— mittalaitteen (esimerkiksi spektrofotometrin) kalibrointitiedot, MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetty aallonpituus ja kaistanpäästö (tarvittaessa) sekä mittalaitteen lineaarisuusasteikko MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetyn menetelmän kuvaus

— HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmän asianmukaisuuden kuvaus tarvittaessa täydelliset RhE-mallin käyttöä tukevat tiedot (myös mallin suoritusarvot). Näitä voivat olla esimerkiksi

  i) elinkykyisyys

  ii) läpäisyn esto

  iii) morfologia

  iv) uusittavuus ja ennustettavuus

  v) mallin laatukontrollit

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi laatukontrollitietojen hyväksyttävyys verrattuna aikaisempia eriä koskeviin tietoihin.

— Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla tehtyyn testaukseen perustuva osoitus pätevyydestä tämän testimenetelmän osalta ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Testimenettely:

— tiedot käytetystä testimenettelystä (myös altistusjakson jälkeen käytetyistä pesumenettelyistä) testikemikaalin ja käytettyjen kontrollikemikaalien annokset

— altistusjakson kesto ja altistuslämpötila sekä altistuksen jälkeinen inkubointijakso

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille (tarvittaessa)

— testikemikaalia ja kontrolleja kohti käytettyjen rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä (positiivinen kontrolli, negatiivinen kontrolli, NSMTT, NSC_{living} ja NSC_{killed} tarvittaessa)

— kuvaus sovelletuista päätöksentekoperusteista / käytetystä ennustemallista käytetyn RhE-mallin perusteella

— kuvaus testimenettelyjen (ja pesumenettelyjen) mahdollisista muutoksista.

Testiajo ja testin hyväksymisperusteet:

— positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvot ja hyväksyttävyysalueet aikaisempien tietojen perusteella rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu positiivisten ja negatiivisten kontrollien osalta

— rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu testikemikaalin osalta.

Tulokset:

— Taulukkomuotoiset tiedot yksittäisistä testikemikaaleista jokaisesta testiajosta ja jokaisesta rinnakkaismittauksesta sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys, kudosten prosentuaalisen elinkyvyn keskiarvo ja keskihajonta.

— Tarvittaessa tulokset kontrolleista, joita käytettiin suorien MTT:n pelkistimien ja/tai värjäävien testikemikaalien yhteydessä, sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, keskihajonta ja lopullinen oikea kudoksen prosentuaalinen elinkyky.

— Testikemikaalista (-kemikaaleista) ja kontrolleista saadut tulokset tietyssä testiajossa ja testin hyväksymisperusteisiin nähden.

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

— Tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa 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) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(5) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* -ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

(6) Tämän liitteen luku B.40a *In vitro* -ihosyövyttävyys: Rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(7) Tämän liitteen luku B.65, Kalvoesteeseen perustuva *in vitro* -testimenetelmä.

(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, 109129.

(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. Saatavana osoitteessa 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. *Huom. nämä ovat alkuperäiset suoritusvaatimukset, joita on käytetty kahden testimenetelmän validoinnissa. Näitä suoritusvaatimuksia ei tule enää käyttää, koska saatavilla on päivitetty versio (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. Tekeillä oleva käsikirjoitus.

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

(38) Harvell, J.D., Lammintausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, teoksessa: Practical Contact Dermatitis, s. 7–18 (toim. 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). *Huom. Tämä on ECVAMin suoritusvaatimusten nykyinen versio, joka on päivitetty vuonna 2009 YK:n GHS-järjestelmän täytäntöönpanon yhteydessä. Näitä suoritusvaatimuksia ei tule enää käyttää, koska niistä on saatavilla on päivitetty versio (8), joka liittyy nykyiseen testiohjeeseen.*

(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) Euroopan komissio (2001). Komission direktiivi 2001/59/ EY, annettu 6 päivänä elokuuta 2001, vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkahdeksannen kerran, Euroopan unionin virallinen lehti L 225, s. 1–333.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (9).

Solujen elinkykyisyys: Parametri, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta, esimerkiksi solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kykyä pelkistää väriaine MTT (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi eli tiatsolyylisininen), joka korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn mitatun päätetapahtuman ja testimenetelmän mukaan.

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimalleille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten tulosten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (9).

ET_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 prosenttia annosteltaessa vertailukemikaalia tiettynä määrättynä pitoisuutena; katso myös $IC_{50.}$

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; Yhdistyneiden kansakuntien (YK) maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niihin liittyvät vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

HPLC: Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

IC_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) sovitun altistusajan jälkeen; katso myös ET_{50}.

Rajoittamaton annos: Orvasketeen applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan orvaskeden pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu vähintään kahdesta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

MTT: 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi; tiatsolyylisininen tetrasoliumbromidi.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

NSC_{killed}: Epäspesifi värikontrolli kuolleissa kudoksissa.

NSC_{living}: Epäspesifi värikontrolli elävissä kudoksissa.

NSMTT: Epäspesifi MTT:n pelkistys.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (9).

PK: Positiivinen kontrolli, näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (9).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (9).

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin, ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä (9).

Testiajo: Testiajo koostuu yhden tai useamman testikemikaalin testaamisesta samanaikaista negatiivista ja positiivista kontrollia käyttäen.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Ihoärsyttävyys *in vivo*: Korjautuvan ihovaurion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Ihoärsytys on altistuneen ihokudoksen paikallinen reaktio, joka kehittyy pian stimulaation jälkeen (38). Sen aiheuttaa paikallinen tulehdusreaktio, johon osallistuu myös ihokudoksen luontainen (epäspesifi) immuunijärjestelmä. Sen tärkeimmät ominaispiirteet ovat sen palautuvuus, johon liittyy tulehdusreaktioita, ja useimmat tulehdusreaktioon liittyvät ärsyttävyyden kliiniset ominaispiirteet (eryteema, ödeema, kutina ja kipu).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantoprosessein tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UPLC: Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Lisäys 2

TÄHÄN TESTIMENETELMÄÄN SISÄLTYVÄT TESTIMALLIT

Nro	Testimallin nimi	Validointitutkimuksen tyyppi	Viittaukset
1	EpiSkin™	Laaja prospektiivinen validointitutkimus (2003–2007). Tämän mallin osia käytettiin ECVAMin alkuperäisten ja päivitettyjen suoritusvaatimusten oleellisten testimenetelmän osien määrittämisessä (39) (40) (21) (*). Lisäksi menetelmän tietoja, jotka liittyvät luokittelemattomien vs. luokiteltujen aineiden määrittämiseen, käytettiin perusteena alkuperäisten suoritusvaatimusten (*) spesifisyys- ja herkkyysarvojen määrittämisessä. (*)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*alkuperäinen*): Alun perin testimallin laaja prospektiivinen validointi tehtiin testimallin nro 1 kanssa vuosina 2003–2007. Tämän mallin osia käytettiin ECVAMin alkuperäisten ja päivitettyjen suoritusvaatimusten oleellisten testimenetelmien osien määrittämisessä (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Alkuperäisen EpiDerm™-mallin muunnos validoitiin ECVAMin alkuperäisiä suoritusvaatimuksia käyttäen (21) vuonna 2008 (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validointitutkimus perustui ECVAMin alkuperäisiin suoritusvaatimuksiin (21), ja se tehtiin vuonna 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validointitutkimus (2011–2012) perustui OECD:n testiohjeen 439 mukaisiin suoritusvaatimuksiin (8), jotka pohjautuvat ECVAMin päivitettyihin suoritusvaatimuksiin (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) ja tämän testiohjeen suoritusvaatimukset (8) (*)

(*) ECVAMin alkuperäiset suoritusvaatimukset (21) laadittiin vuonna 2007 prospektiivisen validointitutkimuksen (16) valmistuessa. Tässä tutkimuksessa arvioitiin testimallien nro 1 ja 2 suorituskykyä vaarallisista aineista annetun EU-direktiivin 28. muutoksessa (41) kuvattuun luokitusjärjestelmään nähden. Vuonna 2008 käyttöönotetun YK:n GHS-järjestelmän (1) ja voimaan tulleen EU:n CLP-asetuksen myötä luokittelemattomien aineiden erottelemisessa luokitelluista aineista *in vivo* -tuloksiin sovellettava raja-arvo muuttui arvosta 2,0 arvoon 2,3. ECVAMin suoritusvaatimusten tarkkuusarvoja ja vertailukemikaalien luetteloa päivitettiin vuonna 2009, jotta ne täyttäisivät tämän muuttuneen sääntelyvaatimuksen (2) (39) (40). Alkuperäisten suoritusvaatimusten tapaan päivitetyt suoritusvaatimuksetkin perustuivat pitkälti malleista 1 ja 2 saatuihin tietoihin (16), mutta lisäksi niissä käytettiin mallista nro 3 saatuja tietoja vertailukemikaaleista. Vuonna 2010 ECVAMin päivitettyjä suoritusvaatimuksia käytettiin tähän testiohjeeseen liittyvien suoritusvaatimusten määräämisessä (8). Tämän testimenetelmän validoitu vertailumenetelmä on EpiSkin™, koska suoritusvaatimusten kaikki kriteerit laadittiin sen perusteella. Tarkempia tietoja validointitutkimuksista, kooste tuotetuista tiedoista ja perustelut suoritusvaatimusten tarvittaville muutoksille, jotka johtuivat YK:n GHS-järjestelmän käyttöönotosta ja CLP-asetuksen voimaantulosta, on ECVAMin/BfR:n tausta-asiakirjassa, joka liittyy OECD:n testiohjeeseen 439 (23).

SIT: Skin Irritation Test, ihoärsytystesti

RHE: Reconstructed Human Epidermis, rekonstruoitu ihmisen orvaskesi

Lisäys 3

TÄHÄN TESTIMENETELMÄÄN SISÄLTYVIEN TESTIMALLIEN TESTISUUNNITELMAN MUKAISET PARAMETRIT

RhE-mallien testisuunnitelmat ovat hyvin samanlaiset, ja kaikissa käytettävä käsittelyn jälkeinen inkubointiaika on 42 tuntia (32) (33) (34) (35). Vaihtelu liittyy pääasiassa kolmeen seuraavaan parametriin, jotka liittyvät testimallien erilaisiin läpäisynestotoimintoihin: A) käsittelyä edeltävä inkubointiaika ja -määrä, B) testikemikaalien applikoiminen ja C) käsittelyn jälkeisen inkuboinnin määrä.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Käsittelyä edeltävä inkubointi				
Inkubointiaika	18–24 tuntia	18–24 tuntia	< 2 tuntia	15–30 tuntia
Kasvatusaineen määrä	2 ml	0,9 ml	0,3 tai 1 ml	0,5 ml
B) Testikemikaalin applikointi				
Nesteet	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Kiinteät aineet	10 mg (26 mg/cm^2) + TV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + TV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + TV (25 µl)
Nailonverkon käyttö	Ei käytössä	Tarvittaessa	Käytössä	Ei käytössä
Applikoinnin kokonaisaika	15 minuuttia	60 minuuttia	42 minuuttia	15 minuuttia
Applikointilämpötila	HLT	a) HLT:ssä 25 minuuttia b) 37 °C:ssa 35 minuuttia	HLT	HLT
C) Käsittelyn jälkeisen inkuboinnin määrä				
Kasvatusliuoksen määrä	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Suurin hyväksyttävä vaihtelu				
Kudosnäytteiden keskihajonta	SD18	SD18	SD18	SD18

HLT: Huoneenlämpötila
TV: Tislattu vesi
DPBS: Dulbeccon fosfaattipuskuroitu suolaliuos

Lisäys 4

KESKEISET PARAMETRIT JA HYVÄKSYMISPERUSTEET, JOIDEN MUKAAN HPLC-/UPLC-SPEKTROFOTOMETRIAJÄRJESTELMÄ VOIDAAN HYVÄKSYÄ RHE-KUDOKSISTA UUTETUN MTT-FORMATSAANIN MITTAAMISEEN

Parametri	Protokolla peräisin FDA:n ohjeista (36) (37)	Hyväksymisperusteet
Valikoivuus	Analyysi: isopropanoli, eläviä soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute elävistä RhE-kudoksista ilman käsittelyä), kuolleita soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute kuolleista RhE-kudoksista ilman käsittelyä)	$Alue_{interferenssi}$ ≤ 20 % $Alue_{LLOQ}$ (1):sta
Täsmäävyys	Laatukontrollit (esim. MTT-formatsaani pitoisuuksina 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanolilla (n=5)	CV ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Tarkkuus	Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	%Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Matriisivaikutus	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=5)	85 % ≤ matriisivaikutus % ≤ 115 %
Kulkeutuminen	Isopropanolin analysointi ULOQ (2)-standardin mukaan	$Alue_{interferenssi}$ ≤ 20 % $Alue_{LLOQ}$:sta
Toistettavuus (päivänsisäinen)	3 riippumatonta kalibrointikäyrää (perustuen 6 peräkkäiselle 1/3-laimennokselle MTT-formatsaanista isopropanolissa ULOQ-arvosta alkaen, ts. 200 µg/ml); Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	Kalibrointikäyrät: %Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta Laatukontrollit: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Toistettavuus (päivien välinen)	Päivä 1: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 2: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 3: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)	
MTT-formatsaanin lyhytaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja 24 tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %
MTT-formatsaanin pitkäaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa (tarvittaessa)	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja muutaman päivän kuluttua tietyssä lämpötilassa (esimerkiksi 4°C, -20°C, -80°C) säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %”

(1) LLOQ: Alempi määritysraja, määritetty kattamaan kudoksen elinkykyisyys, kun se on 1–2 prosenttia, esim. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Ylempi määritysraja, määritetty olemaan vähintään kaksi kertaa suurempi kuin suurin odotettu MTT-formatsaanipitoisuus negatiivisten kontrollien isopropanoliuutteissa, esim. 200 µg/ml.

8) Lisätään B osaan seuraavat luvut:

"B.63 **LISÄÄNTYMIS-/KEHITYSTOKSISUUDEN SEULONTATESTI**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 421 (2016). Kemikaalien testaamiseen tarkoitettuja OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen mukaisesti. Seulontatestiohje 421 hyväksyttiin alun perin vuonna 1995, ja se perustui alustava lisääntymistoksisuuden seulontatesti -protokollaan, jota käsiteltiin kahdessa asiantuntijakokouksessa, Lontoossa vuonna 1990 (1) ja Tokiossa vuonna 1992 (2).

2. Tätä testimenetelmää on päivitetty lisäämällä siihen hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset päätetapahtumat sen jälkeen, kun OECD aloitti vuonna 1998 tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistamisen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (3). OECD:n testiohjetta 407 (oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä, tämän liitteen B.7 luku) parannettiin vuonna 2008 lisäämällä siihen parametreja, joilla voidaan havaita testikemikaalien hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus. Testiohjeen 421 päivittämisen tavoitteena oli sisällyttää seulontatestiohjeeseen joitakin hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkityksellisiä päätetapahtumia sellaisia tilanteita varten, kun altistusajat kattavat muutamia kehityksen kannalta herkkiä ajanjaksoja (syntymää edeltävät tai heti syntymän jälkeiset ajanjaksot).

3. Valitut hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset uudet päätetapahtumat, jotka sisältyvät myös testiohjeeseen 443 (pidennetty yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus, tämän liitteen B.56 luku), sisällytettiin testiohjeeseen 421 toteutettavuustutkimuksen perusteella. Tutkimuksessa käsiteltiin päätetapahtumien lisäämistä koskevia tieteellisiä ja teknisiä kysymyksiä ja mahdollisia muutoksia, joita testiasetelmaan pitäisi tehdä päätetapahtumien lisäämisen vuoksi (4).

4. Tämä testimenetelmä on suunniteltu tuottamaan tiettyjä tietoja, jotka koskevat testikemikaalin vaikutuksia uroksen ja naaraan lisääntymiskykyyn, kuten sukupuolirauhasten toimintaan, parittelukäyttäytymiseen, hedelmöittymiseen, conceptuksen kehittymiseen ja synnytykseen. Se ei ole vaihtoehtoinen eikä korvaa nykyisiä testimenetelmiä B.31, B.34, B.35 tai B.56.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Tätä seulontatestimenetelmää voidaan käyttää alustavien tietojen saamiseksi testikemikaalin mahdollisista vaikutuksista lisääntymiseen ja/tai kehitykseen joko kemikaalien toksikologisten ominaisuuksien varhaisvaiheen arvioinnissa tai huolta aiheuttavien kemikaalien tutkimuksessa. Sitä voidaan käyttää myös osana sellaisten olemassa olevien kemikaalien alustavien seulontatestien sarjaa, joista toksikologista tietoa on saatavilla niukasti tai joista sitä ei ole saatavilla lainkaan. Sitä voidaan käyttää myös annosalueen määritystutkimuksena laajemmissa lisääntymis-/kehitystutkimuksissa tai silloin, kun sitä pidetään muulloin tarpeellisena. Tutkimuksen toteuttamisessa on noudatettava periaatteita ja näkökohtia, jotka esitetään pääpiirteittäin OECD:n ohjeasiakirjassa 19 kliinisten oireiden tunnustamisesta, arvioimisesta ja soveltamisesta inhimillisinä toimenpiteinä turvallisuusarvioinneissa käytettäviin eläimiin (5).

6. Tällä testimenetelmällä ei saada täydellisiä tietoja kaikista lisääntymiseen ja kehitykseen liittyvistä näkökohdista. Testimenetelmä on vain rajallinen mahdollisuus havaita syntymää edeltäneen altistuksen vaikutuksia syntymän jälkeen tai sellaisia vaikutuksia, joita voi ilmaantua syntymän jälkeisen altistuksen aikana. (Esimerkiksi) annosryhmissä käytettyjen eläinten pienen määrän, päätetapahtumien valikoivuuden ja tutkimuksen lyhyen keston vuoksi tällä menetelmällä ei saada sellaista näyttöä, jonka perusteella voitaisiin päätellä varmasti, ettei vaikutuksia ole. Koska myöskään muihin lisääntymis-/kehitystoksisuustesteihin pohjautuvia tietoja ei ole, positiiviset tulokset ovat hyödyllisiä alustavassa vaaran arvioinnissa, ja ne voivat vaikuttaa päätöksiin lisätestauksen tarpeellisuudesta ja ajoituksesta.

7. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan "Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (6) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Tässä asiakirjassa OECD:n parannettu testiohje 421 sisältyy tasolle 4 *in vivo* -testinä, jolla saadaan tietoa haittavaikutuksista hormonitoiminnan kannalta merkityksellisten päätetapahtumien osalta. Hormonitoimintaan liittyvää signaalia ei kuitenkaan pidetä yksinään riittävänä näyttönä siitä, että testikemikaali olisi hormonaalinen haitta-aine.

8. Tässä testimenetelmässä testikemikaali annostellaan suun kautta. Jos käytetään muita altistusreittejä, menetelmään voi olla tarpeen tehdä muutoksia.

9. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

10. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalia annetaan porrastettuina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. Uroksille on annettava testikemikaalia vähintään neljä viikkoa suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka kyseinen päivä mukaan luettuna (ts. vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua, parittelujakson aikana ja noin kaksi viikkoa parittelun jälkeen). Koska parittelua edeltävä annostelujakso on urosten osalta lyhyt, hedelmällisyys ei välttämättä ole erityisen herkkä indikaattori kiveksiin kohdistuvasta toksisuudesta. Sen vuoksi kivesten tarkka histologinen tutkimus on tärkeä. Parittelua edeltävää kahden viikon annostelujaksoa, jota seuraa parittelun/hedelmällisyyden tarkkailu, ja vähintään neljä viikkoa kestävä kokonaisannostelujakso ja urosten sukupuolielinten yksityiskohtainen histopatologinen tutkimus, katsotaan riittäväksi, jotta voidaan havaita suurin osa urosten hedelmällisyyteen ja spermatogeneesiin kohdistuvista vaikutuksista.

12. Naaraille on annettava testikemikaalia tutkimuksen koko keston ajan. Niille testikemikaalia annostellaan siis kahden viikon ajan ennen parittelua (tavoitteena on kattaa vähintään kaksi täyttä kiimakiertoa), hedelmöittymisen vaihteleva ajankohta, tiineyden kesto ja vähintään 13 päivää synnytyksen jälkeen suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka, kyseinen päivä mukaan luettuna.

13. Tutkimuksen kesto sopeutumisvaiheen ja annostelua edeltävän kiimakierron arvioinnin jälkeen määräytyy naaraan lisääntymiskyvyn mukaan, ja se on noin 63 päivää [vähintään 14 päivää ennen parittelua, (enintään) 14 päivän parittelujakso, 22 päivän tiineys ja 13 päivän imetysaika].

14. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tässä testimenetelmässä on suunniteltu käytettävän rottaa koe-eläimenä. Jos tässä testimenetelmässä määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, sille on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista OECD:n testiohjeen 407 (joka vastaa tämän liitteen B.7 lukua) perusteella, rotta oli ainoa käytetty laji. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän kehityshäiriöitä, ei tule käyttää. Koe-eläiminä on käytettävä terveitä pariutumattomia eläimiä, joilla ei ole tehty aikaisempia kokeita. Koe-eläinten laji, kanta, sukupuoli, paino ja ikä on oltava tiedossa. Tutkimuksen alkaessa eläinten painot saavat vaihdella mahdollisimman vähän, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Mikäli tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen tai koko sukupolven tutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

16. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:ää prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testikemikaalin ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna.

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä. Parittelun tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Tiineet naaraat on laitettava häkkiin yksittäin, ja niille on annettava pesämateriaaleja. Imettävät naaraat laitetaan häkkiin yksittäin poikastensa kanssa.

18. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

19. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaisesti verrokki- ja testiryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet merkitään yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

Annosten valmistelu

20. Testikemikaali suositellaan annosteltavaksi suun kautta, ellei muita annostelureittejä pidetä asianmukaisempina. Jos valitaan suun kautta annostelu, testikemikaali annetaan yleensä ruokintaletkun kautta; vaihtoehtoisesti testikemikaalit voidaan kuitenkin antaa myös ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna.

21. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/emulsiota ja sitten mahdollisesti muihin kantaja-aineisiin perustuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiliteetti ja homogeenisuus kantaja-aineessa on määritettävä.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

22. On suositeltavaa, että jokaisessa ryhmässä on aluksi vähintään 10 urosta ja 12–13 naarasta. Naaraiden kiimakierto arvioidaan ennen altistusta, ja eläimiä, joiden osalta tyypillistä 4–5 päivän kiertoa ei voida vahvistaa, ei oteta mukaan tutkimukseen. Jotta kuhunkin ryhmään saadaan varmasti 10 naarasta, niitä pitää olla aluksi enemmän kuin uroksia. Lukuun ottamatta selviä toksisia vaikutuksia, kuhunkin ryhmään oletetaan saatavan vähintään kahdeksan tiineenä olevaa naarasta, mikä on yleensä pienin hyväksyttävä tiineiden naaraiden määrä yhdessä ryhmässä. Tavoitteena on saada tarpeeksi tiineystapauksia ja poikasia, jotta voidaan tehdä luotettava arvio testikemikaalin mahdollisesta vaikutuksesta hedelmällisyyteen, tiineyteen, emon ja poikasen käytökseen sekä F_1-sukupolven kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä synnytyksen jälkeiseen päivään 13 saakka.

Annostelu

23. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Annostasojen perusteena voidaan käyttää akuuttia toksisuutta koskevista testeistä saatuja tietoja tai toistuvan annostelun tutkimusten tuloksia. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

24. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki saatavilla olevat aikaisemmat toksisuustiedot ja (toksiko)kineettiset tiedot. Lisäksi on otettava huomioon, että tiineiden ja muiden kuin tiineiden eläinten herkkyydessä voi olla eroja. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai vakavia kärsimyksiä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla (NOAEL). Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

25. Jos havaitaan yleistä toksisuutta (kuten painonlaskua, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), hormonitoiminnan kannalta herkkiin ominaisuuksiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varauksellisesti.

Raja-annostesti

26. Jos oraalisessa testissä jokin annostaso, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokilo) /vrk tai vastaava suhteellinen määrä ravinnossa tai juomavedessä, kun testikemikaali annetaan ravinnon tai juomaveden seassa, ja joka annetaan tässä testimenetelmässä kuvattujen menettelyjen mukaisesti, ei aiheuta lainkaan havaittavaa toksista vaikutusta ja jos sitä ei aikaisempien tutkimustulosten perusteella ole odotettavissa (esimerkiksi rakenteellisesti samantyyppiset yhdisteet), täydellinen useita annostasoja käyttävä testi ei välttämättä ole tarpeen. Raja-annostestiä voidaan soveltaa muulloin paitsi silloin, kun ihmisten altistuminen viittaa siihen, että on käytettävä suurempaa suun kautta annettavaa annosta. Muiden antotapojen kuten inhalaation tai ihoapplikaation osalta suurin mahdollinen pitoisuus määräytyy yleensä testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella.

Annostelu

27. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa olla yli 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä määrä voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät testikemikaalit, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testikemikaalin määrän vaihtelu on minimoitava pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä.

28. Kun testikemikaalit annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalin määrät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos testikemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain siten, että annostaso pysyy samana eläimen painoon nähden.

Testiaikataulu

29. Testikemikaalia on alettava antaa kummallekin sukupuolelle vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua sen jälkeen, kun eläimiä on sopeutettu vähintään viisi päivää ja kun eläimistä on seulottu ne naaraat, joiden kiimakierto on normaali (altistusta edeltävällä kahden viikon jaksolla). Tutkimus on aikataulutettava siten, että kiimakierron arviointi alkaa pian sen jälkeen, kun eläimet ovat saavuttaneet täyden sukukypsyyden. Eri rottakannoissa ja eri laboratorioissa voi olla tässä vaihtelua; esimerkiksi Sprague-Dawley-rotat tulevat sukukypsiksi 10-viikkoisina, Wistar-rotat taas noin 12-viikkoisina. Poikineet emot on lopetettava päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen. Syntymäpäivä (ts. kun synnytys on tapahtunut) määritellään synnytyksen jälkeiseksi päiväksi 0. Naaraat, joiden osalta parittelua ei voida todeta tapahtuneen, lopetetaan 24–26 päivää parittelujakson viimeisen päivän jälkeen. Annostelua jatketaan kummallekin sukupuolelle parittelujakson aikana. Uroksille annostelua on jatkettava parittelujakson jälkeen vähintään siihen saakka, kunnes annostelujakso on kokonaisuudessaan vähintään 28 päivää. Sen jälkeen urokset lopetetaan. Vaihtoehtoisesti ne pidetään elossa ja annostelua jatketaan mahdolliseen toiseen parittelukertaan asti, jos sitä pidetään tarkoituksenmukaisena.

30. Annostelua tiineeksi tulleille naaraille on jatkettava tiineyden ajan ja vähintään synnytyksen jälkeiseen päivään 13 asti, kyseinen päivä mukaan luettuna, tai lopettamista edeltävään päivään saakka. Tutkimuksissa, joissa testikemikaalia annostellaan hengitysteiden tai ihon kautta, annostelua on jatkettava vähintään tiineyden päivään 19 saakka, kyseinen päivä mukaan luettuna, ja annostelua on jatkettava mahdollisimman pian, viimeistään kuitenkin SJP:nä 4.

31. Lisäyksessä 2 on kaavio testiaikataulusta.

Paritus

32. Tässä tutkimuksessa on käytettävä yleensä 1:1-parittelua (yhden uroksen ja yhden naaraan parittelu). Poikkeuksia voidaan tehdä, jos yksittäisiä uroksia kuolee. Naaras on laitettava häkkiin saman uroksen kanssa, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen tai kunnes kaksi viikkoa on kulunut. Naaraat on tutkittava joka aamu sperman tai vaginatulpan havaitsemiseksi. Tiineyspäivä 0 määritellään päiväksi, jolloin todisteet parittelusta vahvistetaan (vaginatulpan muodostuminen tai spermaa havaitaan). Jos parittelua ei tapahdu, voidaan harkita naaraan uutta paritusta saman ryhmän hedelmällisiksi todettujen urosten kanssa.

Poikueiden koko

33. Päivänä 4 synnytyksen jälkeen kunkin poikueen kokoa voidaan mukauttaa poistamalla siitä poikasia satunnaisvalinnalla siten, että yhteen poikueeseen jää neljä tai viisi poikasta kumpaakin sukupuolta sen mukaan, mikä on käytetyn rottakannan normaali poikuekoko. Kahdesta ylimääräisestä poikasesta on otettava verinäytteet, jotka yhdistetään ja käytetään seerumin T4-pitoisuuden määrittämiseen. Poikasten valikoiva eliminointi esimerkiksi painon tai peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Jos uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää neljää tai viittä poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi kuusi urosta ja neljä naarasta). Poikasia ei eliminoida poikueesta, jos poikueen koko supistuisi karsintatavoitetta pienemmäksi (8 tai 10 poikasta / poikue). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen karsimistavoitetta enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

34. Jos poikueen kokoa ei mukauteta, jokaisesta poikueesta lopetetaan kaksi poikasta päivänä 4 syntymän jälkeen, ja niiltä otetaan verinäytteet seerumin kilpirauhashormonipitoisuuden mittausta varten. Mikäli mahdollista, näiden kahden poikasen tulisi olla naaraita, jotta urospuolisista poikasista voidaan tutkia nännien vetäytyminen, mutta tämä ei saa johtaa siihen, ettei poikueeseen jäisi naaraspuolisia poikasia arvioitavaksi tutkimuksen päättyessä. Yhtään poikasta ei eliminoida, jos poikueen koko pienenisi alle 8 tai 10 poikaseen / poikue (käytetyn rottakannan normaalin poikuekoon mukaan). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen normaalia poikuekokoa enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

Eläviä eläimiä koskevat havainnot

Kliiniset havainnot

35. Testijakson aikana yleisiä kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä ja sitä useammin, jos toksisuuden merkkejä havaitaan. Havainnointi on tehtävä mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen ennakoidut vaikutukset ovat suurimmillaan. Käyttäytymistavan muutokset, merkit vaikeasta tai pitkittyneestä synnytyksestä ja kaikki toksisuuden merkit sekä kuolleisuus on kirjattava. Näihin tietoihin on kirjattava myös toksisuuden merkkien alkamisaika, vakavuusaste ja kesto.

Eläimen paino ja ravinnon/veden kulutus

36. Urokset ja naaraat on punnittava ensimmäisenä annostelupäivänä, vähintään kerran viikossa sen jälkeen ja tutkimuksen päättyessä. Tiineyden aikana naaraat on punnittava päivinä 0, 7, 14 ja 20 sekä 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Havainnot raportoidaan erikseen kustakin täysikasvuisesta eläimestä.

37. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ennen parittelua sekä tiineyden ja imetyksen aikana. Ravinnon kulutuksen mittaus parittelujakson aikana ei ole pakollista, mutta sen voi tehdä. Myös vedenkulutus näiden jaksojen aikana on mitattava, jos testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna.

Kiimakierrot

38. Kiimakiertoja on seurattava ennen altistuksen aloittamista, jotta tutkimukseen voidaan valita naaraita, joiden kiimakierto on säännöllinen (ks. 22 kohta). Myös irtosolunäytteitä on seurattava päivittäin altistusjakson alkamisesta siihen saakka, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen. Jos annostelun aloittamisen epäillään aiheuttavan akuutteja stressireaktioita, jotka voivat muuttaa kiimakiertoja, laboratoriot voivat altistaa koe-eläimet testikemikaalille kahden viikon ajaksi ja ottaa niiltä irtosolunäytteet päivittäin, jotta ne voivat seurata kiimakiertoa vähintään kahden viikon ajan parittelua edeltävällä jaksolla. Seurantaa on jatkettava parittelujaksolla siihen saakka, että parittelun voidaan todeta tapahtuneen. Vagina-/kohdunkaulasolujen ottamisessa on pyrittävä välttämään limakalvon vaurioittamista, sillä se voi aiheuttaa valetiineyden (7) (8).

Poikasia koskevat parametrit

39. Tiineyden kesto on kirjattava, ja se lasketaan tiineyden päivästä 0 alkaen. Jokainen poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen, jotta voidaan määrittää poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä, pienikasvuisten poikasten lukumäärä (poikaset, jotka ovat huomattavasti pienempiä kuin verrokkiryhmän poikaset) ja selvästi näkyvät epämuodostumat.

40. Elävät poikaset on laskettava ja niiden sukupuoli on määritettävä ja poikueet on punnittava 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Edellä 35 kohdassa kuvattujen havaintojen lisäksi on kirjattava myös poikasten kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen.

41. Jokaisen poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava samana synnytyksen jälkeisenä päivänä SJP 0 – SJP 4. Poikasen paino on punnittava samana päivänä, kun peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys mitataan, ja tämä mittaus on normalisoitava poikasen koon mittauksen perusteella, mieluiten painon kuutiojuureen (9). Urospuolisten poikasten nännien/nännipihojen määrä on laskettava SJP:nä 12 tai 13 OECD:n ohjeasiakirjassa 151 suositellun mukaisesti (10).

Kliininen biokemia

42. Verinäytteet määrätystä paikasta otetaan seuraavan aikataulun mukaan:

— vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta päivänä 4 syntymän jälkeen, jos se on mahdollista poikasten lukumäärän perusteella (ks. 33–34 kohta)

— kaikilta emoilta ja vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta tutkimuksen päättyessä päivänä 13, ja

— kaikilta täysikasvuisilta uroksilta tutkimuksen päättyessä.

Kaikki verinäytteet on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Päivänä 13 otetuista poikasten ja täysikasvuisten urosten verinäytteistä määritetään kilpirauhashormonien (T4) pitoisuus seerumissa. Emojen ja päivänä 4 poikasilta otettujen verinäytteiden T4-pitoisuus määritetään, jos se on tarpeen. Myös muiden hormonien pitoisuuksia voidaan määrittää, jos se on tarpeen. Poikasten verinäytteet voidaan yhdistää poikueittain kilpirauhashormonin määritystä varten. Kilpirauhashormonit (T4 ja THS) on mitattava mieluiten kokonaispitoisuutena.

43. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

— lopettamistapa: on vältettävä aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

44. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla.

Patologia

Ruumiinavaustutkimukset

45. Kun täysikasvuiset eläimet lopetetaan tai kun ne kuolevat testin aikana, niistä on tutkittava makroskooppisesti mahdolliset epämuodostumat tai patologiset muutokset. Erityistä huomiota on kiinnitettävä lisääntymiselimiin. Kiinnittymiskohtien määrä on kirjattava. Irtosolunäytteet on tutkittava ruumiinavauspäivän aamuna, jotta kiimakierron vaihe voidaan määrittää ja jotta voidaan mahdollistaa korrelaatio munasarjojen histopatologisen tutkimuksen kanssa.

46. Kaikkien täysikasvuisten urospuolisten eläinten kiveksistä ja lisäkiveksistä sekä eturauhasesta ja rakkularauhasesta sekä niiden etuosista kokonaisuudessaan on poistettava kaikki ylimääräinen kudos tarvittaessa, ja niiden märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Lisäksi voidaan valinnaisesti punnita esimerkiksi levator ani- ja bulbocavernosus-lihaskompleksi, Cowperin rauhaset ja terska uroksilta sekä parilliset munasarjat (märkäpaino) ja kohtu (myös kohdunkaula) naarailta. Jos nämä päätetään punnita, se on tehtävä mahdollisimman pian dissektion jälkeen.

47. Kuolleet poikaset ja päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen lopetetut poikaset on tutkittava huolellisesti ulkoisesti selvästi näkyvien epämuodostumien varalta. Huomiota on kiinnitettävä erityisesti ulkoisiin lisääntymiselimiin, joista on tutkittava, näkyykö niissä merkkejä muuttuneesta kehityksestä. Yhden urospoikasen ja yhden naaraspoikasen kilpirauhanen on säilöttävä päivänä 13.

48. Kaikilta täysikasvuisilta eläimiltä on säilöttävä munasarjat, kivekset, avustavat sukupuolielimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen, rakkularauhanen ja niiden etuosat), kilpirauhanen ja kaikki muut elimet, joissa näkyy makroskooppisia leesioita. Formaliinilla kiinnittämistä ei suositella kivesten ja lisäkivesten tavanomaiseen tutkimukseen. Hyväksyttävä menetelmä on käyttää näihin kudoksiin Bouinin kiinnitysainetta tai Davidsonin muunneltua kiinnitysainetta (11). Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti.

Histopatologia

49. Suurimman annoksen ryhmän ja verrokkiryhmän eläinten munasarjoista, kiveksistä ja lisäkiveksistä (erityistä huomiota on kiinnitettävä spermatogeneesin vaiheisiin ja kivesten interstitiaalisolujen rakenteen histopatologiaan) on tehtävä tarkka histologinen tutkimus. Muut poikasilta ja täysikasvuisilta eläimiltä otetut elimet, myös kilpirauhanen, voidaan tutkia, jos se on tarpeen. Kilpirauhasen paino voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia. Tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos suurimman annoksen ryhmässä havaitaan muutoksia. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (11) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot. Lisäksi kaikki tiedot on esitettävä taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin eläinten lukumäärä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, kuoleman tai inhimillisistä syistä lopettamisen ajankohta, hedelmällisten eläinten lukumäärä, tiineiden naaraiden lukumäärä, niiden eläinten määrä, joissa toksisuusvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista toksisuuden merkeistä sekä mahdollisten toksisten vaikutusten alkamisaika, kesto ja vakavuus, histopatologisten muutosten tyypit sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta. Lisäyksessä 3 on malli yhteenvetotaulukosta, joka on osoittautunut erittäin hyödylliseksi lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa.

51. Tutkimuksen rajallisuuden vuoksi testien ”merkitsevyyttä” tarkastelevista tilastoanalyyseista on varsin vähän hyötyä monien päätetapahtumien, etenkin lisääntymiseen liittyvien päätetapahtumien, osalta. Jos tilastoanalyyseja tehdään, valitun menetelmän on oltava tutkitun muuttujan jakauman kannalta asianmukainen, ja se on valittava ennen tutkimuksen aloittamista. Peräaukon ja sukupuolielinten välistä etäisyyttä ja nännien vetäytymistä koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Tarvittaessa poikue on analysoitava yksikkö. Poikasen painoa koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Pienen ryhmäkoon vuoksi aikaisemmat kontrollitiedot (esimerkiksi poikueen koko), jos niitä on saatavilla, voivat olla hyödyllinen apu tutkimustulosten tulkinnassa.

Tulosten arviointi

52. Tämän toksisuustutkimuksen löydökset on arvioitava havaittujen vaikutusten, ruumiinavauksen ja mikroskopialöydösten avulla. Arvioinnissa tulee todeta testikemikaalin annoksen ja poikkeavuuksien – mukaan lukien vakavat vauriot, tietyt kohde-elimet, hedelmättömyys, kliiniset poikkeavuudet, vaikutukset lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, painon muutokset, vaikutukset kuolleisuuteen sekä muut toksiset vaikutukset – esiintyvyyden, ilmaantuvuuden ja vakavuuden välinen mahdollinen suhde.

53. Koska urosten altistusjakso on lyhyt, uroksen lisääntymiskykyyn kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa tulisi harkita myös kivesten ja lisäkivesten histopatologista tutkimusta hedelmällisyystietojen ohella. Lisääntymistä/kehitystä koskevien aiempien vertailutietojen (esimerkiksi poikueen koko, peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys, nännien vetäytyminen, seerumin T4-pitoisuus) käytöstä voi olla hyötyä tutkimuksen tulosten tulkinnan apuna.

54. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

Testiraportti

55. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alussa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Koeolosuhteet:

— annostason valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, saavutetuista pitoisuuksista sekä valmisteen stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaistamismenettelystä, jolla valittiin karsittavat poikaset, jos karsinta tehtiin.

Tulokset:

— paino / painon muutokset

— ravinnon ja veden kulutus, jos tiedot ovat saatavilla

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, myös hedelmällisyyden, tiineyden ja toksisuuden mahdollisten muiden merkkien osalta

— tiineyden kesto

— toksiset tai muut vaikutukset lisääntymiseen, poikasiin, syntymänjälkeiseen kasvuun jne.

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— niiden täysikasvuisten naaraiden määrä, joilla on normaali tai epänormaali kiimakierto, ja kierron pituus

— elävänä syntyneiden poikasten määrä ja kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet abortoitumiset

— poikasten painotiedot

— peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys kaikilta poikasilta (sekä paino tämän etäisyyden mittauspäivänä)

— urospoikasten nännien vetäytyminen

— kilpirauhashormonipitoisuudet päivänä 13 urospoikasilta ja täysikasvuisilta uroksilta (ja emoilta ja naaraspoikasilta päivänä 4, jos pitoisuus mitataan niiltä)

— niiden poikasten lukumäärä, joilla on selvästi nähtäviä poikkeavuuksia, ulkoisten sukupuolielinten silmämääräinen arviointi, pienikasvuisten poikasten lukumäärä

— eläinten kuolinaika tutkimusaikana tai tieto siitä, pysyivätkö eläimet hengissä tutkimuksen päättymiseen saakka

— kiinnittymisten lukumäärä, poikueen koko ja painot kirjaushetkellä

— poikasia saaneiden eläinten paino lopetettaessa ja niiden elinten paino

— ruumiinavauslöydökset

— yksityiskohtaiset tiedot kaikista histopatologisista löydöksistä

— absorptiotiedot (jos saatavilla)

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

Tulosten tulkinta

56. Tutkimuksen tuloksena saadaan arviot toistettujen annosten antamiseen liittyvästä lisääntymis-/kehitystoksisuudesta (ks. 5 ja 6 kohta). Sen perusteella tiedetään, onko tehtävä lisätutkimuksia, ja se voi ohjata myös myöhempien tutkimusasetelmien suunnittelua. OECD:n ohjeasiakirjaa 43 on käytettävä lisääntymiseen ja kehitykseen kohdistuviin vaikutuksiin liittyvien tulosten tulkinnan apuna (12). OECD:n ohjeasiakirjassa 106 (jyrsijöillä tehtyjen endokriinisten ja lisääntymiseen liittyvien testien histologinen arviointi) on tietoa (endokriinisten) elinten ja irtosolunäytteiden preparoinnista ja arvioinnista. Näistä tiedoista voi olla apua tämän testiohjeen soveltamisessa.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT (KS. MYÖS OECD:N OHJEASIAKIRJA 150 (6))

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kemikaali on aine tai seos.

Kehitystoksisuus: Pre-, peri-, postnataalisina, rakenteellisina tai toiminnallisina häiriöinä jälkeläisissä esiintyvän lisääntymistoksisuuden ilmeneminen.

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden merkkejä. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Hedelmällisyyden heikentyminen tarkoittaa uroksen tai naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn häiriöitä.

Emoille myrkylliset vaikutukset: Tiineinä oleviin naaraisiin kohdistuvat haittavaikutukset, joita esiintyy joko spesifisti (suora vaikutus) tai epäspesifisti (epäsuora vaikutus).

NOAEL on lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Lisääntymistoksisuus tarkoittaa haitallisia vaikutuksia, jotka kohdistuvat jälkeläisiin, ja/tai uroksen ja naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn heikentymistä.

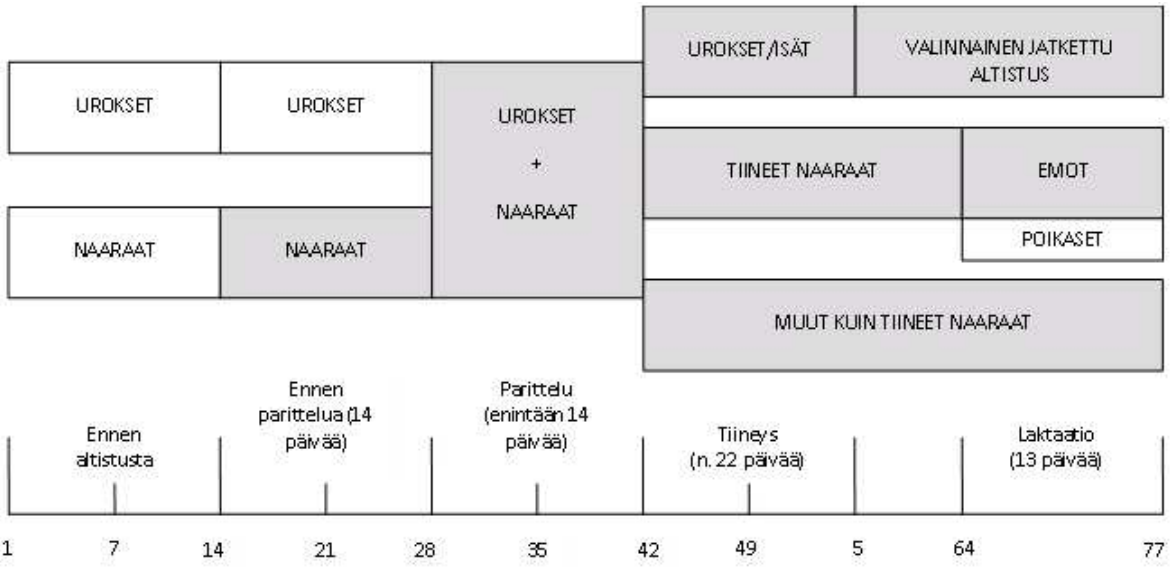
Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

Lisäys 2

KAAVIO TESTIAIKATAULUSTA (TUTKIMUKSEN ENIMMÄISKESTO TÄYDEN 14 PÄIVÄN PITUISEN PARITTELUJAKSON PERUSTEELLA)



Tutkimuksen aloitus

Kiimakierron arviointi ennen altistusta, jonka jälkeen vaginan irtosolunäytteitä seurataan päivittäin käsittelyn alusta siihen asti, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen.

Urosten ja naaraiden (valinnainen) hematologia/ kliininen kemia

Urosten/isien ruumiinavaus
Urosten toiminnallinen tarkastus (valinnainen).
Urosten hematologinen/kliininen kemia, kun ne on lopetettu (vähintään neljän viikon allostelujakson jälkeen.

Synnytyksestä (SJP 0) SJP 4 :ään: Peräaukon ja sukuelinten välinen etäisyys kaikilla poikasilla (SJP 0 – SJP 4; samana päivänä kahden poikasen lopetus poikuetta kohti T4-määritystä varten (SJP 4).

Päivä 13 synnytyksen jälkeen. Ruumiinavaus naaraat ja poikaset
Ruumiinavaus urokset ja isät (valinnainen). Urosten (valinnainen) ja naaraiden toiminnalliset tarkkailut.
Urosten ja naaraiden (valinnainen) hematologia/kliininen kemia.
Urospoikasten nännien vetäytyminen.

Lisäys 3

YHTEENVETOTAULUKKO LISÄÄNTYMISEEN/KEHITYKSEEN KOHDISTUVISTA VAIKUTUKSISTA

HAVAINNOT	ARVOT				
Annostus (yksiköt)	0 (kontrolli)	…	…	…	…
Aloittaneet parit (N)					
Kiimakierto (vähintään keskimääräinen pituus ja epäsäännöllisten kiertojen tiheys)					
Naaraat, joissa merkkejä parittelusta (N)					
Tiineeksi tulleet naaraat (N)					
Hedelmöityspäivät 1–5 (N)					
Hedelmöityspäivät 6–… [1] (N)					
Tiineys ≤ 21 päivää (N)					
Tiineys = 22 päivää (N)					
Tiineys ≥ 23 päivää (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia päivänä 4 synn. jälk. (N)					
Kiinnittyneet alkiot / emo (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo synnytyksessä (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo päivänä 4 (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) synnytyksessä (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikueen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikueen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikasen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikasen paino peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden mittauksen yhteydessä (urosten ja naaraiden keskiarvot)					

HAVAINNOT	ARVOT				
Annostus (yksiköt)	0 (kontrolli)	…	…	…	…
Poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys samana syntymänjälkeisenä päivänä, syntymä – päivä 4 (urosten ja naaraiden keskiarvot, merkitse SJP)					
Poikasen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Urospoikasten nännin vetäytyminen päivänä 13 (keskiarvo)					
Poikasen paino päivänä 13 (keskiarvo)					
POIKKEAVAT POIKASET					
Emot, joilla 0 poikkeavaa poikasta					
Emot, joilla 1 poikkeava poikanen					
Emot, joilla ≥ 2 poikkeavaa poikasta					
JÄLKELÄISTEN KUOLEMAT					
Prenataalit / kiinnittymisten jälkeiset tapaukset (kiinnittymiset miinus elävänä syntyneet poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					
Postnataalit tapaukset (elävänä syntyneet poikaset miinus SJP:nä 13 elossa olevat poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					

([1]) Parittelujakson viimeinen päivä

B.64 YHDISTELMÄTESTI: TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS JA LISÄÄNTYMIS-/KEHITYSTOKSISUUDEN SEULONTATESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 422 (2016). Kemikaalien testaamiseen tarkoitettuja OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen mukaisesti. Seulontatestiohje 422 hyväksyttiin alun perin vuonna 1996, ja se perustui yhdistettyyn toistetun annoksen ja lisääntymis-/kehitystoksisuuden seulontatesti -protokollaan, jota käsiteltiin kahdessa asiantuntijakokouksessa, Lontoossa vuonna 1990 (1) ja Tokiossa vuonna 1992 (2).

2. Tässä testimenetelmässä yhdistetään lisääntymis-/kehitystoksisuuden seulontaa koskeva osa, joka perustuu jäsenmaissa kertyneeseen kokemukseen alkuperäisen menetelmän käyttämisessä nykyisten suurina määrinä tuotettavien kemikaalien yhteydessä ja kartoittaviin testeihin, joissa käytetään positiivisia kontrolliaineita (3) (4), sekä toistuvan annostelun toksisuutta koskeva osa, joka on OECD:n testiohjeen 407 (oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä, vastaa tämän liitteen B.7 lukua) mukainen.

3. Tätä testimenetelmää on päivitetty lisäämällä siihen hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset päätetapahtumat sen jälkeen, kun OECD aloitti vuonna 1998 tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistamisen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (5). Tässä yhteydessä testiohjetta 407 (joka vastaa tämän liitteen B.7 lukua) parannettiin vuonna 2008 lisäämällä siihen parametreja, jotka soveltuvat testikemikaalien endokriinisen toiminnan havaitsemiseen. Testiohjeen 422 päivittämisen tavoitteena oli sisällyttää seulontatestiohjeeseen joitakin hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkityksellisiä päätetapahtumia sellaisia tilanteita varten, kun altistusajat kattavat muutamia kehityksen kannalta herkkiä ajanjaksoja (syntymää edeltävät tai heti syntymän jälkeiset ajanjaksot).

4. Valitut hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset uudet päätetapahtumat, jotka sisältyvät myös testiohjeeseen 443 (pidennetty yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus, tämän liitteen B.56 luku), sisällytettiin testiohjeeseen 422 toteutettavuustutkimuksen perusteella. Tutkimuksessa käsiteltiin päätetapahtumien lisäämistä koskevia tieteellisiä ja teknisiä kysymyksiä ja mahdollisia muutoksia, joita testiasetelmaan pitäisi tehdä päätetapahtumien lisäämisen vuoksi (6).

5. Tämä testimenetelmä on suunniteltu tuottamaan tiettyjä tietoja, jotka koskevat testikemikaalin vaikutuksia uroksen ja naaraan lisääntymiskykyyn, kuten sukupuolirauhasten toimintaan, parittelukäyttäytymiseen, hedelmöittymiseen, conceptuksen kehittymiseen ja synnytykseen. Se ei ole vaihtoehtoinen eikä korvaa nykyisiä testimenetelmiä B.31, B.34, B.35 tai B.56.

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin toksisia ominaisuuksia, toistettujen annosten aiheuttama oraalinen toksisuus voidaan määrittää sen jälkeen, kun akuutista testauksesta on saatu alustavia tietoja toksisuudesta. Tämä tutkimus antaa tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta melko lyhyen ajan kuluessa. Menetelmä koostuu tavanomaisesta toistuvan annostelun toksisuustutkimuksesta, jota voidaan käyttää sellaisten kemikaalien testaamisessa, joiden osalta 90 päivän tutkimus ei ole perusteltu (kun esimerkiksi tuotantomäärä ei ylitä tiettyjä rajoja), tai pitkäaikaisen tutkimuksen esitutkimuksena. Tutkimuksen toteuttamisessa on noudatettava periaatteita ja näkökohtia, jotka esitetään pääpiirteittäin OECD:n ohjeasiakirjassa 19 kliinisten oireiden tunnustamisesta, arvioimisesta ja soveltamisesta inhimillisinä toimenpiteinä turvallisuusarvioinneissa käytettäviin eläimiin (7).

7. Lisäksi tutkimus koostuu lisääntymis-/kehitystoksisuuden seulontatestistä, ja siksi sitä voidaan käyttää alustavien tietojen saamiseksi mahdollisista vaikutuksista, jotka kohdistuvat uroksen ja naaraan lisääntymiskykyyn, kuten sukupuolirauhasten toimintaan, parittelukäyttäytymiseen, hedelmöittymiseen, conceptuksen kehittymiseen ja synnytykseen, joko testikemikaalien toksikologisten ominaisuuksien arvioinnin varhaisessa vaiheessa tai huolta aiheuttavien kemikaalien tutkimuksessa. Tällä testimenetelmällä ei saada täydellisiä tietoja kaikista lisääntymiseen ja kehitykseen liittyvistä näkökohdista. Testimenetelmällä voi vain rajallisesti havaita syntymää edeltäneen altistuksen vaikutuksia syntymän jälkeen tai sellaisia vaikutuksia, joita voi ilmaantua syntymän jälkeisen altistuksen aikana. (Esimerkiksi) päätetapahtumien valikoivuuden ja tutkimuksen lyhyen keston vuoksi tällä menetelmällä ei saada sellaista näyttöä, joka tukisi varmoja päätelmiä siitä, ettei lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvia vaikutuksia ole. Koska myöskään muihin lisääntymis-/kehitystoksisuustesteihin pohjautuvia tietoja ei ole, positiiviset tulokset ovat hyödyllisiä alustavassa vaaran arvioinnissa, ja ne voivat vaikuttaa päätöksiin lisätestauksen tarpeellisuudesta ja ajoituksesta.

8. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan ”Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (8) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Tässä asiakirjassa OECD:n parannettu testiohje 422 sisältyy tasolle 4 *in vivo* -testinä, jolla saadaan tietoa haittavaikutuksista hormonitoiminnan kannalta merkityksellisten päätetapahtumien osalta. Hormonitoimintaan liittyvää signaalia ei kuitenkaan pidetä yksinään riittävänä näyttönä siitä, että testikemikaali olisi hormonaalinen haitta-aine.

9. Tässä menetelmässä painotetaan neurologisia vaikutuksia nimenomaisena päätetapahtumana ja eläinten tarkan kliinisen havainnoinnin tarvetta, jotta tietoa saataisiin mahdollisimman paljon. Menetelmällä on tarkoitus tunnistaa mahdollisesti neurotoksisia kemikaaleja, jotka voivat vaatia tarkempia tutkimuksia tältä osin. Lisäksi menetelmällä voidaan saada perustietoja immunologisista vaikutuksista.

10. Koska muihin systeemistä toksisuutta, lisääntymis-/kehitystoksisuutta, neurotoksisuutta ja/tai immunotoksisuutta koskeviin tutkimuksiin pohjautuvia tietoja ei ole, positiiviset tulokset ovat hyödyllisiä alustavassa vaaran arvioinnissa, ja ne voivat vaikuttaa päätöksiin lisätestauksen tarpeellisuudesta ja ajoituksesta. Erityisen hyödyllinen tämä testi voi olla osana OECD:n seulontatietoaineistoa (Screening Information Data Set, SIDS) sellaisten olemassa olevien kemikaalien arvioinnissa, joista toksikologista tietoa on saatavilla niukasti tai joista sitä ei ole saatavilla lainkaan. Sitä voidaan käyttää myös vaihtoehtona kahdelle erilliselle testille, joissa tarkastellaan toistuvasta annostelusta johtuvaa toksisuutta (OECD:n testiohje 407, joka vastaa tämän liitteen B.7 lukua) ja lisääntymis-/kehitystoksisuutta (OECD:n testiohje 421, joka vastaa tämän liitteen B.63 lukua). Sitä voidaan käyttää myös annosalueen määritystutkimuksena laajemmissa lisääntymis-/kehitystutkimuksissa tai silloin, kun sitä pidetään muulloin tarpeellisena.

11. Yleensä oletetaan, että tiineiden ja muiden kuin tiineiden eläinten herkkyydessä on eroja. Siksi tässä yhdistelmätestissä voi olla vaikeampaa määrittää annostasot, jotka ovat asianmukaiset sekä yleisen systeemisen toksisuuden että nimenomaisen lisääntymis-/kehitystoksisuuden arvioinnin kannalta, verrattuna siihen, että kumpikin testi tehtäisiin erikseen. Lisäksi yleistä systeemistä toksisuutta koskevien testitulosten tulkinta voi olla vaikeampaa kuin silloin, kun tehdään erillinen toistuvan annostelun tutkimus, etenkin jos seerumiin liittyviä ja histopatologisia parametreja ei arvioida tutkimuksessa samaan aikaan. Näiden teknisten haasteiden vuoksi tämän yhdistetyn seulontatestin tekeminen edellyttää vankkaa kokemusta toksisuuden testaamisesta. Toisaalta yhdistelmätesti voi olla parempi keino erotella lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvat suorat vaikutukset niistä, jotka ovat toissijaisia muihin (systeemisiin) vaikutuksiin nähden, ja lisäksi yhdistelmätestissä tarvitaan vähemmän koe-eläimiä.

12. Tässä testissä annostelujakso on pidempi kuin tavanomaisessa 28 päivän mittaisessa toistuvan annostelun tutkimuksessa. Siinä käytetään kuitenkin vähemmän eläimiä kummankin sukupuolen ryhmässä kuin silloin, kun tavanomainen 28 päivän mittainen toistuvan annostelun tutkimus tehdään lisääntymis-/kehitystoksisuutta koskevan seulontatestin lisäksi.

13. Tässä testimenetelmässä testikemikaali annostellaan suun kautta. Jos käytetään muita altistusreittejä, menetelmään voi olla tarpeen tehdä muutoksia.

14. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

15. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

16. Testikemikaalia annetaan porrastettuina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. Uroksille on annettava testikemikaalia vähintään neljä viikkoa suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka kyseinen päivä mukaan luettuna (ts. vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua, parittelujakson aikana ja noin kaksi viikkoa parittelun jälkeen). Koska parittelua edeltävä annostelujakso on urosten osalta lyhyt, hedelmällisyys ei välttämättä ole erityisen herkkä indikaattori kiveksiin kohdistuvasta toksisuudesta. Sen vuoksi kivesten tarkka histologinen tutkimus ontärkeä.

Parittelua edeltävää kahden viikon annostelujaksoa, jota seuraa parittelun/hedelmällisyyden tarkkailu, ja vähintään neljä viikkoa kestävä kokonaisannostelujakso katsotaan riittäväksi, jotta voidaan havaita suurin osa urosten hedelmällisyyteen ja spermatogeneesiin kohdistuvista vaikutuksista.

17. Naaraille on annettava testikemikaalia tutkimuksen koko keston ajan. Niille testikemikaalia annostellaan siis kahden viikon ajan ennen parittelua (tavoitteena on kattaa vähintään kaksi täyttä kiimakiertoa), hedelmöittymisen vaihteleva ajankohta, tiineyden kesto ja vähintään 13 päivää synnytyksen jälkeen suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka kyseinen päivä mukaan luettuna.

18. Tutkimuksen kesto sopeutumisvaiheen ja annostelua edeltävän kiimakierron arvioinnin jälkeen määräytyy naaraan lisääntymiskyvyn mukaan, ja se on noin 63 päivää [vähintään 14 päivää ennen parittelua, (enintään) 14 päivän parittelujakso, 22 päivän tiineys ja 13 päivän imetysaika].

19. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

20. Tässä testimenetelmässä on suunniteltu käytettävän rottaa koe-eläimenä. Jos tässä testiohjeessa 422 määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, sille on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista testiohjeen 407 mukaisesti, rotta oli ainoa käytetty laji. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän kehityshäiriöitä, ei tule käyttää. Koe-eläiminä on käytettävä terveitä pariutumattomia eläimiä, joilla ei ole tehty aikaisempia kokeita. Koe-eläinten laji, kanta, sukupuoli, paino ja ikä on oltava tiedossa. Käytettävien eläinten paino ei saisi juurikaan vaihdella eikä ylittää ±20:tä prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta kokeen alussa. Mikäli tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen tai koko sukupolven tutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

21. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °). Suhteellisen kosteuden olisi oltava vähintään 30 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testikemikaalin ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna.

22. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä. Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Tiineet naaraat on laitettava häkkiin yksittäin, ja niille on annettava pesämateriaaleja. Imettävät naaraat laitetaan häkkiin yksittäin poikastensa kanssa.

23. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

24. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet satunnaistetaan ja jaetaan altistusryhmiin ja häkkeihin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet merkitään yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

Annosten valmistelu

25. Testikemikaali suositellaan annosteltavaksi suun kautta, ellei muita annostelureittejä pidetä asianmukaisempina. Jos valitaan suun kautta annostelu, testikemikaali annetaan yleensä ruokintaletkun kautta; vaihtoehtoisesti testikemikaalit voidaan kuitenkin antaa myös ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna.

26. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muihin kantaja-aineisiin perustuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa on määritettävä.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

27. On suositeltavaa, että jokaisessa ryhmässä on aluksi vähintään 10 urosta ja 12–13 naarasta. Naaraiden kiimakierto arvioidaan ennen altistusta, ja eläimiä, joiden osalta tyypillistä 4–5 päivän kiertoa ei voida vahvistaa, ei oteta mukaan tutkimukseen. Jotta kuhunkin ryhmään saadaan varmasti 10 naarasta, niitä pitää olla aluksi enemmän kuin uroksia. Lukuun ottamatta selviä toksisia vaikutuksia kuhunkin ryhmään oletetaan saatavan vähintään kahdeksan tiineenä olevaa naarasta, mikä on yleensä pienin hyväksyttävä tiineiden naaraiden määrä yhdessä ryhmässä. Tavoitteena on saada tarpeeksi tiineystapauksia ja poikasia, jotta voidaan tehdä luotettava arvio testikemikaalin mahdollisesta vaikutuksesta hedelmällisyyteen, tiineyteen, emon ja poikasen käytökseen sekä F_1-sukupolven kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä synnytyksen jälkeiseen päivään 13 saakka. Jos eläimiä lopetetaan kokeen aikana, testiin on otettava alussa sen verran enemmän eläimiä kuin niitä lopetetaan ennen tutkimuksen päättymistä. Myös ylimääräisen, kymmenestä eläimestä (viisi kumpaakin sukupuolta) koostuvan satelliittiryhmän käyttöä voidaan harkita verrokkiryhmässä ja suurimman annoksen ryhmässä, jotta systeemisten toksisten vaikutusten korjaantuvuutta, jatkuvuutta ja ilmaantumisen viivästymistä voidaan havainnoida vähintään 14 päivän ajan käsittelyn jälkeen. Satelliittiryhmien eläimiä ei pariuteta, eikä niitä näin ollen käytetä lisääntymis-/kehitystoksisuuden arviointiin.

Annostelu

28. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Jos sopivia tietoja yleisestä toksisuudesta ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen määritystesti (samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä käyttäen) käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

29. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki saatavilla olevat aikaisemmat toksisuustiedot ja (toksiko)kineettiset tiedot. Lisäksi on otettava huomioon, että tiineiden ja muiden kuin tiineiden eläinten herkkyydessä voi olla eroja. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai selviä kärsimyksiä. Sen jälkeen annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

30. Jos havaitaan yleistä toksisuutta (kuten painonlaskua, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), hormonitoiminnan kannalta herkkiin päätetapahtumiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varauksellisesti.

Raja-annostesti

31. Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti / vrk tai jota annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna vastaava prosenttiosuus (painomääritysten perusteella), tehdyssä oraalisessa testissä, joka on tehty tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita myrkyllisiä vaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus useilla annostasoilla ei ehkä ole välttämätön. Raja-annostestiä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa. Muiden antotapojen kuten inhalaation tai ihoapplikaation osalta suurin mahdollinen altistus määräytyy yleensä testikemikaalien fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella.

Annostelu

32. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa olla yli 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästäovat

ärsyttävät tai syövyttävät testikemikaalit, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testikemikaalin määrän vaihtelu on minimoitava pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä.

33. Kun testikemikaalit annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalin määrät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos testikemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain siten, että annostaso pysyy samana eläimen painoon nähden. Mikäli yhdistelmätutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen tai täydellisen lisääntymistoksisuustutkimuksen esitestinä, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samanlaista ruokavaliota.

Testiaikataulu

34. Testikemikaalia on alettava antaa kummallekin sukupuolelle vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua sen jälkeen, kun eläimiä on sopeutettu vähintään viisi päivää ja kun eläimistä on seulottu ne naaraat, joiden kiimakierto on normaali (altistusta edeltävällä kahden viikon jaksolla). Tutkimus on aikataulutettava siten, että kiimakierron arviointi alkaa pian sen jälkeen, kun eläimet ovat saavuttaneet täyden sukukypsyyden. Eri rottakannoissa ja eri laboratorioissa voi olla tässä vaihtelua; esimerkiksi Sprague-Dawley-rotat tulevat sukukypsiksi 10-viikkoisina, Wistar-rotat taas noin 12-viikkoisina. Poikineet emot on lopetettava päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen. Jotta emot voivat paastota ennen verinäytteen ottamista (jos tämä vaihtoehto on ensisijainen), emoja ja niiden jälkeläisiä ei välttämättä tarvitse lopettaa samana päivänä. Syntymäpäivä (ts. kun synnytys on tapahtunut) määritellään synnytyksen jälkeiseksi päiväksi 0. Naaraat, joiden osalta parittelua ei voida todeta tapahtuneen, lopetetaan 24–26 päivää parittelujakson viimeisen päivän jälkeen. Annostelua jatketaan kummallekin sukupuolelle parittelujakson aikana. Uroksille annostelua on jatkettava parittelujakson jälkeen vähintään siihen saakka, kunnes annostelujakso on kokonaisuudessaan vähintään 28 päivää. Sen jälkeen urokset lopetetaan. Vaihtoehtoisesti ne pidetään elossa ja annostelua jatketaan mahdolliseen toiseen parittelukertaan asti, jos sitä pidetään tarkoituksenmukaisena.

35. Annostelua tiineeksi tulleille naaraille on jatkettava tiineyden ajan ja vähintään synnytyksen jälkeiseen päivään 13 asti, kyseinen päivä mukaan luettuna, tai lopettamista edeltävään päivään saakka. Tutkimuksissa, joissa testikemikaalia annostellaan hengitysteiden tai ihon kautta, annostelua on jatkettava vähintään tiineyden päivään 19 saakka, kyseinen päivä mukaan luettuna, ja annostelua on jatkettava mahdollisimman pian, viimeistään kuitenkin synnytyksen jälkeisenä päivänä (SJP) 4.

36. Niitä satelliittiryhmän eläimiä, jotka on varattu seurantahavaintoihin (jos tutkimuksessa tehdään niitä), ei pariuteta. Niitä on pidettävä ilman altistusta vähintään 14 päivää ensimmäisen suunnitellun emojen lopettamispäivän jälkeen, jotta voidaan todeta toksisten vaikutusten ilmaantuneen viipeellä, pysyneen tai korjaantuneen.

37. Lisäyksessä 2 on kaavio testiaikataulusta.

Kiimakierrot

38. Kiimakiertoja on seurattava ennen altistuksen aloittamista, jotta tutkimukseen voidaan valita naaraita, joiden kiimakierto on säännöllinen (ks. 27 kohta). Myös irtosolunäytteitä on seurattava päivittäin altistusjakson alkamisesta siihen saakka, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen. Jos annostelun aloittamisen epäillään aiheuttavan akuutteja stressireaktioita, jotka voivat muuttaa kiimakiertoja, laboratoriot voivat altistaa koe-eläimet testikemikaalille kahden viikon ajaksi ja ottaa niiltä irtosolunäytteet päivittäin, jotta ne voivat seurata kiimakiertoa vähintään kahden viikon ajan parittelua edeltävällä jaksolla. Seurantaa on jatkettava parittelujaksolla siihen saakka, että parittelun voidaan todeta tapahtuneen. Vagina-/kohdunkaulasolujen ottamisessa on pyrittävä välttämään limakalvon vaurioittamista, sillä se voi aiheuttaa valetiineyden (8) (9).

Paritus

39. Tässä tutkimuksessa on käytettävä yleensä 1:1-parittelua (yhden uroksen ja yhden naaraan parittelu). Poikkeuksia voidaan tehdä, jos yksittäisiä uroksia kuolee. Naaras on laitettava häkkiin saman uroksen kanssa, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen tai kunnes kaksi viikkoa on kulunut. Naaraat on tutkittava joka aamu sperman tai vaginatulpan havaitsemiseksi. Tiineyspäivä 0 määritellään päiväksi, jolloin todisteet parittelusta vahvistetaan (vaginatulpan muodostuminen tai spermaa havaitaan). Jos parittelua ei tapahdu, voidaan harkita naaraan uutta paritusta saman ryhmän hedelmällisiksi todettujen urosten kanssa.

Poikueiden koko

40. Päivänä 4 synnytyksen jälkeen kunkin poikueen kokoa voidaan mukauttaa poistamalla siitä poikasia satunnaisvalinnalla siten, että yhteen poikueeseen jää neljä tai viisi poikasta kumpaakin sukupuolta sen mukaan, mikä on käytetyn rottakannan normaali poikuekoko. Kahdesta ylimääräisestä poikasesta on otettava verinäytteet, jotka yhdistetään ja joita käytetään seerumin T4-pitoisuuden määrittämiseen. Poikasten valikoiva eliminointi esimerkiksi painon tai peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Jos uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää neljää tai viittä poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi kuusi urosta ja neljä naarasta). Poikasia ei eliminoida poikueesta, jos poikueen koko supistuisi karsintatavoitetta pienemmäksi (8 tai 10 poikasta / poikue). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen karsimistavoitetta enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

41. Jos poikueen kokoa ei mukauteta, jokaisesta poikueesta lopetetaan kaksi poikasta päivänä 4 syntymän jälkeen, ja niiltä otetaan verinäytteet seerumin kilpirauhashormonipitoisuuden mittausta varten. Mikäli mahdollista, näiden kahden poikasen tulisi olla naaraita, jotta urospuolisista poikasista voidaan tutkia nännien vetäytyminen, mutta tämä ei saa johtaa siihen, ettei poikueeseen jäisi naaraspuolisia poikasia arvioitavaksi tutkimuksen päättyessä. Yhtään poikasta ei eliminoida, jos poikueen koko pienenisi alle 8 tai 10 poikaseen / poikue (käytetyn rottakannan normaalin poikuekoon mukaan). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen normaalia poikuekokoa enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

Havainnot

42. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, että odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Eläinten terveydentila on kirjattava. Eläinten sairastavuus ja kuolleisuus tarkistetaan vähintään kahdesti päivässä.

43. Kaikkia poikasia saaneita eläimiä on havainnoitava kliinisesti seikkaperäisesti kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja sen jälkeen vähintään kerran viikossa. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella mieluiten samaan kellonaikaan joka päivä. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. Vaihtelut koeolosuhteissa on pyrittävä minimoimaan, ja havainnoijien on mieluiten oltava annostelusta tietämättömiä henkilöitä. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen), vaikea tai pitkittynyt synnytys tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (10).

44. Yhden kerran tutkimuksen aikana viideltä urokselta ja viideltä naaraalta, jotka valitaan satunnaisesti kustakin ryhmästä, on arvioitava aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (ts. kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (8) (9) (11), tarttumaotteen voimakkuus (12) ja motorinen toiminta (13). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää. Urosten osalta nämä toiminnalliset havainnot on tehtävä annostelujakson loppupuolella hieman ennen suunniteltua lopettamista mutta ennen hematologisia tai kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten tarvittavien verinäytteiden ottamista (ks. 53–56 kohta ja alaviite 1). Naaraiden tulee olla fysiologisesti samanlaisessa tilassa näiden toiminnallisten testien aikana, ja ne olisi mieluiten testattava kerran imetyksen viimeisellä viikolla (ts. IP 6–13) hieman ennen suunniteltua lopetusta. Mahdollisuuksien mukaan emoja ja poikasia tulisi pitää erossa toisistaan vain hyvin lyhyitä aikoja.

45. Kerran tutkimuksen loppupuolella tehtäviä toiminnallisia havaintoja ei tarvitse tehdä, jos kyseessä on myöhemmän subkroonisen (90 päivän) tutkimuksen tai pitkäaikaistutkimuksen esitutkimus. Tällöin toiminnalliset havainnot tehdään seurantatutkimuksessa. Toisaalta tästä toistuvan annostelun tutkimuksesta saatavat toiminnallisia havaintoja koskevat tiedot voivat helpottaa annostasojen valintaa myöhempää subkroonista tutkimusta tai pitkäaikaistutkimusta varten.

46. Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei myöskään tarvitse tehdä ryhmillä, joissa muutoin ilmenee merkkejä myrkyllisyydestä laajuudessa, joka häiritsisi merkitsevästi toiminnallisten kokeiden suorittamista.

47. Tiineyden kesto on kirjattava, ja se lasketaan tiineyden päivästä 0 alkaen. Jokainen poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen, jotta voidaan määrittää poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä, pienikasvuisten poikasten lukumäärä (poikaset, jotka ovat huomattavasti pienempiä kuin verrokkiryhmän poikaset) ja selvästi näkyvät epämuodostumat.

48. Elävät poikaset on laskettava ja niiden sukupuoli on määritettävä ja poikueet on punnittava 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Poikasia saaneita eläimiä koskevien havaintojen lisäksi (ks. 43 ja 44 kohta) on kirjattava myös poikasten kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen.

49. Jokaisen poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava samana synnytyksen jälkeisenä päivänä välillä SJP 0 – SJP 4. Poikasen paino on punnittava samana päivänä, kun peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys mitataan, ja tämä mittaus olisi normalisoitava poikasen koon mittauksen perusteella, mieluiten kuutiojuureen painosta (14). Urospuolisten poikasten nännien/nännipihojen määrä on laskettava SJP:nä 12 tai 13 OECD:n ohjeasiakirjassa 151 suositellun mukaisesti (15).

Eläimen paino ja ravinnon/veden kulutus

50. Urokset ja naaraat on punnittava ensimmäisenä annostelupäivänä, vähintään kerran viikossa sen jälkeen ja tutkimuksen päättyessä. Tiineyden aikana naaraat on punnittava päivinä 0, 7, 14 ja 20 sekä 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Havainnot raportoidaan erikseen kustakin täysikasvuisesta eläimestä.

51. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ennen parittelua sekä tiineyden ja imetyksen aikana. Ravinnon kulutuksen mittaus parittelujakson aikana ei ole pakollista, mutta sen voi tehdä. Myös vedenkulutus näiden jaksojen aikana on mitattava, jos testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna.

Hematologia

52. Seuraavat hematologiset tutkimukset on tehtävä kerran tutkimuksen aikana viidellä uroksella ja viidellä naaraalla, jotka valitaan satunnaisesti kustakin ryhmästä: hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, retikulosyytit, leukosyyttien kokonaismäärä ja erittelylaskenta, trombosyyttien määrä ja veren hyytymisajan/-potentiaalin mittaus. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalilla tai sen oletetuilla metaboliiteilla on tai epäillään olevan hapettavia ominaisuuksia, ovat methemoglobiinipitoisuus ja Heinzin kappaleet.

53. Verinäytteet on otettava määrätystä paikasta. Naaraiden on oltava fysiologisesti samanlaisessa tilassa näytteenoton aikana. Jotta vältetään käytännön hankaluudet, jotka liittyvät tiineyden alkamisen vaihteluun, naaraiden verinäytteet voidaan ottaa parittelua edeltävän jakson lopussa vaihtoehtona sille, että ne otetaan juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Urosten verinäytteet on otettava mieluiten juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Vaihtoehtoisesti verinäytteet voidaan ottaa uroksilta myös parittelua edeltävän jakson lopussa, jos niin tehtiin myös naaraiden kanssa.

54. Verinäytteet on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa.

Kliininen biokemia

55. Kliinisen biokemian määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan jokaisesta ryhmästä valitulta viideltä urokselta ja viideltä naaraalta. On suositeltavaa, että eläimet paastoaisivat yli yön ennen verinäytteiden ottoa ([1]). Plasma- ja seerumikokeisiin tulee sisällyttää natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, kokonaisproteiini ja albumiini, vähintään kaksi hepatosellulaarisia vaikutuksia osoittavaa entsyymiä (kuten alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi ja sorbitolidehydrogenaasi) ja sappihapot. Muiden entsyymien (maksasta tai muualta peräisin olevien) ja bilirubiinin mittauksista voidaan saada hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa.

56. Verinäytteet määrätystä paikasta otetaan seuraavan aikataulun mukaan:

— vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta päivänä 4 syntymän jälkeen, jos se on mahdollista poikasten lukumäärän perusteella (ks. 40–41 kohta)

— kaikilta emoilta ja vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta tutkimuksen päättyessä päivänä 13 ja

— kaikilta täysikasvuisilta uroksilta tutkimuksen päättyessä.

Kaikki verinäytteet on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Päivänä 13 otetuista poikasten ja täysikasvuisten urosten verinäytteistä määritetään kilpirauhashormonien (T4) pitoisuus seerumissa. Emojen ja päivänä 4 poikasilta otettujen verinäytteiden T4-pitoisuus määritetään, jos se on tarpeen. Myös muiden hormonien pitoisuuksia voidaan määrittää, jos se on tarpeen. Poikasten verinäytteet voidaan yhdistää poikueittain kilpirauhashormonin määritystä varten. Kilpirauhashormonit (T4 ja THS) on mitattava mieluiten kokonaispitoisuutena.

([1]) Yön yli paastoaminen on suositeltavaa monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta yön yli paastoaminen voi häiritä (tiineiden) eläinten yleistä metaboliaa, imetys- ja hoivakäyttäytymistä ja etenkin ruokintatutkimuksissa päivittäistä altistusta testikemikaalille. Jos eläin paastoaa yön yli, kliiniset biokemialliset määritykset tulee tehdä urosten osalta neljännellä tutkimusviikolla tehtävien toiminnallisten havaintojen jälkeen. Emoja on pidettävä häkissä yksi ylimääräinen päivä sen jälkeen, kun poikaset on poistettu häkistä esimerkiksi SJP:nä 13. Emojen on paastottava yön yli imetyspäivän 13–14 jälkeen, ja kliinis-biokemiallisten parametrien määrityksessä on käytettävä terminaaliverinäytteitä.

57. Valinnaisesti viideltä satunnaisesti valitulta urokselta jokaisesta ryhmästä voidaan ottaa ajoitetut virtsanäytteet tutkimuksen viimeiseltä viikolta, ja näytteistä voidaan tehdä seuraavat määritykset: ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/tai verisolut.

58. Lisäksi on harkittava yleistä kudosvauriota osoittavien seerumissa esiintyvien merkkiaineiden määritystä. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalin tunnetut ominaisuudet voivat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan tähän liittyviin metaboliaprofiileihin, ovat kalsium, fosfaatti, triglyseridien ja glukoosin paastoarvot, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliiniesteraasi. Nämä on määritettävä tapauskohtaisesti.

59. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

— lopettamistapa: on vältettävä aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

60. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla.

61. Jos aiemmat lähtötason tiedot eivät riitä, hematologiset ja kliiniset biokemialliset muuttujat on määritettävä ennen annostelun aloittamista tai mieluiten ryhmällä eläimiä, jotka eivät kuulu koeryhmiin. Naaraiden osalta tiedot on saatava imettävistä eläimistä.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

62. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityistä huomiota on kiinnitettävä lisääntymiselimiin. Kiinnittymiskohtien määrä on kirjattava. Irtosolunäytteet on tutkittava ruumiinavauspäivänä, jotta kiimakierron vaihe voidaan määrittää ja jotta voidaan mahdollistaa korrelaatio naaraan lisääntymiselinten histopatologisen tutkimuksen kanssa.

63. Kaikkien täysikasvuisten urospuolisten eläinten kiveksistä ja lisäkiveksistä sekä eturauhasesta ja rakkularauhasesta sekä niiden etuosista kokonaisuudessaan on poistettava kaikki ylimääräinen kudos tarvittaessa, ja niiden märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Lisäksi elimistä voidaan valinnaisesti punnita esimerkiksi levator ani- ja bulbocavernosus-lihaskompleksi, Cowperin rauhaset ja terska uroksilta sekä parilliset munasarjat (märkäpaino) ja kohtu (myös kohdunkaula) naarailta. Jos nämä päätetään punnita, se on tehtävä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Kaikkien täysikasvuisten eläinten munasarjat, kivekset, lisäkivekset, avustavat sukupuolielimet ja kaikki elimet, joissa on makroskooppisia leesioita, on säilöttävä.

64. Kaikkien täysikasvuisten urosten ja naaraiden sekä jokaisesta poikueesta yhden urospoikasen ja yhden naaraspoikasen (päivä 13) kilpirauhaset on säilöttävä tarkoituksenmukaisimmalla kiinnitysaineella myöhemmin tehtäväksi suunniteltua histopatologista tutkimusta varten. Kilpirauhasen paino voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia. Verinäytteet tulee ottaa nimetystä kohdasta juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Näytteet tulee säilyttää asianmukaisissa olosuhteissa (ks. 56 kohta).

65. Lisäksi vähintään viiden täysikasvuisen uroksen ja naaraan, jotka valitaan satunnaisesti jokaisesta ryhmästä (lukuun ottamatta niitä, jotka on löydetty kuolemaisillaan ja/tai lopetettu ennen tutkimuksen päättymistä), maksasta, munuaisista, lisämunuaisista, kateenkorvasta, pernasta, aivoista ja sydämestä on poistettava kaikki ylimääräinen kudos tarvittaessa, ja niiden märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Seuraavat kudokset on säilöttävä sellaiseen kiinnitysaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyypille ja myöhemmin tehtäväksi suunniteltuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki silmin havaittavat vauriot, aivot (edustavat alueet, myös iso- ja pikkuaivot ja aivosilta), selkäydin, silmä, mahalaukku, ohutsuoli, paksusuoli (myös Peyerin levyt), maksa, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, kateenkorva, henkitorvi ja keuhkot (säilötään puhaltamalla keuhkot täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla ne sitten kiinnitysaineeseen), sukurauhaset (kivekset ja munasarjat), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhanen sekä niiden etuosat), vagina, virtsarakko, imusolmukkeet (proksimaalisimman imusolmukkeen lisäksi on otettava vielä toinen imusolmukelaboratorion

kokemuksen perusteella sopivasta paikasta (16)), ääreishermo (lonkka- tai säärihermo) mieluiten läheltä lihasta, luurankolihas ja luu sekä osa luuydintä (leike tai vaihtoehtoisesti tuore luuydinaspiraatti). Kivekset suositellaan kiinnitettävän upottamalla ne Bouinin tai muunneltuun Davidsonin kiinnitysaineeseen (16) (17) (18); formaliinikiinnitystä ei suositella näille kudoksille. Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella voi olla tarpeen tutkia myös muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilöttävä.

66. Seuraavista kudoksista voi löytyä tärkeitä merkkejä hormonitoimintaan liittyvistä vaikutuksista: sukurauhaset (munasarjat ja kivekset), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, rakkularauhanen ja sen etuosa, dorsolateraalinen ja ventraalinen eturauhanen), vagina, aivolisäke, uroksen rintarauhanen ja lisämunuainen. Uroksen rintarauhasten muutoksia ei ole dokumentoitu riittävästi, mutta tämä parametri voi olla hyvin herkkä aineille, joilla on estrogeenisia vaikutuksia. Niiden elinten/kudosten, joita ei ole lueteltu kohdassa 65, havainnointi ei ole pakollista.

67. Kuolleet poikaset ja päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen lopetetut poikaset on tutkittava huolellisesti ulkoisesti selvästi näkyvien epämuodostumien varalta. Huomiota on kiinnitettävä erityisesti ulkoisiin lisääntymiselimiin, joista on tutkittava, näkyykö niissä merkkejä muuttuneesta kehityksestä.

Histopatologia

68. Kaikille verrokkiryhmään ja suuriannoksiseen ryhmään kuuluneiden eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä perusteellinen histopatologinen tutkimus (erityistä huomiota on kiinnitettävä spermatogeneesiin urosten sukupuolirauhasissa ja kivesten interstitiaalisolujen rakenteeseen). Poikasten ja muiden täysikasvuisten eläinten kilpirauhanen voidaan tutkia, jos se on tarpeen. Histopatologiset tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos altistukseen liittyviä muutoksia havaitaan suuren annoksen ryhmässä. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (10) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

69. Kaikki suuret leesiot on tutkittava. NOAEL-arvon määrittämisen tueksi on tutkittava myös muiden annosryhmien kohde-elimet, etenkin niistä ryhmistä, joissa havaittavia haittavaikutuksia ei vaikuttaisi aiheutuneen.

70. Mahdolliseen satelliittiryhmään kuuluvilta eläimiltä tulee tutkia histopatologisesti sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

71. Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot. Lisäksi kaikki tiedot on esitettävä taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin eläinten lukumäärä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, kuoleman tai inhimillisistä syistä lopettamisen ajankohta, hedelmällisten eläinten lukumäärä, tiineiden naaraiden lukumäärä, niiden eläinten määrä, joissa toksisuusvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista toksisuuden merkeistä sekä mahdollisten toksisten vaikutusten alkamisaika, kesto ja vakavuus, histopatologisten muutosten tyypit sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta. Lisäyksessä 3 on malli yhteenvetotaulukosta, joka on osoittautunut erittäin hyödylliseksi lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa.

72. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Verrattaessa vaikutusta pitoisuusalueen mukaan on vältettävä monien t-testien käyttöä. Tilastomenetelmät tulee valita tutkimusasetelman suunnitteluvaiheessa. Peräaukon ja sukupuolielinten välistä etäisyyttä ja nännien vetäytymistä koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Tarvittaessa poikue on analysoitava yksikkö. Poikasen painoa koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Tutkimuksen rajallisuuden vuoksi testien ”merkitsevyyttä” tarkastelevista tilastoanalyyseista on varsin vähän hyötyä monien päätetapahtumien, etenkin lisääntymiseen liittyvien päätetapahtumien, osalta. Jotkin eniten käytetyistä menetelmistä, varsinkin keskilukujen määrittämisessä käytetyt parametritestit, eivät ole tarkoituksenmukaisia. Jos tilastoanalyyseja tehdään, valitun menetelmän on oltava tutkitun muuttujan jakauman kannalta asianmukainen, ja se on valittava ennen tutkimuksen aloittamista.

Tulosten arviointi

73. Tämän toksisuustutkimuksen löydökset on arvioitava havaittujen vaikutusten, ruumiinavauksen ja mikroskopialöydösten avulla. Arvioinnissa tulee todeta testikemikaalin annoksen ja poikkeavuuksien – mukaan lukien vakavat vauriot, tietyt kohde-elimet, hedelmättömyys, kliiniset poikkeavuudet, vaikutukset lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, painon muutokset, vaikutukset kuolleisuuteen sekä muut toksiset vaikutukset – esiintyvyyden, ilmaantuvuuden ja vakavuuden välinen mahdollinen suhde.

74. Koska urosten altistusjakso on lyhyt, uroksen lisääntymiskykyyn kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa tulisi harkita myös kivesten ja lisäkivesten histopatologista tutkimusta hedelmällisyystietojen ohella. Lisääntymistä/kehitystä koskevien aiempien kontrollitietojen (esimerkiksi poikueen koko, peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys, nännien vetäytyminen, seerumin T4-pitoisuus) käytöstä voi olla hyötyä tutkimuksen tulosten tulkinnan apuna.

75. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

Testiraportti

76. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alussa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Koeolosuhteet:

— annostason valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, saavutetuista pitoisuuksista sekä valmisteen stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaistamismenettelystä, jolla valittiin karsittavat poikaset, jos karsinta tehtiin.

Tulokset:

— paino / painon muutokset

— ravinnon ja veden kulutus tarvittaessa

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, myös hedelmällisyyden, tiineyden ja toksisuuden mahdollisten muiden merkkien

— osalta

— tiineyden kesto

— toksiset tai muut vaikutukset lisääntymiseen, poikasiin, syntymänjälkeiseen kasvuun jne.

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— arvioinnit aistitoiminnoista, tarttumaotteen voimakkuudesta ja motorisesta aktiivisuudesta

— verikokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— kliiniset biokemialliset kokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— niiden täysikasvuisten naaraiden määrä, joilla on normaali tai epänormaali kiimakierto, ja kierron pituus

— elävänä syntyneiden poikasten määrä ja kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet abortoitumiset

— niiden poikasten lukumäärä, joilla on selvästi näkyviä epämuodostumia ulkoisten sukupuolielinten silmämääräinen arviointi, pienikasvuisten poikasten lukumäärä

— eläinten kuolinaika tutkimusaikana tai tieto siitä, pysyivätkö eläimet hengissä tutkimuksen päättymiseen saakka

— kiinnittymisten lukumäärä, poikueen koko ja painot kirjaushetkellä

— poikasten painotiedot

— peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys kaikilta poikasilta (sekä paino tämän etäisyyden mittauspäivänä)

— urospoikasten nännien vetäytyminen

— kilpirauhashormonipitoisuudet päivänä 13 urospoikasilta ja täysikasvuisilta uroksilta (ja emoilta ja poikasilta päivänä 4, jos pitoisuus mitataan)

— poikasia saaneiden eläinten paino lopetettaessa ja niiden elinten paino

— ruumiinavauslöydökset yksityiskohtaiset tiedot kaikista histopatologisista löydöksistä

— absorptiotiedot (jos saatavilla)

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

Tulosten tulkitseminen

77. Tutkimuksen tuloksena saadaan arviot toistettujen annosten antamiseen liittyvästä lisääntymis-/kehitystoksisuudesta. Koska tutkimuksessa painotetaan sekä yleiseen toksisuuteen että lisääntymis-/kehitystoksisuuteen liittyviä päätetapahtumia, tutkimustulosten perusteella voidaan erotella toisaalta ne lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvat vaikutukset, joiden osalta yleistä toksisuutta ei ilmene, sekä toisaalta ne vaikutukset, jotka ilmenevät ainoastaan pitoisuuksilla, jotka ovat myrkyllisiä myös emoille ja isille (ks. 7–11 kohta). Sen perusteella tiedetään, onko tehtävä lisätutkimuksia, ja se voi ohjata myös myöhempien tutkimusasetelmien suunnittelua. OECD:n ohjeasiakirjaa 43 on käytettävä lisääntymiseen ja kehitykseen kohdistuviin vaikutuksiin liittyvien tulosten tulkinnan apuna (19). OECD:n ohjeasiakirjassa 106 (jyrsijöillä tehtyjen endokriinisten ja lisääntymiseen liittyvien testien histologinen arviointi (16) on tietoa (endokriinisten) elinten ja irtosolunäytteiden preparoinnista ja arvioinnista. Näistä tiedoista voi olla apua tämän testimenetelmän käyttämisessä.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(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. Teoksessa: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, s. 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT (KS. MYÖS OECD:N OHJEASIAKIRJAN 150 KOHTA 20)

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kemikaali on aine tai seos.

Kehitystoksisuus Pre-, peri-, postnataalisina, rakenteellisina tai toiminnallisina häiriöinä jälkeläisissä esiintyvän lisääntymistoksisuuden ilmeneminen.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina.

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden merkkejä. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Hedelmällisyyden heikentyminen tarkoittaa uroksen tai naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn häiriöitä.

Emoille myrkylliset vaikutukset Tiineinä oleviin naaraisiin kohdistuvat haittavaikutukset, joita esiintyy joko spesifisti (suora vaikutus) tai epäspesifisti (epäsuora vaikutus) ja jotka liittyvät tiineyteen.

NOAELon lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Lisääntymistoksisuus tarkoittaa haitallisia vaikutuksia, jotka kohdistuvat jälkeläisiin, ja/tai uroksen ja naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn heikentymistä.

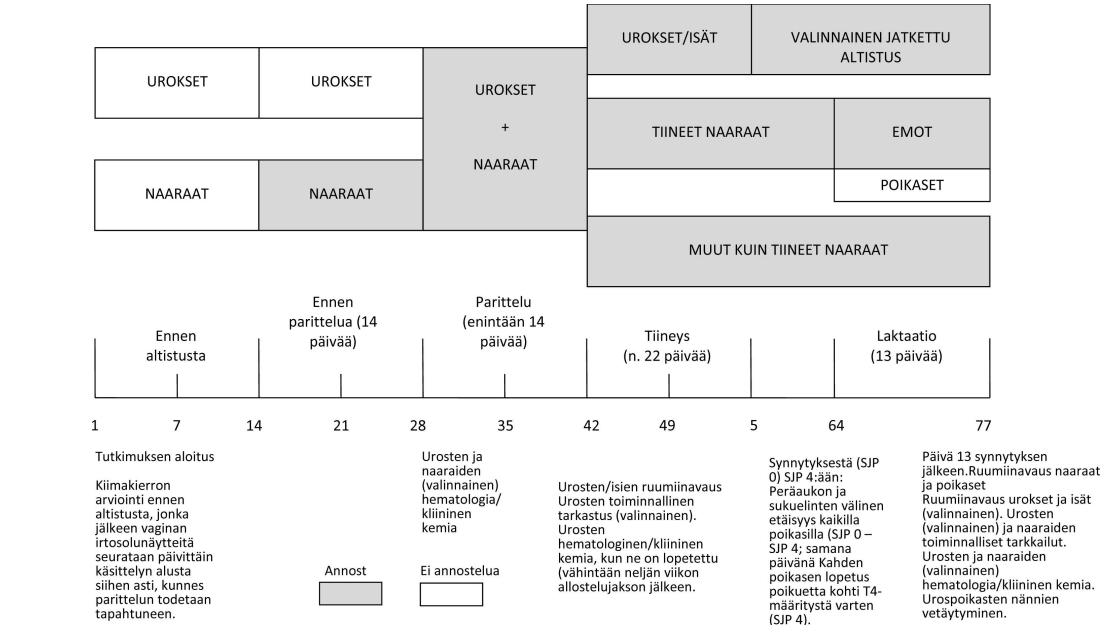
Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

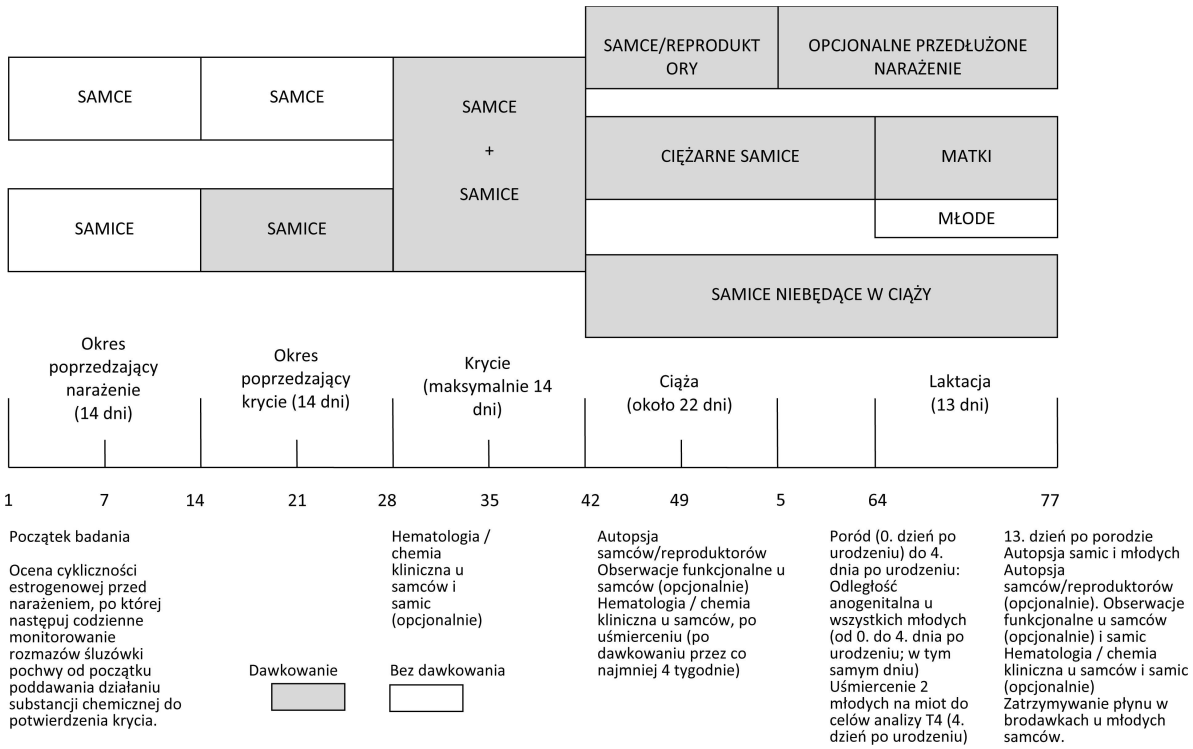
Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

Lisäys 2

KAAVIO TESTIAIKATAULUSTA (TUTKIMUKSEN ENIMMÄISKESTO TÄYDEN 14 PÄIVÄN PITUISEN PARITTELUJAKSON PERUSTEELLA)





Lisäys 3

YHTEENVETOTAULUKKO LISÄÄNTYMISEEN/KEHITYKSEEN KOHDISTUVISTA VAIKUTUKSISTA

HAVAINNOT	ARVOT				
Annostus (yksiköt)…….	0 (kontrolli)	…	…	…	…
Aloittaneet parit (N)					
Kiimakierto (vähintään keskimääräinen pituus ja epäsäännöllisten kiertojen tiheys)					
Naaraat, joissa merkkejä parittelusta (N)					
Tiineeksi tulleet naaraat (N)					
Hedelmöityspäivät 1–5 (N)					
Hedelmöityspäivät 6–… [1] (N)					
Tiineys ≤ 21 päivää (N)					
Tiineys = 22 päivää (N)					
Tiineys ≥ 23 päivää (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia päivänä 4 synn. jälk. (N)					
Kiinnittyneet alkiot / emo (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo synnytyksessä (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo päivänä 4 (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) synnytyksessä (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikueen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikueen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikasen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikasen paino peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden mittauksen yhteydessä (urosten ja naaraiden keskiarvot)					
Poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys samana syntymänjälkeisenä päivänä, syntymä – päivä 4 (urosten ja naaraiden keskiarvot, merkitse SJP)					

HAVAINNOT	ARVOT				
Poikasen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikasen paino päivänä 13 (keskiarvo)					
Urospoikasten nännin vetäytyminen päivänä 13 (keskiarvo)					
	POIKKEAVAT POIKASET				
Emot, joilla 0 poikkeavaa poikasta					
Emot, joilla 1 poikkeava poikanen					
Emot, joilla ≥ 2 poikkeavaa poikasta					
JÄLKELÄISTEN KUOLEMAT					
Prenataalit tapaukset (kiinnittymiset miinus elävänä syntyneet poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					
Postnataalit tapaukset (elävänä syntyneet poikaset miinus SJP:nä 13 elossa olevat poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					

([1]) Parittelujakson viimeinen päivä

B.65 KALVOESTEESEEN PERUSTUVA *IN VITRO* -TESTIMENETELMÄ IHOSYÖVYTTÄVYYDEN TESTAAMISEEN

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 435 (2015). Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan pysyvän ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantumista testikemikaalin annostelun jälkeen Yhdistyneiden kansakuntien yhdenmukaistetussa kemikaalien luokittelu- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti. Tässä testimenetelmässä, joka vastaa OECD:n päivitettyä testiohjetta 435, esitellään kalvon läpäisynestokykyyn perustuva *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan käyttää syövyttävien kemikaalien tunnistamisessa. Tässä menetelmässä käytetään keinotekoista kalvoa, joka on kehitetty reagoimaan syövyttäviin kemikaaleihin samalla tavalla kuin eläimen iho.

2. Ihosyövyttävyyttä on perinteisesti tutkittu laittamalla testikemikaalia elävien koe-eläinten iholle ja arvioimalla kudosvaurion laajuutta tietyn ajan kuluttua (2). Tämän testimenetelmän lisäksi joukko muitakin *in vitro* -testimenetelmiä on hyväksytty vaihtoehdoiksi (3)(4) *in vivo* -vakiomenetelmälle, jossa käytetään kanin ihoa (tämän liitteen B.4 luku, joka vastaa OECD:n testiohjetta 404) syövyttävien kemikaalien tunnistamiseen (2). YK:n GHS-järjestelmään liittyvässä, ihosyövyttävyyden arviointia ja luokitusta koskevassa vaiheittaisessa testaus- ja arviointistrategiassa sekä ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa suositellaan validoitujen ja hyväksyttyjen, moduulien 3 ja 4 mukaisten *in vitro* -testimenetelmien käyttöä (1) (5). Yhdennetyissä lähestymistavoissa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan i) ohjeita siitä, miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen, tai negatiivisten tulosten yhteydessä (5). Tässä modulaarisessa lähestymistavassa *in vitro* -testimenetelmillä saatujen positiivisten tulosten perusteella kemikaali voidaan luokitella syövyttäväksi ilman eläinkokeita. Näin voidaan vähentää ja parantaa eläinten käyttöä näissä kokeissa ja välttää kipua ja kärsimystä, joita voisi aiheutua, jos tähän tarkoitukseen käytettäisiin eläimiä.

3. Validointitutkimuksia on tehty kalvoesteeseen perustuvasta *in vitro* -mallista, joka on kaupallisesti saatavana Corrositex®-nimellä (6) (7) (8). Tutkimus osoitti, että mallin kokonaistarkkuus ihosyövyttävyyden ennustamisessa oli 79 prosenttia (128/163), herkkyys 85 prosenttia (76/89) ja spesifisyys 70 prosenttia (52/74) tietokannassa, jossa oli 163 ainetta ja seosta (7). Vahvistetun validiteetin perusteella tätä validoitua vertailumenetelmää (VVM:ää) on suositeltu käytettäväksi osana kemikaalien ihosyövyttävyysvaarapotentiaalin arvioinnin vaiheittaista testausstrategiaa (5) (7). Ennen kuin ihosyövyttävyyttä selvittävää kalvoesteeseen perustuvaa *in vitro* -mallia voidaan käyttää sääntelytarkoituksiin, on määritettävä sen luotettavuus, merkityksellisyys (tarkkuus) ja ehdotetun käytön rajoitukset, jotta voidaan varmistaa, että sitä voidaan verrata validoituun vertailumenetelmään 9 vahvistettujen suoritusvaatimusten mukaisesti (10). OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä taataan vasta, kun ehdotettu uusi tai päivitetty suoritusvaatimusten mukainen menetelmä on tarkistettu ja sisällytetty OECD:n vastaavaan testiohjeeseen. Tällä hetkellä OECD:n testiohjeeseen 435 sisältyy vain yksi *in vitro* -menetelmä ja tämä testimenetelmä eli kaupallisesti saatavilla oleva Corrositex®-malli.

4. Muut ihosyövyttävyyden testaukseen tarkoitetut testimenetelmät perustuvat rekonstruoidun ihmisihon (OECD:n testiohje 431) (3) ja eristetyn rotan ihon (OECD:n testiohje 430) (4) käyttöön. Tämän testimenetelmän avulla syövyttäviä kemikaaleja voidaan myös jakaa alaluokkiin YK:n GHS-järjestelmän syövyttävyyden alaluokkien ja YK:n kuljetusmääräyksien kolmen pakkausryhmän mukaisesti syövyttävyysvaaran osalta. Tämä testiohje hyväksyttiin alun perin vuonna 2006, ja sitä päivitettiin vuonna 2015 ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevan ohjeasiakirjan mukaiseksi. Samalla päivitettiin myös luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista.

MÄÄRITELMÄT

5. Käytettävät määritelmät esitetään lisäyksessä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

6. Tässä testimenetelmässä kuvatulla testillä voidaan tunnistaa syövyttävät testikemikaalit ja jaotella niitä alaluokkiin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti (taulukko 1). Lisäksi tätä testimenetelmää voidaan käyttää tiettyjen kemikaaliluokkien (esimerkiksi orgaaniset ja epäorgaaniset hapot, happojohdannaiset ([2]) ja emäkset) syövyttävyyttä ja syövyttämättömyyttä koskevien päätösten tekemisessä tietyissä kuljetukseen liittyvissä testaustarkoituksissa (7) (11) (12). Tässä testimenetelmässä kuvataan yleinen menettely, joka on samanlainen kuin validoituvertailutestimenetelmä

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

([2]) ”Happojohdannainen” on epätarkka luokka, joka määritellään laajasti haposta suoraan, muuntamalla tai osittain korvaamalla tuotetuksi kemikaaliksi. Tähän luokkaan kuuluvat anhydridit, halogeenihapot, suolat ja muuntyyppiset kemikaalit.

(7). Tällä testimenetelmällä ei saada asianmukaista tietoa ihoärsytyksestä, mutta testimenetelmä B.46 (joka vastaa OECD:n testiohjetta 439) koskee nimenomaan terveysvaikutusta ihoärsytys *in vitro* (13). Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (5).

Taulukko 1

YK:n GHS-järjestelmän ihosyövyttävyysluokat ja alaluokat ([1])

Syövyttävä-luokka (luokka 1) (viranomaisille, jotka eivät käytä alaluokkia)	Mahdollisesti syövyttävä -alaluokat ([1]) (viranomaisille, jotka käyttävät alaluokkia ja CLP-asetusta)	Syövyttävä ≥ yhdellä kolmesta koe-eläimestä	
		Altistus	Havainto
Syövyttävä	Syövyttävyyden alaluokka 1A	≤ 3 minuuttia	≤ 1 tunti
	Syövyttävyyden alaluokka 1B	> 3 minuuttia / ≤ 1 tunti	≤ 14 päivää
	Syövyttävyyden alaluokka 1C	> 1 tunti / ≤ 4 tuntia	≤ 14 päivää

([1]) EU:ssa CLP-asetuksessa sovelletaan ihosyövyttävyyden kolmea alaluokkaa 1A, 1B ja 1C.

7. Validoidun vertailumenetelmän (7) rajoitus on se, etteivät monet syövyttämättömät kemikaalit ja jotkin syövyttävät kemikaalit kenties sovellu testattavaksi alustavan yhteensopivuustestin tulosten perusteella (ks. 13 kohta). Vesipohjaiset kemikaalit, joiden pH on 4,5–8,5, eivät usein sovellu testattavaksi; 85 prosenttia tällä pH-alueella testatuista kemikaaleista oli kuitenkin syövyttämättömiä eläinkokeissa (7). Kalvoesteeseen perustuvaa *in vitro* -menetelmää voidaan käyttää kiinteiden aineiden (veteen liukenevien tai liukenemattomien), nesteiden (vesipohjaisten tai ei-vesipohjaisten) ja emulsioiden testaamiseen. Testikemikaaleja, jotka eivät aiheuta havaittavaa muutosta yhteensopivuustestissä (ts. värinmuutosta validoidun vertailutestimenetelmän mukaisessa kemikaalien havaitsemisjärjestelmässä), ei kuitenkaan voida testata kalvoesteeseen perustuvalla menetelmällä, vaan ne on testattava muilla menetelmillä.

TESTIN PERIAATE

8. Testijärjestelmässä on kaksi osaa: synteettinen makromolekulaarinen biologinen este ja kemikaalien havaitsemisjärjestelmä. Sen jälkeen, kun testikemikaalia on laitettu synteettisen makromolekulaarisen kalvoesteen pinnalle, kemikaalien havaitsemisjärjestelmän avulla tällä testimenetelmällä havaitaan kalvoesteen vaurioituminen (7), jonka aiheuttavat syövyttävät testikemikaalit luultavasti samalla syövytysmekanismilla (-mekanismeilla), joka toimii / jotka toimivat myös elävällä iholla.

9. Kalvoesteen läpi tunkeutumista (tai sen läpäisyä) voidaan mitata monilla menetelmillä tai kemikaalien havaitsemisjärjestelmällä, esimerkiksi pH-indikaattorin värin muutoksella tai jollakin muulla kalvoesteen alapuolella olevan indikaattoriliuoksen ominaisuudella.

10. Kalvoesteen on todettava olevan validi eli tarkka ja luotettava aiottuun käyttötarkoitukseensa. Tähän kuuluu sen varmistaminen, että eri valmisteet ovat läpäisynesto-ominaisuuksiltaan yhtenäiset eli että niiden läpäisynestokyky säilyy syövyttämättömien kemikaalien yhteydessä ja että niillä voidaan luokitella kemikaalien syövyttävät ominaisuudet YK:n GHS-järjestelmän syövyttävyyden eri alaluokkien mukaisesti (1). Määritetty luokitus perustuu siihen, missä ajassa kemikaali tunkeutuu kalvoesteen läpi indikaattoriliuokseen.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

11. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä tämän testimenetelmän mukaista *in vitro* -kalvoestemenetelmää rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 2 suositellut 12 ainetta oikein. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelosta (10)), kunhan sovelletaan taulukossa 1 kuvattuja samoja valintaperusteita.

Taulukko 2

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet [1]

Aine [2]	CAS-nro	Kemiallinen luokka	YK:n GHS-järjestelmän alaluokka *in vivo* [3]	YK:n GHS-järjestelmän alaluokka *in vitro* [3]
Booritrifluoridihydraatti	13319-75-0	Epäorgaaniset hapot	1A	1A
Typpihappo	7697-37-2	Epäorgaaniset hapot	1A	1A
Fosforipentakloridi	10026-13-8	Epäorgaanisten happojen esiasteet	1A	1A
Valeryylikloridi	638-29-9	Happokloridit	1B	1B
Natriumhydroksidi	1310-73-2	Epäorgaaniset emäkset	1B	1B
1-(2-aminoetyyli)-piperatsiini	140-31-8	Alifaattiset amiinit	1B	1B
Bentseenisulfonyylikloridi	98-09-9	Happokloridit	1C	1C
N,N-dimetyylibentsylamiini	103-83-3	Aniliinit	1C	1C
Tetraetyleenipentamiini	112-57-2	Alifaattiset amiinit	1C	1C
Eugenoli	97-53-0	Fenolit	ES	ES
Nonyyliakrylaatti	2664-55-3	Akrylaatit/metakrylaatit	ES	ES
Natriumbikarbonaatti	144-55-8	Epäorgaaniset suolat	ES	ES

(1) Edellä luetellut 12 ainetta sisältävät kolme ainetta YK:n GHS-järjestelmän jokaisesta kolmesta syövyttävien aineiden alakategoriasta ja kolme syövyttämätöntä ainetta. Niitä on saatavana kaupallisilta toimittajilta. YK:n GHS-järjestelmä perustuu erittäin laadukkaan *in vivo* -testauksen tuloksiin. Nämä aineet on otettu niiden 40 vertailuaineen luettelosta, jotka sisältyvät minimiluetteloon kemikaaleista, jotka on määritetty validoidun vertailutestimenetelmän kanssa rakenteellisesti ja toiminnallisesti samanlaisten testimenetelmien tarkkuuden ja luotettavuuden osoittamiseen ja jotka on valittu vertailutestimenetelmän (Corrositex®) validoimiseen alun perin käytetyistä 163 vertailukemikaalista (7) (10) (14). Tämän valintaprosessin tavoitteena oli sisällyttää luetteloon mahdollisuuksien mukaan kemikaaleja, jotka edustavat erilaisia syövyttävyysvasteita (ts. syövyttämättömiä sekä YK:n pakkausryhmien I, II ja III mukaisia syövyttäviä aineita) ja jotka validoidulla vertailutestimenetelmällä voidaan mitata tai ennustaa; edustavat validointiprosessissa käytettyjä kemikaaliluokkia; ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä; antoivat toistettavia tuloksia *in vivo* -vertailutestimenetelmällä; antoivat varmoja tuloksia *in vivo* -vertailutestillä; olivat kaupallisesti saatavilla; ja joiden hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön (14).

(2) Aineet, jotka on testattu raakana tai joiden puhtaus on ≥ 90 %.

(3) YK:n GHS-järjestelmän mukaisia alaluokkia 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmät ovat I, II ja III. **ES**: ei syövyttävä.

MENETTELY

12. Seuraavissa kohdissa kuvataan syövyttävyyden arviointiin tarkoitetun, keinotekoiseen kalvoesteeseen perustuvan testimenetelmän osat ja menettelyt (7) (15) nykyisen VVM:n eli kaupallisesti saatavan Corrositexin® pohjalta. Kalvoeste sekä yhteensopivuus-/indikaattori- ja luokitteluliuokset voidaan rakentaa, valmistaa tai ostaa (esimerkiksi VVM Corrositex®). Validoidusta vertailutestimenetelmästä on saatavana testimenetelmäprotokollan malli (7). Testi on tehtävä huoneenlämpötilassa (17–25 °C), ja osien on täytettävä seuraavassa kuvatut edellytykset.

Testikemikaalin yhteensopivuustesti

13. Ennen kalvoestetestin tekemistä on tehtävä yhteensopivuustesti, jolla selvitetään, pystyykö kemikaalien havaitsemisjärjestelmä havaitsemaan testikemikaalin. Jos järjestelmä ei havaitse testikemikaalia, kalvoesteeseen perustuva testimenetelmä ei sovellu kyseisen testikemikaalin mahdollisen syövyttävyyden arvioimiseen, ja sen testaamisessa on käytettävä jotakin toista testimenetelmää. Yhteensopivuustestissä käytettävän kemikaalien havaitsemisjärjestelmän ja altistusolosuhteiden on vastattava kalvoestetestissä käytettävää altistusta.

Testikemikaalin aikaskaalaluokitus -testi

14. Testikemikaalille, joka on todettu sopivaksi yhteensopivuustestissä, on tehtävä aikaskaalaluokitustesti eli seulontatesti, jonka avulla erotellaan heikot ja voimakkaat hapot tai emäkset, mikäli se on testimenetelmän kannalta tarkoituksenmukaista. Esimerkiksi validoidussa vertailutestimenetelmässä käytetään aikaskaalaluokitustestiä sen määrittämisessä, kumpaa aikaskaalaa on käytettävä sen perusteella, havaitaanko testissä huomattava happo- vai emäskapasiteetti. Syövyttävyyden ja YK:n GHS-järjestelmän ihosyövyttävyyden alaluokkien määrittämisessä on käytettävä kahta eri läpäisyaikaskaalaa testikemikaalin happo- tai emäskapasiteetin mukaan.

KALVOESTEESEEN PERUSTUVAN TESTIMENETELMÄN OSAT

Kalvoeste

15. Kalvoesteessä on kaksi osaa: proteiinipitoinen makromolekulaarinen vesipohjainen geeli ja läpäisevä tukikalvo. Proteiinigeelin pitäisi olla nesteitä ja kiinteitä aineita läpäisemätön, mutta se voi syöpyä ja tulla läpäiseväksi. Valmiiksi rakennettua kalvoestettä on säilytettävä määrätyissä olosuhteissa, joiden on osoitettu estävän geelin vaurioitumisen eli kuivumisen, mikrobikasvun, liikkumisen ja halkeilun, jotka heikentäisivät sen toimintakykyä. Hyväksyttävä säilytysaika on määritettävä, eikä kalvoestevalmisteita tule käyttää tämän ajan umpeuduttua.

16. Läpäisevä tukikalvo antaa proteiinigeelille mekaanista tukea geeliytymisprosessin ja testikemikaalille altistuksen aikana. Tukikalvon pitäisi estää geelin taipuminen tai liikkuminen, ja sen tulisi olla kaikki testikemikaalit läpäisevä.

17. Testikemikaalin kohde on proteiinigeeli, joka koostuu proteiinista eli keratiinista, kollageenista tai proteiinien sekoituksesta ja muodostaa geelimatriisin. Proteiinipitoinen materiaali asetetaan tukikalvon pinnalle ja sen annetaan geeliytyä ennen kuin kalvoeste asetetaan indikaattoriliuoksen päälle. Proteiinigeelin on oltava kauttaaltaan yhtä paksu ja tiheä, eikä siinä saa olla ilmakuplia tai muita vaurioita, jotka voivat vaikuttaa sen toiminnalliseen eheyteen.

Kemikaalien havaitsemisjärjestelmä

18. Indikaattoriliuoksen, joka on sama kuin yhteensopivuustestissä käytetty liuos, on reagoitava testikemikaalin olemassaoloon. Testissä on käytettävä pH-indikaattoriväriä tai niiden yhdistelmää, *esim.* kresolipunaista ja metyylioranssia, jotka osoittavat värin muuttumisen reaktiona testikemikaaliin. Mittausjärjestelmä voi olla visuaalinen tai elektroninen.

19. Havaitsemisjärjestelmien, jotka on kehitetty havaitsemaan testikemikaalin kulkeutuminen kalvoesteen läpi, merkitykselliyys ja luotettavuus on arvioitava, jotta voidaan määrittää ne kemikaalit, jotka järjestelmällä voidaan havaita, ja määrälliset havaintorajat.

TESTIN TEKEMINEN

Testimenetelmän osien kokoaminen

20. Kalvoeste asetetaan indikaattoriliuosta sisältävään lasipulloon (tai putkeen) siten, että tukikalvo on kauttaaltaan kosketuksissa indikaattoriliuokseen, eikä ilmakuplia saa olla. Kalvoestettä on käsiteltävä varovasti, jotta se pysyy ehjänä.

Testikemikaalin annostelu

21. Sopiva määrä testikemikaalia, esimerkiksi 500 µl nestettä tai 500 mg hienoksi jauhettua kiinteää ainetta (7), levitetään kalvoesteen yläpinnalle varovasti ja tasaisesti. Jokaiselle testikemikaalille ja sitä vastaavalle kontrollille valmistetaan tarvittava määrä rinnakkaisnäytteitä, esimerkiksi neljä (7) (ks. 23–25 kohta). Aika, jona testikemikaali levitetään kalvoesteelle, merkitään muistiin. Sen varmistamiseksi, että lyhyet syöpymisajat kirjataan tarkasti muistiin, testikemikaali levitetään rinnakkaisnäytteisiin porrastetusti.

Kalvoesteen läpäisyn mittaus

22. Jokaista pulloa seurataan asianmukaisesti. Indikaattoriliuoksen ensimmäisen värimuutoksen ajankohta (ts. esteen läpäisy) kirjataan muistiin, ja kemikaalin levittämisen ja kalvoesteen läpäisyn välillä kulunut aika määritetään.

Kontrollit

23. Testeissä, joissa käytetään kantaja-aine- tai liuotinkontrollia testikemikaalin kanssa, kantaja-aineen tai liuottimen on oltava yhteensopivia kalvoestekokonaisuuden kanssa: ne eivät saa vaikuttaa kalvoestekokonaisuuden eheyteen eivätkä muuttaa testikemikaalin syövyttävyyttä. Tarvittaessa liuotin- (tai kantaja-aine)kontrolli on testattava yhtä aikaa testikemikaalin kanssa liuottimen ja kalvoestekokonaisuuden yhteensopivuuden osoittamiseksi.

24. Positiivinen (syövyttävä) kontrolli, joka on kohtalaisen syövyttävä, esimerkiksi 110 ± 15 mg natriumhydroksidia (YK:n GHS-järjestelmän syövyttävien aineiden alaluokka 1B) (7), on testattava yhtä aikaa testikemikaalin kanssa, jotta voidaan arvioida, toimiiko testijärjestelmä hyväksyttävästi. Toinen positiivinen kontrolli, joka kuuluu samaan kemikaaliluokkaan kuin testikemikaali, voi olla hyödyllinen syövyttävän testikemikaalin suhteellisen syövyttävyyspotentiaalin arvioinnissa. Positiiviseksi kontrolliksi (positiivisiksi kontrolleiksi) on valittava kohtalaisen syövyttäviä aineita (esimerkiksi YK:n GHS-järjestelmän alaluokka 1B), jotta havaitaan vahvistettua vertailuarvoa niin paljon pidempien tai lyhyempien läpäisyaikojen muutokset, joita ei voida hyväksyä, sillä ne osoittavat, ettei testijärjestelmä toimi asianmukaisesti. Tähän tarkoitukseen erittäin syövyttävien (YK:n GHS-järjestelmän alaluokka 1A) tai syövyttämättömien kemikaalien käyttökelpoisuus on rajallinen. YK:n GHS-järjestelmän alaluokan 1B mukaisen syövyttävän kemikaalin avulla voidaan havaita liian nopea tai liian hidas läpäisyaika. Lievästi syövyttävää kemikaalia (YK:n GHS-järjestelmän alaluokka 1C) voidaan käyttää positiivisena kontrollina mittaamaan, pystyykö testimenetelmä erottelemaan lievästi syövyttävät ja syövyttämättömät kemikaalit toisistaan johdonmukaisesti. Käytetystä lähestymistavasta riippumatta positiivisen kontrollin hyväksyttävä vastealue on määritettävä positiivis(t)en kontrolli(e)n aikaisempien läpäisyaikatietojen mukaisesti (esimerkiksi keskiarvo ± 2–3 keskihajontaa). Jokaisessa tutkimuksessa on määritettävä positiivisen kontrollin tarkka läpäisyaika, jotta voidaan havaita hyväksyttävän alueen ulkopuolella olevat poikkeamat.

25. Negatiivinen (syövyttämätön) kontrolli, esimerkiksi 10-prosenttinen sitruunahappo tai 6-prosenttinen propionihappo (7), on myös testattava yhtä aikaa testikemikaalin kanssa toisena laadunvalvontatoimena kalvoesteen toiminnallisen eheyden osoittamiseksi.

Testin hyväksyttävyysperusteet

26. Kullekin YK:n GHS-järjestelmän mukaiselle syövyttävyyden alaluokalle vahvistettujen aikaparametrien mukaisesti testikemikaalin syövyttävyyden ennustamisessa käytetään aikaa (minuutteina), joka kuluu testikemikaalin kalvoesteen päälle levittämisestä siihen, kun kemikaali läpäisee esteen. Jotta tutkimus katsottaisiin hyväksyttäväksi, samanaikaisesta positiivisesta kontrollista pitäisi saada odotuksenmukainen läpäisyn vasteaika (ts. 8–16 minuutin läpäisyaika natriumhydroksidille, jos positiivisena kontrollina käytetään sitä) ja samanaikaisen negatiivisen kontrollin tulisi olla syövyttämätön, ja jos tutkimukseen sisältyy samanaikainen liuotinkontrolli, sen tulisi olla syövyttämätön eikä se saa muuttaa testikemikaalin syövyttävyyspotentiaalia. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tämän testimenetelmän mukaista menetelmää rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä taulukossa 2 suositeltujen 12 aineen avulla. Sellaisten tämän testimenetelmän mukaisesti kehitettyjen uusien (me-too) testimenetelmien, jotka vastaavat rakenteellisesti ja toiminnallisesti validoitua vertailumenetelmää (14), luotettavuus ja tarkkuus on osoitettava määrättyjen suorituskykyvaatimusten mukaisesti ennen kuin niitä käytetään säännösten nojalla tehtäviin testeihin (10).

Tulosten tulkinta ja testikemikaalien syövyttävyysluokitus

27. Testikemikaalin luokittelemisessa YK:n GHS-järjestelmän syövyttävyyden alaluokkiin (1) ja tarvittaessa YK:n pakkausryhmään (16) käytetään aikaa (minuutteina), joka kuluu testikemikaalin levittämisestä kalvoesteen pinnalle siihen, kun kemikaali läpäisee esteen. Jokaiselle kolmelle syövyttävyyden alaluokalle ja kullekin ehdotetulle testimenetelmälle määritetään aikaraja-arvot. Lopullisissa aikaraja-arvoja koskevissa päätöksissä on otettava huomioon tarve pitää syöpymisvaaran aliluokitus mahdollisimman vähäisenä (ts. väärät negatiiviset tulokset). Tässä testiohjeessa on käytettävä taulukossa 3 kuvattuja Corrositexin® aikaraja-arvoja, sillä se on ainoa testimenetelmä, joka on tällä hetkellä testiohjeen mukainen (7).

Taulukko 3

Corrositex®-ennustemalli

Keskimääräinen läpäisyaika (min)		YK:n GHS-järjestelmän mukainen ennuste (3)
Luokan 1 testikemikaalit (1) (määritettyinä menetelmän luokitustestin mukaan)	Luokan 2 testikemikaalit (2) (määritettyinä menetelmän luokitustestin mukaan)	
0–3 min	0–3 min	Syövyttävä Valinnainen alaluokka 1A
> 3–60 min	> 3–30 min	Syövyttävä Valinnainen alaluokka 1B
> 60–240 min	> 30–60 min	Syövyttävä Valinnainen alaluokka 1C
> 240 min	> 60 min	Syövyttämätön

(1) Testikemikaalit, joiden happo-emäskapasiteetti on suuri (6).
(2) Testikemikaalit, joiden happo-emäskapasiteetti on pieni (6).
(3) YK:n GHS-järjestelmän alaluokat 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmiä I, II ja III.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

28. Testikemikaalin sekä positiivis(t)en kontrolli(e)n levittämisen ja esteen läpäisemisen välinen aika (minuutteina) on ilmoitettava taulukossa. Myös tiedot jokaisesta rinnakkaisnäytteestä sekä keskiarvot ± keskihajonta on ilmoitettava jokaisesta kokeesta.

Testiraportti

29. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrolliaineet:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aine sekä seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, pitoisuus (tarvittaessa), käytetty tilavuus

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

In vitro -kalvoestemalli ja käytetty protokolla sekä tiedot osoitetusta tarkkuudesta ja luotettavuudesta

Testiolosuhteet:

— kuvaus käytetyistä laitteista ja valmistelumenettelyistä

— käytetyn *in vitro* -kalvoesteen alkuperä ja koostumus

— indikaattoriliuoksen koostumus ja ominaisuudet

— havaitsemismenetelmä

— testikemikaalin ja kontrolliaineen määrät

— rinnakkaisnäytteiden lukumäärä

— aikaskaalaluokitustestin kuvaus ja perustelut

— levitysmenetelmä

— havainnointiajat

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja luokitteluperusteista

— pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla kemikaaleilla tehtyyn testaukseen perustuva osoitus pätevyydestä tämän testimenetelmän osalta ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Tulokset:

— taulukko jokaisen testin yksittäisistä raakatiedoista ja jokaisen rinnakkaisnäytteen kontrolliotoksesta

— kuvaukset muista havaituista vaikutuksista

— tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(3) Tämän liitteen luku B.40a *In vitro* -ihosyövyttävyys: Rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(4) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* -ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (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 Saatavana osoitteessa 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, s. 96–97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Tämän liitteen luku B.46, *In vitro* -ihoärsyttävyys: rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Saatavana osoitteessa http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Saatavana osoitteessa http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (9).

Kemikaali: Aine tai seos.

Kemikaalien havaitsemisjärjestelmä: Visuaalinen tai elektroninen mittausjärjestelmä, jossa on testikemikaaliin reagoiva indikaattoriliuos, *esim.* pH-indikaattorin väri tai väriyhdistelmä, joka reagoi testikemikaaliin väriä muuttamalla tai muuntyyppisillä kemiallisilla tai sähkökemiallisilla reaktioilla.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten tulosten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niihin liittyvät vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu vähintään kahdesta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

ES: Ei syövyttävä.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Siihen sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat luotettavuuden ja tarkkuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (9).

Merkityksellisyys: Kuvaus testimenetelmän ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testimenetelmä tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testimenetelmällä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (9).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (9).

Herkkyys: Niiden negatiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmässä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Ihosyövyttävyys *in vivo*: Korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmässä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantoprosessein tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

B.66 *IN VITRO* -TRANSAKTIVAATIOTESTIT, JOISSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA JA JOILLA VOIDAAN TUNNISTAA ESTROGEENIRESEPTORIN AGONISTEJA JA ANTAGONISTEJA

YLEISJOHDANTO

OECD:n tulosperusteinen testiohje

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 455 (2016). Testiohje 455 on tulosperusteinen testiohje, jossa kuvataan *in vitro* -transaktivaatiotestien menetelmä, jossa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja ja joilla voidaan tunnistaa estrogeenireseptorin agonisteja ja antagonisteja (ER TA -testit). Se koostuu useista mekanistisesti ja toiminnallisesti samanlaisista testimenetelmistä, jotka on tarkoitettu estrogeenireseptorin (ts. ERα ja/tai ERβ) agonistien ja antagonistien tunnistamiseen, ja sen tavoitteena on osaltaan edistää uusien samanlaisten tai muunneltujen testimenetelmien kehittämistä OECD:n vaaran arvioinnissa käytettävien uusien tai päivitettyjen testimenetelmien validointia ja kansainvälistä hyväksyntää koskevassa ohjeasiakirjassa esitettyjen validointiperiaatteiden mukaisesti (1). Kokonaisuudessaan validoidut vertailutestimenetelmät (lisäys 2 ja lisäys 3), joihin tämä tulosperusteinen testiohje pohjautuu, ovat seuraavat:

   — pysyvästi transfektoituja soluja hyödyntävä transaktivaatiotesti (STTA) (2), jossa käytetään (h) ERα-HeLa-9903 -solulinjaa ja

   — VM7Luc ER TA -testi (3), jossa käytetään VM7Luc4E2-solulinjaa ([1]), joka ilmentää pääasiassa hERα:aa ja jossain määrin hERβ:aa (4) (5).

   Samaa vaaran vaikutuskohdetta koskevien samanlaisten testien kehittämistä ja validointia varten (6) (7) on laadittu suoritusvaatimukset, ja niitä tulee noudattaa. Niiden avulla tulosperusteista testiohjetta 455 voidaan muuttaa ajoissa, jotta päivitettyyn tulosperusteiseen testiohjeeseen voidaan lisätä uusia samanlaisia testejä. Samanlaisia testejä lisätään ohjeeseen kuitenkin vasta sitten, kun OECD on tarkistanut ne ja vahvistanut, että suoritusvaatimukset täyttyvät. Testiohjeeseen 455 sisältyviä testejä voidaan käyttää OECD:n jäsenvaltioiden estrogeenireseptorin transaktivaatiota koskeviin testituloksiin liittyvien vaatimusten yhteydessä samalla OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää hyödyntäen.

Taustaa ja tähän testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

2. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten. Mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli tarkistettiin vuonna 2012. Alkuperäinen ja tarkistettu toimintamalli sisältyvät liitteinä OECD:n ohjeasiakirjaan Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (8). Toimintamallissa on viisi tasoa, joista kukin vastaa biologisen monimutkaisuuden eri tasoa. Tässä testimenetelmässä kuvatut estrogeenireseptorin transaktivaatio -testit kuuluvat tasolle 2, joka sisältää "*in vitro -testit, jotka tuottavat tietoa tietyistä endokriinisistä mekanismeista/reiteistä*". Tässä testimenetelmässä on *in vitro* -transaktivaatiotestejä, jotka on kehitetty tunnistamaan estrogeenireseptorin agonisteja ja antagonisteja.

3. Estrogeenien ja estrogeenireseptoreiden yhteisvaikutus voi vaikuttaa estrogeenin säätelemien geenien transkriptioon, mikä voi käynnistää tai estää solujen prosesseja, myös niitä, joita tarvitaan solujen proliferaatiossa, sikiön normaalissa kehityksessä ja lisääntymistoiminnoissa (9) (10) (11). Normaalien estrogeenin säätelemien järjestelmien häiritseminen saattaa aiheuttaa haittavaikutuksia, jotka kohdistuvat normaaliin kehitykseen (ontogeneesiin), lisääntymisterveyteen ja lisääntymisjärjestelmän eheyteen.

4. *In vitro* TA -testit perustuvat aineiden ja tietyn reportterigeenituotteen transkriptiota säätelevän reseptorin suoraan tai epäsuoraan yhteisvaikutukseen. Näitä testejä on käytetty laajalti tiettyjen tumareseptoreiden, kuten estrogeenireseptoreiden, säätelemän geenien ilmentymisen arvioimisessa (12) (13) (14) (15) (16). Niitä on ehdotettu käytettäväksi myös estrogeenireseptorin säätelemän estrogeenisen transaktivaation havaitsemisessa (17) (18) (19). Nukleaarisista estrogeenireseptoreista on ainakin kaksi pääasiallista alatyyppiä, α ja β, jotka ovat eri geenien koodaamia. Kyseisillä proteiineilla on erilaiset biologiset tehtävät, ja ne eroavat toisistaan myös kudoksiin jakautumisen ja ligandin sitoutumisaffiniteetin osalta (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleaarinen ERα välittää klassista estrogeenivaikutusta (27) (28) (29) (30), ja sen vuoksi useimmat tällä hetkellä kehitteillä olevat mallit, joilla mitataan estrogeenireseptorin aktivaatiota tai inhibitiota, ovat spesifejä ERα:lle. Testejä käytetään sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka aktivoivat (tai inhiboivat) estrogeenireseptorin ligandin sitoutumisen jälkeen, minkä jälkeen reseptori-ligandikompleksi sitoutuu tiettyihin DNA:ssa oleviin vaste-elementteihin ja transaktivoi reportterigeenin. Tämä johtaa siihen,että

merkkiaineproteiinin ilmentyminen solussa lisääntyy. Näissä testeissä voidaan käyttää erilaisia reportterivasteita. Lusiferaasiin perustuvissa järjestelmissä lusiferaasientsyymi muuttaa lusiferiinisubstraatin bioluminesenssituotteeksi, joka voidaan mitata kvantitatiivisesti luminometrillä. Muita esimerkkejä yleisistä reporttereista ovat fluoresoiva proteiini ja *LacZ*−geeni, joka koodaa β-galaktosidaasia, entsyymiä, joka voi muuttaa värittömän X-gal-substraatin (5- bromi-4-kloori-indolyyli-galaktopyranosidi) siniseksi tuotteeksi, joka voidaan kvantifioida spektrofotometrillä. Nämä reportterit voidaan analysoida nopeasti ja edullisesti kaupallisesti saatavilla testipaketeilla.

5. STTA- ja VM7Luc TA -testien merkityksellisyys ja luotettavuus niiden suunnitellussa käyttötarkoituksessa on osoitettu validointitutkimuksissa (3) (4) (5) (30). Luminesenssipohjaisten, rintasyövän solulinjoja käyttävien ER TA -testien suoritusvaatimukset sisältyvät ICCVAMin LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmää koskevaan arviointiraporttiin: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Näitä suoritusvaatimuksia on muokattu sekä STTA-testiin että VM7Luc TA -testiin sopiviksi (2).

6. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TA-testien soveltamisala ja rajoitukset

7. Näitä testejä suositellaan käytettäväksi seulonnassa ja priorisoinnissa, mutta niistä voidaan saada myös mekanistista tietoa, jota voidaan hyödyntää näyttöön perustuvassa toimintatavassa. Niissä on kyse transaktivaatiosta, jonka aiheuttaa kemikaalin sitoutuminen estrogeenireseptoreihin *in vitro* -järjestelmässä. Tuloksia ei siis ole syytä ekstrapoloida suoraan intaktin endokriinisen *in vivo* -järjestelmän monimutkaiseen viestinvälitykseen ja säätelyyn.

8. Estrogeenireseptoreiden välittämää transaktivaatiota pidetään yhtenä keskeisistä hormonitoiminnan häiriöitä aiheuttavista mekanismeista, vaikka niitä voivat aiheuttaa myös muut mekanismit, esimerkiksi i) yhteisvaikutukset endokriinisen järjestelmän muiden reseptorien ja entsymaattisten järjestelmien kanssa, ii) hormonien synteesi, iii) hormonien metabolinen aktivaatio ja/tai inaktivaatio, iv) hormonien jakautuminen kohdekudoksiin ja v) hormonien poistuminen kehosta. Missään tähän testimenetelmään kuuluvista testeistä ei käsitellä näitä vaikutustapoja.

9. Tässä testimenetelmässä käsitellään kemikaalien kykyä aktivoida (ts. toimia agonisteina) ja myös estää (ts. toimia antagonisteina) estrogeenireseptorivälitteinen transkriptio. Jotkin kemikaalit voivat, solutyypin mukaan, toimia sekä agonistina että antagonistina. Näitä kemikaaleja kutsutaan selektiivisiksi estrogeenireseptorin modulaattoreiksi (SERM). Kemikaaleja, jotka todetaan negatiivisiksi näissä testeissä, voidaan arvioida estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevalla testillä, ennen kuin tehdään päätelmä, ettei kemikaali sitoudu reseptoriin. Lisäksi testeistä saataneen tietoa vain alkuperäismolekyylin aktiivisuudesta, kun muistetaan, että *in vitro* -solujärjestelmien metabolointikyky on rajallinen. Koska validoinnissa käytettiin vain yksittäisiä aineita, menetelmän soveltuvuutta seosten testaamiseen ei ole vahvistettu. Teoriassa testimenetelmää voidaan kuitenkin soveltaa useasta ainesosasta muodostuvien aineiden, UVCB-aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin testimenetelmää käytetään useasta ainesosasta koostuvan aineen, UVCB-aineen tai seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

10. Taulukossa I esitetään tiedoksi agonistitestin tulokset 34 aineesta, jotka testattiin kummallakin tässä testimenetelmässä kuvatulla kokonaisuudessaan validoidulla testimenetelmällä. Julkaistujen raporttien perusteella näistä aineista 26 on luokiteltu varmoiksi estrogeenireseptorin agonisteiksi ja 8 negatiivisiksi. Tutkimuksissa on käytetty estrogeenireseptoriin sitoutumista ja transaktivaatiota koskevia in vitro -testejä ja/tai kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaa testiä (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Taulukossa 2 esitetään antagonistitestin tulokset 15 aineesta, jotka testattiin kummallakin tässä testimenetelmässä kuvatulla kokonaisuudessaan validoidulla testimenetelmällä. Julkaistujen raporttien perusteella näistä aineista 4 on luokiteltu varmoiksi/oletetuiksi estrogeenireseptorin antagonisteiksi ja 10 negatiivisiksi. Tutkimuksissa on käytetty estrogeenireseptoriin sitoutumiseen ja transaktivaatioon perustuvia in vitro- testejä (2) (3) (18) (31). Taulukossa 1 ja taulukossa 2 esitettyjen tietojen osalta kaikkien aineiden luokituksessa käytetyillä kahdella vertailutestimenetelmällä saatiin täysin yhtenevät tulokset lukuun ottamatta yhtä ainetta (mifepristonia) antagonistitestissä, ja jokainen aine luokiteltiin oikein estrogeenireseptorin agonistiksi/antagonistiksi tai negatiiviseksi. Täydentäviä tietoja tästä kemikaaliryhmästä ja muista kemikaaleista, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeillä validointitutkimuksissa, on ER TA -testiä koskevissa suoritusvaatimuksissa (6) (7) (lisäys 2, taulukot 1, 2 ja 3).

Taulukko 1

Yhteenveto STTA- ja VM7Luc ER TA -testien tuloksista: aineet, jotka testattiin kummallakin agonistitestillä ja luokiteltiin estrogeenireseptorin agonisteiksi (POS) tai negatiivisiksi (NEG)

	Aine	CAS-nro	STTA-testi (2)			VM7Luc ER TA -testi (3)		Tiedonlähde luokitusta varten (5)		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo (b) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo (b), (4) (M)	Muut ER TA -testit (1)	ERːään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
1	17ß-estradioli (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17ß-estradioli (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17ß-etinyyliestradioli (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-trenboloni	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	ET	ET
5	19-nortestosteroni (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-kumyylifenoli (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	ET
7	4-*tert*-oktyylifenoli (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigeniini (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	ET

	Aine	CAS-nro	STTA-testi (2)			VM7Luc ER TA -testi (3)		Tiedonlähde luokitusta varten (5)		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo (b) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo (b), (4) (M)	Muut ER TA -testit (1)	ER:ään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
9	Atratsiini (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	ET
10	Bisfenoli A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenoli B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Butyylibentsyyliftalaatti (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG
13	Kortikosteroni (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	ET
14	Kumestroli (a)	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	ET
15	Daidtseiini (a)	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietyylistilbestroli (a)	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	ET
17	Di-n-butyyliftalaatti	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etyyliparabeeni	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ei PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		ET
19	Estroni (a)	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genisteiini (a)	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS

	Aine	CAS-nro	STTA-testi ([2])			VM7Luc ER TA -testi ([3])		Tiedonlähde luokitusta varten ([5])		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo ([b]), ([4]) (M)	Muut ER TA -testit ([1])	ER:ään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
21	Haloperidoli	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	ET
22	Kempferoli ([a])	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	ET
23	Keponi ([a])	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	ET
24	Ketokonatsoli	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	ET
25	Linuroni ([a])	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	ET
26	*meso*-heksestroli ([a])	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	ET
27	Metyylitestosteroni ([a])	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	ET
28	Moriini	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	ET
29	Noretynodreeli ([a])	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	ET
30	*p,p'*-metoksikloori ([a])	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ei PC_{50}) ([b])	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbitaali ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	ET

	Aine	CAS-nro	STTA-testi ([2])			VM7Luc ER TA -testi ([3])		Tiedonlähde luokitusta varten ([5])		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo ([b]), ([4]) (M)	Muut ER TA -testit ([1])	ER:ään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
32	Reserpiini	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	ET
33	Spironolaktoni ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	ET
34	Testosteroni	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	ET

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; M = molaarinen; EC_{50} = puolet testiaineen suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta; NEG = negatiivinen; POS = positiivinen; ET = ei testattu; PC_{10} (ja PC_{50}) = testiaineen pitoisuus, jossa vaste on 10 prosenttia (tai 50 % PC_{50}-määrityksessä) positiivisen kontrollin aiheuttamasta vasteesta (E2, 1nM) kussakin maljassa.

([a]) Yleiset aineet, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä ja jotka määritettiin estrogeenireseptorin agonisteiksi tai negatiivisiksi ja joita käytettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimuksessa tarkkuuden arviointiin (ICCVAMin VM7Luc ER TA -arviointiraportti, taulukko 4-1(3)).

([b]) Testattu enimmäispitoisuus, kun sytotoksisuudesta tai liukenemattomuudesta johtuvia rajoituksia ei ollut, oli 1×10^{-5} M (STTA-testi) ja 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA -testi).

([1]) Suluissa olevat numerot tarkoittavat niitä testituloksia, jotka luokiteltiin positiivisiksi (POS) tai negatiivisiksi (NEG) kyseisten tutkimusten kokonaismäärästä.

([2]) Arvot, jotka on ilmoitettu estrogeenisen vaikutuksen havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin prevalidointia ja laboratorioiden välistä validointia koskevassa raporttiluonnoksessa (ihmisen estrogeenireseptorin alfavälitteinen reportterigeenitesti, jossa käytetään solulinjaa hER-HeLa-9903) (2)

([3]) ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportti: LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: estrogeenireseptorin agonistien ja antagonistien määrittämiseen tarkoitettu *in vitro* -menetelmä (3)

([4]) EC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([5]) Luokittelu estrogeenireseptorin agonistiksi tai antagonistiksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testimenetelmiä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista julkaisuista saatuihin tietoihin (2) (3) (18) (31) (33) (34).
Huom. Kaikissa tämän testimenetelmän mukaisissa testeissä ei tehty samoja mittauksia. Tietyissä tapauksissa EC_{50}-arvoa ei voida laskea, koska täydellistä annos-vastekäyrää ei ole laadittu. STTA-testissä PC_{10}-arvo on keskeinen mitattava arvo, joten voi olla myös muita esimerkkejä, joissa PCx-arvosta saa hyödyllistä tietoa.

Taulukko 2

Vertailu STTA- ja VM7Luc ER TA -testien tuloksista: aineet, jotka testattiin kummallakin antagonistitestillä ja luokiteltiin estrogeenireseptorin antagonisteiksi (POS) tai negatiivisiksi (NEG)

	Aine [a]	CAS-nro	ER STTA -testi [1]		VM7Luc ER TA -testi [2]		ER STTA -testin mahdolliset vaikutukset [4]	ICCVAMin [5] yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän [6] kemiallinen luokka	Tuoteluokka [7]
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo [b] (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo [b], [3] (M)				
1	4-hydroksitamoksifeeni	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
2	Dibentso[a.h]antraseeni	53-70-3	POS	Ei IC_{50}	POS	Ei IC_{50}	POS	OP	Polysyklinen yhdiste	Laboratoriokemikaali, luonnontuote
3	Mifepristoni	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	lievästi POS	NEG	Steroidi	Lääkkeet
4	Raloksifeeni HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
5	Tamoksifeeni	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
6	17ß-estradioli	50-28-2	NEG	—	NEG	—	ON	ON	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
7	Apigeniini	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterosyklinen yhdiste	Väriaine, luonnontuote, farmaseuttinen välituote

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])		VM7Luc ER TA -testi ([2])		ER STTA -testin mahdolliset vaikutukset ([4])	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]), ([3]) (M)				
8	Atratsiini	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	ON	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine
9	Di-n-butyyliftalaatti	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Esteri, ftaalihappo	Kosmetiikan ainesosa, teollisuuskemikaali, pehmennin
10	Fenarimoli	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ei testattu	ON	Heterosyklinen yhdiste, pyrimidiini	Sienitautien torjunta-aine
11	Flavoni	525-82-6	NEG	—	NEG	—	ON	ON	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
12	Flutamidi	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	ON	Amidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
13	Genisteiini	446-72-0	NEG	—	NEG	—	ON	NEG	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
14	p-n-nonyylifenoli	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ei testattu	NEG	Fenoli	Välituote

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])		VM7Luc ER TA -testi ([2])		ER STTA -testin mahdolliset vaikutukset ([4])	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratroli	501-36-0	NEG	—	NEG	—	ON	NEG	Hiilivety (syklinen)	Luonnontuote

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; M = molaarinen; IC_{50} = testiaineen enimmäispitoisuus, joka estää tietyn parametrin 50-prosenttisesti; NEG = negatiivinen; ON = oletettavasti negatiivinen; POS = positiivinen; OP = oletettavasti positiivinen.

([a]) Yleiset aineet, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä ja jotka määritettiin estrogeenireseptorin antagonisteiksi tai negatiivisiksi ja joita käytettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimuksessa tarkkuuden arviointiin (2) (3).

([b]) Testattu enimmäispitoisuus, kun sytotoksisuudesta tai liukenemattomuudesta johtuvia rajoituksia ei ollut, oli 1×10^{-3} M (STTA-testi) ja 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA -testi).

([1]) Estrogeenireseptorivälitteisten vaikutusten havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin validointiraportti, osa B (2)

([2]) ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportti: LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) IC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Estrogeenireseptorin STTA-vaikutus pääteltiin niiden ilmoitettujen vaikutusten perusteella, jotka tunnetaan estrogeenireseptorin sitoutumistestistä saatujen aikaisempien CERI-tietojen pohjalta sekä kohtuun kohdistuvien vaikutusten testin ja avoimesta kirjallisuudesta kerättyjen tietojen pohjalta (2).

([5]) Luokittelu estrogeenireseptorin antagonistiksi tai negatiiviseksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testejä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista julkaisuista saatuihin tietoihin (2) (3) (18) (31).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

ER TA -TESTIN OSAT

Testin oleelliset osat

11. Tätä testimenetelmää sovelletaan testeihin, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja sisältävää tai endogeenista ERα-reseptoria ja pysyvästi transfektoituja soluja sisältävää reportterigeenikonstruktiota yhden tai useamman estrogeenivaste-elementin säätelemänä; myös muita reseptoreita, kuten ERβ:aa, voidaan käyttää. Nämä ovat testin oleelliset osat.

Kontrollit

12. Ehdotukset kunkin agonisti- ja antagonistitestin samanaikaisista vertailustandardeista on perusteltava. Samanaikaiset kontrollit (negatiivinen, liuotin ja positiivinen), sen mukaan mikä on tarpeen, osoittavat, että testi toimii testiolosuhteissa. Lisäksi ne muodostavat perustan kokeiden välisille vertailuille; ne ovat yleensä osa tietyn kokeen hyväksymisperusteita (1).

Laadunvalvonnan vakiomenettelyt

13. Laatua on valvottava kuvattujen vakiomenettelyjen mukaisesti jokaisessa testissä, jotta varmistetaan, että solulinja pysyy vakaana useamman siirrostuksen yhteydessä ja mykoplasmattomana (ts. ettei siinä ole bakteerikontaminaatiota) ja että sen kyky tuottaa odotuksenmukaisia estrogeenireseptorivälitteisiä vasteita säilyy pidemmällä aikavälillä. Lisäksi solulinjoista on tarkistettava, että niiden identiteetti on oikea ja ettei niissä ole muita kontaminantteja (esimerkiksi sieniä, hiivoja ja viruksia).

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

14. Ennen tuntemattomien kemikaalien testaamista tällä testimenetelmällä jokaisen laboratorion on osoitettava pätevyytensä testin käyttämisessä. Osoittaakseen pätevyytensä jokaisen laboratorion on testattava taulukossa 3 luetellut 14 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta agonistitestissä ja taulukossa 4 luetellut 10 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta antagonistitestissä. Pätevyyden osoittamistestillä vahvistetaan myös testijärjestelmän reagointikyky. Luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista koostuu joukosta ER TA -testien suoritusvaatimuksissa esitettyjä vertailuaineita (6). Nämä aineet ovat kaupallisesti saatavilla, ja ne edustavat sellaisten kemikaalien luokkia, jotka yleensä liitetään estrogeenireseptorin agonisti- tai antagonistivaikutukseen. Lisäksi niiden vaikutuksen voimakkuuden vaihteluväli on estrogeenireseptorin agonistien/antagonistien kannalta sopiva (ts. voimakkaasta heikkoon), ja niiden joukossa on myös negatiivisia aineita. Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaus on toistettava vähintään kahdesti eri päivinä. Pätevyys osoitetaan luokittelemalla jokainen pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu aine oikein (positiivinen/negatiivinen). Jokaisen laboratorioteknikon on toistettava pätevyystesti testien tekemistä opetellessaan. Solutyypin mukaan jotkin näistä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista voivat toimia SERMeinä ja vaikuttaa sekä agonistin että antagonistin tavoin. Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on kuitenkin luokiteltu taulukossa 3 ja 4 niiden tunnetun pääasiallisen vaikutuksen mukaan, ja pätevyyden arvioinnissa tulisi käyttää sitä.

15. Pätevyyden osoittamiseksi ja laadunvalvontaa varten jokaisen laboratorion on kerättävä agonisteista ja antagonisteista aikaisempia tietoja sisältävät tietokannat, jotka perustuvat tietoihin vertailustandardeista (esimerkiksi 17β-estradioli ja tamoksifeeni), positiivisista ja negatiivisista kontrollikemikaaleista ja liuotinkontrollista (esimerkiksi DMSO). Aluksi tietokanta on luotava vähintään 10 riippumattomasta agonistitestiajosta (esimerkiksi 17β-estradioli) ja 10 riippumattomasta antagonistitestiajosta (esimerkiksi tamoksifeeni). Tietokantaa on laajennettava lisäämällä siihen tulokset näillä vertailustandardeilla ja liuotinkontrolleilla myöhemmin tehtävistä analyyseista. Näin varmistetaan laboratorion biotestien tasalaatuisuus ja suorituskyky pidemmällä aikavälillä.

Taulukko 3

Luettelo (14:stä) pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta (agonistitesti) [8]

Nro [7]	Aine	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste [1]	STTA-testi			VM7Luc ER TA -testi		MeSH-järjestelmän mukainen kemiallinen luokka [5]	Tuoteluokka [6]
				PC_{10}-arvo (M) [2]	PC_{50}-arvo (M) [2]	Testin pit.alue (M)	VM7Luc EC_{50}-arvo (M) [3]	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) [4]		
14	Dietyylistilbestroli	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	10^{-14}–10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet, eläinlääkkeet
12	17ß-estradioli	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
15	*meso*-heksestroli	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääkkeet
11	4-*tert*-oktyylifenoli	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenoli	Välituote
9	Genisteiini	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
6	Bisfenoli A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	10^{-11}–10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenoli	Välituote

Nro ([7])	Aine	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste ([1])	STTA-testi			VM7Luc ER TA -testi		MeSH-järjestelmän mukainen kemiallinen luokka ([5])	Tuoteluokka ([6])
				PC_{10}-arvo (M) ([2])	PC_{50}-arvo (M) ([2])	Testin pit.alue (M)	VM7Luc EC_{50}-arvo (M) ([3])	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) ([4])		
2	Kempferoli	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote
3	Butyylibentsyyliftalaatti	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboksyylihappo, esteri, ftaalihappo	Pehmennin, teollisuuskemikaali
4	*p,p'*-metoksikloori	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Hiilivety (halogenoitu)	Torjunta-aineet, eläinlääkkeet
1	Etyyliparabeeni	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboksyylihappo, fenoli	Lääkkeet, säilöntäaineet
17	Atratsiini	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10}–10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine
20	Spironolaktoni	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktoni, steroidi	Lääkkeet

Nro ([7])	Aine	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste ([1])	STTA-testi			VM7Luc ER TA -testi		MeSH-järjestelmän mukainen kemiallinen luokka ([5])	Tuoteluokka ([6])
				PC_{10}-arvo (M) ([2])	PC_{50}-arvo (M) ([2])	Testin pit.alue (M)	VM7Luc EC_{50}-arvo (M) ([3])	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) ([4])		
21	Ketokonatsoli	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterosyklinen yhdiste	Lääkkeet
22	Reserpiini	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterosyklinen yhdiste, indoli	Lääkkeet, eläinlääkkeet

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; EC_{50} = puolet testiaineen suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta; NEG = negatiivinen; POS = positiivinen; PC_{10} (ja PC_{50}) = testiaineen pitoisuus, jossa vaste on 10 prosenttia (tai 50 % PC_{50}-määrityksessä) positiivisen kontrollin aiheuttamasta vasteesta (E2, 1nM) kussakin maljassa.

([1]) Luokittelu estrogeenireseptorin agonistivaikutuksen kannalta positiiviseksi tai negatiiviseksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testejä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista vertailututkimuksista saatuihin empiirisiin ja muihin tietoihin (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Arvot, jotka on ilmoitettu estrogeenisen vaikutuksen havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin prevalidointia ja laboratorioiden välistä validointia koskevassa raporttiluonnoksessa (ihmisen estrogeenireseptorin alfavälitteinen reportterigeenitesti, jossa käytetään solulinjaa hER-HeLa-9903) (30).

([3]) EC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Tässä ilmoitetut pitoisuudet olivat suurimmat testatut pitoisuudet (annosalueen määritys) VM7Luc ER TA -testin validointitutkimuksessa. Jos pitoisuudet vaihtelivat laboratorioiden välillä, tässä on ilmoitettu suurin pitoisuus. Ks. ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportin taulukko 4-10; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Suoritusvaatimusten taulukosta 1 (luettelo vertailukemikaaleista (22) estrogeenireseptorin agonistin tarkkuuden arviointiin) (6)

([8]) Jos pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta ei ole enää kaupallisesti saatavilla, voidaan käyttää ainetta, jonka luokitus on sama ja voimakkuus, vaikutustapa ja kemiallinen luokka ovat vertailukelpoiset.

Taulukko 4

Luettelo (10:stä) pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta (antagonistitesti)

	Aine [a]	CAS-nro	ER STTA -testi [1]			VM7Luc ER TA -testi [2]			ER STTA [1] mahdolliset vaikutukset	ICCVAMin [5] yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän [6] Kemiallinen luokka	Tuoteluokka [7]
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50} (M)	Testin pit.alue (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50} [3] (M)	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) [4]				
1	4-hydroksitamoksifeeni	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
2	Raloksifeeni HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
3	Tamoksifeeni	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10}–10^{-5}	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
4	17ß-estradioli	50-28-2	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	oletettavasti negatiivinen (*)	ON	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
5	Apigeniini	520-36-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterosyklinen yhdiste	Väriaine, luonnontuote, farmaseuttinen välituote
6	Di-n-butyyliftalaatti	84-74-2	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Esteri, ftaalihappo	Kosmetiikan ainesosa, teollisuuskemikaali, pehmennin

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])			VM7Luc ER TA -testi ([2])			ER STTA ([1]) mahdolliset vaikutukset	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) Kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50} (M)	Testin pit.alue (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50} ([3]) (M)	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) ([4])				
7	Flavoni	525-82-6	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	oletettavasti negatiivinen (*)	ON	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
8	Genisteiini	446-72-0	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	oletettavasti negatiivinen (*)	NEG	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
9	p-n-nonyylifenoli	104-40-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	ei testattu	NEG	Fenoli	Välituote
10	Resveratroli	501-36-0	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	oletettavasti negatiivinen (*)	NEG	Hiilivety (syklinen)	Luonnontuote

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; M = molaarinen; IC_{50} = puolet testiaineen suurimmasta estävästä pitoisuudesta; NEG = negatiivinen; ON = oletettavasti negatiivinen; POS = positiivinen.

(*) Luokiteltu negatiiviseksi kirjallisuuskatsauksen perusteella (2).

([a]) Yleiset aineet, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä ja jotka määritettiin estrogeenireseptorin antagonisteiksi tai negatiivisiksi ja joita käytettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimuksessa tarkkuuden arviointiin (2) (3).

([1]) Estrogeenireseptorivälitteisten vaikutusten havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin validointiraportti, osa B (2)

([2]) ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportti: LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: estrogeenireseptorin agonistien ja antagonistien määrittämiseen tarkoitettu *in vitro* -menetelmä (3).

([3]) IC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Tässä ilmoitetut pitoisuudet olivat suurimmat testatut pitoisuudet (annosalueen määritys) VM7Luc ER TA -testin validointitutkimuksessa. Jos pitoisuudet vaihtelivat laboratorioiden välillä, tässä on ilmoitettu suurin pitoisuus. Ks. ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportin taulukko 4-11; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Luokittelu estrogeenireseptorin antagonistiksi tai negatiiviseksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testimenetelmiä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista julkaisuista saatuihin tietoihin (2) (3) (18) (31).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Testiajon hyväksymisperusteet

16. Testiajon hyväksyminen tai hylkääminen perustuu vertailustandardeista ja jokaisessa kokeessa käytetyistä kontrolleista saatujen tulosten arviointiin. Vertailustandardien PC_{50}-, (EC_{50}) tai IC_{50}-arvojen on täytettävä valitun testin hyväksymisperusteet (STTA: ks. lisäys 2, VM7Luc ER TA: ks. lisäys 3), ja kaikkien positiivisten/negatiivisten kontrollien on oltava oikein luokiteltu jokaisessa hyväksytyssä kokeessa. Kyky tehdä testi johdonmukaisesti on osoitettava perustamalla aikaisemmat tiedot vertailustandardeista ja kontrolleista sisältävä tietokanta ja ylläpitämällä sitä (ks. 15 kohta). Keskihajontalukuja tai variaatiokertoimia voidaan käyttää vertailustandardien käyrän sovitusparametrien keskiarvoina useista kokeista laboratorionsisäisen uusittavuuden mittarina. Lisäksi on noudatettava seuraavia hyväksymisperusteisiin liittyviä periaatteita:

— Tietojen on oltava riittävät, jotta estrogeenireseptorin aktivoituminen (agonistitesti) tai suppressoituminen (antagonistitesti) voidaan arvioida kvantitatiivisesti (ts. teho ja voimakkuus).

— Reportterigeenin keskimääräinen vaikutus vertailuestrogeenin vertailupitoisuuteen on määritettävä testeissä vähintään minimissään ainakin kantaja-aine- tai liuotinkontrollin pitoisuuteen nähden, jotta varmistetaan, että testin herkkyys on riittävä. STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä se on neljä kertaa kunkin maljan kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

— Testattujen pitoisuuksien on pysyttävä testikemikaalien liukoisuusalueen rajoissa, eivätkä ne saa osoittautua sytotoksisiksi.

Aineiston analysointi

17. Positiiviset ja negatiiviset vasteet on luokiteltava kullekin testille määritetyn aineistontulkintamenettelyn mukaisesti.

18. Hyväksymisperusteiden täyttyminen (16 kohta) osoittaa, että testi toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että mikä tahansa testiajo tuottaa tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testiajon tulosten toistuvuus on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa. Jos kahdesta testiajosta saadaan toistuvat tulokset (ts. kumpikin testiajo osoittaa, että testikemikaali on positiivinen), kolmatta testiajoa ei tarvitse tehdä.

19. Jos kahdesta testiajosta ei saada toistuvia tuloksia (ts. testikemikaali on yhdessä ajossa positiivinen ja toisessa negatiivinen) tai jos tämän testin tulos täytyy varmistaa, on tehtävä vähintään kolme itsenäistä ajoa. Tässä tapauksessa luokitus perustuu kahteen toistuvaan tulokseen kolmesta.

Yleiset aineiston tulkintaperusteet

20. Tällä hetkellä ER TA -aineiston tulkintaan ei ole yleisesti hyväksyttyä menetelmää. Estrogeenireseptorivälitteisen vaikutuksen laadullisten (ts. positiivinen/negatiivinen) ja/tai määrällisten (esimerkiksi EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) arviointien on perustuttava empiiriseen aineistoon ja vankkaan tieteelliseen näkemykseen. Mikäli mahdollista, positiivisia tuloksia on luonnehdittava sekä vaikutuksen suuruusluokalla kantaja-aine- tai liuotinkontrolliin tai vertailuestrogeeniin verrattuna että sillä pitoisuudella, jolla vaikutus ilmaantuu (esimerkiksi EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} jne.).

Testiraportti

21. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi:

— käytetty testi

— kontrolli/vertailustandardi/testikemikaali

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— pH-arvon mittaus, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus kasvatusaineessa, johon testikemikaalia lisättiin, kun tätä tarvitaan.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin/kantaja-aine:

— luonnehdinta (luonne, toimittaja ja erä)

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Solut:

— solujen tyyppi ja lähde:

  • Ilmentyykö estrogeenireseptori endogeenisesti? Jos ei, mikä reseptori (mitkä reseptorit) transfektoitiin?

  • Käytetty reportterikonstruktio (käytetyt konstruktiot) (myös lähdelajit)

  • Transfektiomenetelmä

  • Valintamenetelmä pysyvän transfektion ylläpitämiseksi (tarvittaessa)

  • Onko transfektiomenetelmä oleellinen linjojen stabiiliuden kannalta?

— siirrostusten lukumäärä (sulatuksesta)

— solujen siirrostusnumero sulatettaessa

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät.

Testiolosuhteet:

— liukoisuusrajoitukset

— kuvaus elinkykyisyyden arviointiin käytetyistä menetelmistä

— kasvatusliuosten koostumus, CO_2-pitoisuus

— testikemikaalin pitoisuudet

— kantaja-aineen ja lisätyn testikemikaalin määrä

— inkubaatiolämpötila ja kosteus

— altistuksen kesto

— solutiheys altistuksen alussa ja aikana

— positiiviset ja negatiiviset vertailustandardit

— reportterireagenssit (tuotenimi, toimittaja ja erä)

— kriteerit, joiden perusteella testiajot määritetään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Hyväksyttävyystarkastus:

— induktiokertoimet jokaiselle testilevylle ja tieto siitä, täyttävätkö ne testin edellyttämät, aikaisempiin kontrolleihin perustuvat vähimmäisvaatimukset

— hyväksymisperusteiden todelliset arvot, kuten $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ ja Hillslope-arvot samanaikaisille positiivisille kontrolleille/vertailustandardeille.

Tulokset:

— raakatiedot ja normalisoidut tiedot

— suurin induktiokerroin

— sytotoksisuustiedot

— pienin vaikuttava pitoisuus (LEC), jos saatavana

— RPC_{Max}-, PC_{Max}-, PC_{50}-, IC_{50}- ja/tai EC_{50}-arvot tarvittaessa

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— mahdolliset tilastoanalyysit sekä virhe- ja luottamusvälitiedot (esimerkiksi rakenneyhtälömalli, keskihajonta, variaatiokerroin tai 95 prosentin luottamusväli) ja kuvaus siitä, miten nämä arvot saatiin.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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): s. 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): s. 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: s. 20–26.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): s. 1073–89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 63–66.

(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): s. 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): s. 173–187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 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): s. 81–118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): s. 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): s. 379–383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122–126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): s. 4258–4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204–211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105–12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703–1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 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): s. 1460–1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515–522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 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): s. 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT JA LYHENTEET

Hyväksymisperusteet: Kontrollikokeiden suorittamista ja vertailustandardeja koskevat vähimmäisvaatimukset. Kaikkien hyväksymisperusteiden on täytyttävä, jotta koe olisi validi.

Tarkkuus (vastaavuus): Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testin suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testin oikeiden tulosten osuutta (1).

Agonisti: Aine, joka tuottaa vasteen, esimerkiksi transkription, kun se sitoutuu tiettyyn reseptoriin.

Antagonisti: Sellainen reseptorin ligandi tai kemikaali, joka ei aiheuta biologista vastetta sitoutuessaan reseptoriin vaan estää tai heikentää agonistivälitteisiä vasteita.

Antiestrogeeninen vaikutus: Kemikaalin kyky estää estrogeenireseptoreiden välittämä 17β-estradiolin vaikutus.

Solumorfologia: Kudosviljelylevyn yhdessä kuopassa yhdessä kerroksessa kasvatettavien solujen muoto ja ulkonäkö. Kuolemassa olevien solujen solumorfologia on usein poikkeava.

TM: Hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli.

Hiili-/dekstraanikäsittely: Soluviljelmässä käytettävän seerumin käsittely. Hiilellä/dekstraanilla käsittely (josta käytetään usein nimitystä ”strippaaminen”) poistaa endogeeniset hormonit ja hormoneja sitovat proteiinit.

Kemikaali: Aine tai seos.

Sytotoksisuus: Solun rakenteeseen tai toimintaan kohdistuvat haitalliset vaikutukset, jotka voivat aiheuttaa solukuoleman ja jotka havaitaan solujen määrän vähenemisenä kuopassa altistusjakson päättyessä tai solun toimintakyvyn vähenemisenä, kun sitä verrataan samanaikaiseen kantaja-ainekontrolliin.

CV: Variaatiokerroin

DCC-FBS: Dekstraanilla pinnoitetulla hiilellä käsitelty seerumi, joka on valmistettu naudan sikiön verestä.

DMEM: Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium

DMSO: Dimetyylisulfoksidi

E2: 17β-estradioli

EC50: Puolet testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta.

HH: Hormonitoiminnan häiriöt

hERα: ihmisen estrogeenireseptori alfa

hERß: ihmisen estrogeenireseptori beeta

EFM: Estrogeeniton kasvatusaine. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), johon lisätään 4,5-prosenttista hiili-/dekstraanikäsiteltyä FBS:ää, 1,9-prosenttista L-glutamiinia ja 0,9-prosenttista Pen-Strepiä.

ER: Estrogeenireseptori

ERE: Estrogeeniherkkä elementti

Estrogeeninen vaikutus: Kemikaalin kyky jäljitellä 17β-estradiolin kykyä sitoutua estrogeenireseptoreihin ja aktivoida niitä. Tällä testimenetelmällä voidaan havaita hERα-välitteinen estrogeeninen vaikutus.

ERTA: Estrogeenireseptorin transaktivaatio

FBS: Naudan sikiön verestä valmistettu seerumi

HeLa: Ihmisen kohdunkaulan syöpäsoluihin perustuva immortalisoitu solulinja

HeLa9903: HeLa-solun alakloni, johon hERαaja lusiferaasireportterigeeni on transfektoitu pysyvästi

IC_{50}: Puolet estävän testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea).

Laboratorioidenvälinen toistettavuus: Se, missä määrin eri pätevät laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja aineita. Laboratorioidenvälinen toistettavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (1).

Laboratorionsisäinen toistettavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina. (1).

LEC: Lowest effective concentration eli testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla saadaan vaste (ts. testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla induktiokerroin eroaa tilastollisesti samanaikaisesta kantaja-ainekontrollista).

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testille, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tarkoittaa samaa kuin samanlainen testimenetelmä.

MT: Metallotioneiini

MMTV: Hiiren rintasyöpävirus

OHT: 4-hydroksitamoksifeeni

TPTO: Tulosperusteinen testiohje

PK (positiivinen kontrolli): Voimakkaasti vaikuttava aine, mieluiten 17ß-estradioli, joka sisältyy kaikkiin testeihin, jotta varmistetaan, että testi toimii asianmukaisesti.

PC_{10}: Se testikemikaalin pitoisuus, jossa agonistitestissä mitattu vaikutus on 10 prosenttia positiivisen kontrollin (STTA-testi: E2, 1 nM) aiheuttamasta enimmäisvaikutuksesta jokaisessa maljassa.

PC_{50}: Se testikemikaalin pitoisuus, jossa agonistitestissä mitattu vaikutus on 50 prosenttia positiivisen kontrollin (E2 testimenetelmässä määritettynä vertailupitoisuutena) aiheuttamasta enimmäisvaikutuksesta jokaisessa maljassa.

PC_{Max}: Testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa RPCMaxin.

Suoritusvaatimukset: Validoituun testiin perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testin vertailtavuutta. Vaatimuksiin sisältyy 1) testin oleelliset osat; 2) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä ja 3) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetulla testillä on osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (1).

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet: Joukko suoritusvaatimuksiin sisältyviä vertailuaineita, joita laboratoriot voivat käyttää ovat vakiotestimenetelmään liittyvän teknisen osaamisensa osoittamisessa. Näiden aineiden valintaperusteisiin kuuluu yleensä se, että niiden on edustettava erilaisia vasteita ja oltava kaupallisesti saatavilla. Lisäksi niistä on oltava käytettävissä laadukkaita vertailutietoja.

Pätevyys: Osoitettu kyky tehdä testi asianmukaisesti ennen tuntemattomien aineiden testaamista.

Vertailuestrogeeni (positiivinen kontrolli, PK): 17β-estradioli (E2, CAS 50-28-2).

Vertailustandardi: Vertailuaine, jota käytetään osoittamaan testin asianmukaisuus. STTA- ja VM7Luc ER TA -testien vertailustandardi on 17β-estradioli.

Vertailutestimenetelmät: Testit, joihin tulosperusteinen testiohje 455 perustuu.

Merkityksellisyys: Kuvaus testimenetelmän ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testimenetelmä tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyys määritetään laskemalla testin tarkkuus (vastaavuus) (1).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa.

RLU: Suhteellinen valoyksikkö (relative light unit)

RNA: Ribonukleiinihappo

RPC_{Max}: Testikemikaalin aiheuttama suurin vaste, joka ilmaistaan prosenttiosuutena E2:n (1 nM) aiheuttamasta vasteesta samassa maljassa.

RPMI: RPMI 1640 -kasvatusliuos, jota on täydennetty 0,9-prosenttisella Pen-Strepillä ja 8,0-prosenttisella FBS-seerumilla

Testiajo: Yksittäinen koe, jossa arvioidaan kemiallisen vaikutusta testin biologiseen tulokseen. Jokainen testiajo on kattava koe, joka tehdään rinnakkaisilla kuopissa olevilla soluilla, jotka on maljattu yhteisestä soluvarannosta samaan aikaan.

Riippumaton testiajo: Erillinen, riippumaton koe, jossa arvioidaan kemiallista vaikutusta testin biologiseen tulokseen ja jossa käytetään eri varannosta peräisin olevia soluja, tuoreita laimennettuja kemikaaleja ja jotka eri työntekijät tekevät eri päivinä tai samana päivänä.

SD: Keskihajonta

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten aineiden osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (1).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten aineiden osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (1).

Pysyvä transfektio: DNA:n transfektoiminen viljeltyihin soluihin siten, että se integroituu solujen genomeihin pysyvästi, jolloin transfektoitujen geenien ilmeneminen on pysyvää. Pysyvästi transfektoitujen solujen klooneja valitaan stabiileilla merkkiaineilla (esimerkiksi resistenssi G418:lle).

STTA-testi: Stably Transfected Transactivation Assay (transaktivaatiotesti, jossa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja); ERα:n transkiptionaalinen aktivaatiotesti, jossa käytetään HeLa 9903 -solulinjaa.

Tutkimus: Kokonaisvaltainen kokeellinen työ, joka on tehty tietyn yksittäisen aineen arvioimiseksi tietyllä testillä. Tutkimus sisältää kaikki asianmukaiset vaiheet (testiaineen laimentaminen kasvatusaineessa, testiajot alustavaa annoksenmääritystä varten, kaikki tarvittavat laajat testiajot, aineiston analyysit, laadunvarmistus, sytotoksisuuden arvioinnit jne.). Tutkimuksen valmistuttua voidaan luokitella testikemikaalin vaikutus tutkittavana olevaan toksisuuteen nähden (ts. aktiivinen, inaktiivinen vai epäselvä), ja sitä arvioidaan käytetyllä testillä. Lisäksi laaditaan arvio voimakkuudesta positiiviseen vertailukemikaaliin nähden.

Aine: REACH-asetuksessa ([1]) aineella tarkoitetaan alkuainetta ja sen yhdisteitä sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai millä tahansa valmistusmenetelmällä tuotettuina, mukaan luettuna aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja valmistusprosessista johtuvat epäpuhtaudet, mutta lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta. YK:n GHS-järjestelmässä (1) käytetään hyvin samankaltaista menetelmää.

TA (transaktivaatio): Lähetti-RNA:n (mRNA:n) synteesin käynnistyminen reaktiona tiettyyn kemialliseen signaaliin, esimerkiksi estrogeenin sitoutuminen estrogeenireseptoriin

Testi: Tämän testimenetelmän yhteydessä testi on yksi validiksi hyväksytyistä menetelmistä, joka täyttää määrätyt suoritusvaatimukset. Testin osia ovat esimerkiksi tietty solulinja ja siihen liittyvät kasvuolosuhteet, tietty kasvatusaine, jossa testi tehdään, maljausolosuhteet, testikemikaalien järjestely ja laimennokset sekä muut vaaditut laadunvalvontatoimet ja asiaankuuluvat aineiston arviointivaiheet.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Transkriptio: Lähetti-RNA:n (mRNA) synteesi.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

Validoitu testimenetelmä: Testi, josta on tehty validointitutkimukset testin merkityksellisyyden (ja tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyyn tarkoitukseen. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (1).

Validointi: Prosessi, jossa tietyn lähestymistavan, menetelmän, testin, prosessin tai arvioinnin luotettavuus ja merkityksellisyys vahvistetaan määrättyyn tarkoitukseen (1).

KK (kantaja-ainekontrolli): Liuotin, jota käytetään testi- ja kontrollikemikaalien liuottamiseen, testataan pelkästään kantaja-aineena ilman liuotettua kemikaalia.

VM7: Immortalisoitu adenokarsinoomasolu, joka ilmentää estrogeenireseptoria endogeenisesti.

VM7Luc4E2: VM7Luc4E2-solulinja on peräisin ihmiseltä saaduista immortalisoiduista VM7-adenokarsinoomasoluista, jotka ilmentävät endogeenisesti estrogeenireseptorin kumpaakin muotoa (ERα ja ERβ) ja jotka on transfektoitu pysyvästi pGudLuc7.ERE-plasmidilla. Tämä plasmidi sisältää neljä kopiota synteettisestä oligonukleotidistä, joka sisältää estrogeeniherkän elementin hiiren rintasyöpäviruksen (MMTV:n) promoottoria ja tulikärpäsen lusiferaasigeeniä edeltävässä sekvenssikohdassa.

Heikko positiivinen kontrolli: Vertailukemikaalien luettelosta valittu heikosti vaikuttava aine, joka sisältyy kaikkiin testeihin, jotta varmistetaan, että testi toimii asianmukaisesti.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta (EUVL L 304, 22.11.2007, s. 1).

Lisäys 2

ESTROGEENI-A:N TRANSAKTIVAATIOTESTI, JOSSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA, KEMIKAALIEN ESTROGEENIRESEPTORIIN KOHDISTUVAN AGONISTISEN JA ANTAGONISTISEN VAIKUTUKSEN HAVAITSEMISEKSI HERA-HELA-9903-SOLULINJAA KÄYTTÄEN

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä transaktivaatiotestissä käytetään hERα-HeLa-9903-solulinjaa havaitsemaan ihmisen estrogeenireseptori alfan (hERα) välittämä estrogeenin kaltainen (agonistinen) vaikutus. Pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transaktivaatiotestin validointitutkimuksen teki japanilainen kemikaalien arviointi- ja tutkimuslaitos (CERI). Ihmisen estrogeenireseptori alfan (hERα) kautta välittyvän estrogeeni-agonistisen ja -antagonistisen vaikutuksen havaitsemiseksi tutkimuksessa käytettiin hERα-HeLa-9903-solulinjaa, ja validointitutkimuksessa osoitettiin, että testi on merkityksellinen ja luotettava aiotussa käyttötarkoituksessa (1).

2. Tämä testi on kehitetty nimenomaan hERα-välitteisen transaktivaation havaitsemiseen; päätetapahtumana mitataan kemiluminesenssia. Yli 1 µM:n suuruisista fytoestrogeenipitoisuuksista on kuitenkin ilmoitettu muun kuin reseptorin välittämiä luminesenssisignaaleja, jotka johtuvat lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta (2) (3). Vaikka annos-vastekäyrä osoittaa, että estrogeenireseptorijärjestelmän varsinainen aktivoituminen tapahtuu pienemmillä pitoisuuksilla, fytoestrogeenien tai samankaltaisten yhdisteiden, joiden epäillään tuottavan fytoestrogeenien kaltaista lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, aiheuttamaa lusiferaasin ilmentymistä on tutkittava huolellisesti ER TA -testijärjestelmissä, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja (lisäys 1).

3. Kohdat ”YLEISJOHDANTO” JA ”ER TA -TESTIN OSAT” on luettava, ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testiohjeessa käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 2.1.

TESTIN PERIAATE (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

4. Testiä käytetään signaloimaan ligandin sitoutumista estrogeenireseptoriin. Ligandin sitoutumisen jälkeen reseptori-ligandikompleksi kulkeutuu tumaan, jossa se sitoutuu tiettyihin DNA:n responssielementteihin ja transaktivoi tulikärpäsen lusiferaasigeenin, jolloin lusiferaasientsyymin solunsisäinen ilmentyminen lisääntyy. Lusiferiini on substraatti, jonka lusiferaasientsyymi muuttaa bioluminesenssituotteeksi, jota voidaan mitata kvantitatiivisesti luminometrillä. Lusiferaasin aktiviteettia voidaan arvioida nopeasti ja edullisesti monilla kaupallisesti saatavilla olevilla testisarjoilla.

5. Testijärjestelmässä käytetään ihmisen kohdunkaulakasvaimesta peräisin olevaa hERα-HeLa-9903-solulinjaa, jossa on kaksi pysyvästi insertoitua konstruktia: i) hERαα:aa ilmentävä konstrukti (joka koodaa täysipituista ihmisen reseptoria) ii) ja tulikärpäsen lusiferaasireportterikonstrukti, jossa on viisi peräkkäin toistuvaa vitellogeniinin estrogeeniherkkää elementtiä. Ne toimivat hiiren metallotioneiinipromoottorin TATA-sekvenssin avulla. Hiiren metallotioneiinin TATA-geenikonstruktin on osoitettu olevan suorituskyvyltään paras, ja siksi sitä käytetään yleisesti. Siksi tällä hERα-HeLa-9903-solulinjalla voidaan mitata testikemikaalin kykyä aiheuttaa hERα:n kautta välittyvää lusiferaasigeenin ilmentymisen transaktivaatiota.

6. Estrogeenireseptorin agonisti -testissä aineiston tulkinta perustuu siihen, onko testikemikaalin aiheuttama suurin vaste yhtä suuri vai suurempi kuin agonistivaste, joka vastaa 10:tä prosenttia positiivisen kontrollin (17β-estradioli (E2)) aiheuttamasta suurimmasta vasteesta (1 nM) (ts. PC10). Estrogeenireseptorin antagonisti -testissä aineiston tulkinta perustuu puolestaan siihen, onko vaste vähintään 30 prosenttia pienempi kuin lisäyskontrollinäytteen (25 pM E:2:ta) aiheuttama vaste ilman sytotoksisuutta. Aineiston analyysia ja tulkintaa käsitellään tarkemmin 34–48 kohdassa.

MENETTELY

Solulinjat

7. Testissä on käytettävä hERα-HeLa-9903-solulinjaa, jossa on pysyvästi transfektoituja soluja. Solulinjan voi hankkia japanilaisesta tutkimusbioresurssien kokoelman solupankista (Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1])), jolloin pitää tehdä materiaalinsiirtosopimus (material transfer agreement, MTA).

8. Testauksessa tulee käyttää vain mykoplasmattomiksi luonnehdittuja soluja. Suositeltava menetelmä on RT-PCR (reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio), koska sillä mykoplasmainfektio havaitaan herkästi (4) (5) (6).

Solulinjan stabiilisuus

9. Jotta voidaan seurata, että solulinja pysyy stabiilina, agonistitestissä on käytettävä vertailuaineina E2:ta, 17α-estradiolia, 17α-metyylitestosteronia ja kortikosteronia. Myös taulukossa 1 esitetyn testipitoisuuden vaihteluvälin koko pitoisuus-vastekäyrä on mitattava vähintään kerran jokaisen testin aikana, ja tulosten on oltava taulukossa 1 esitettyjen tulosten mukaisia.

10. Antagonistitestissä on mitattava kahden vertailuaineen, tamoksifeenin ja flutamidin, koko pitoisuuskäyrät samaan aikaan kunkin testiajon kanssa. On seurattava, että nämä kaksi kemikaalia luokitellaan laadullisesti oikein positiiviseksi tai negatiiviseksi.

Soluviljelmä ja maljausolot

11. Solut on pidettävä Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) -kasvatusliuoksessa (ilman fenolipunaista), jota on täydennettävä kanamysiiniantibiootilla (60 mg/l) ja 10-prosenttisella dekstraanilla pinnoitetulla hiilikäsitellyllä naudan sikiön verestä valmistetulla seerumilla, (DCC-FBS) hiilidioksidi-inkubaattorissa (hiilidioksidipitoisuus 5 %) 37±1 °C:n lämpötilassa. Kun konfluenssi on 75–90 prosenttia, soluista voidaan tehdä 10 ml:n jatkoviljelmä (0,4 x 105 – 1 x 105 solua/ml /100 mm:n soluviljelymalja). Solut on suspendoitava 10-prosenttisella FBS-EMEM-liuoksella (joka on sama kuin EMEM, johon on lisätty DCC-FBS:ää) ja laitettava sen jälkeen mikrolevyn kuoppiin tiheydellä 1 x 104 solua/(100 µl x kuoppa). Sen jälkeen solujen on annettava esi-inkuboitua 5 prosentin hiilidioksidi-inkubaattorissa 37±1 °C:n lämpötilassa kolmen tunnin ajan ennen kemikaalille altistamista. Muoviesineiden on oltava estrogeenittomia.

12. Jotta vasteen integriteetti säilyy, soluja on kasvatettava useampi kuin yksi siirrostus pakastetusta varastosta käsitellyssä kasvatusliuoksessa, mutta yli 40:ää siirrostusta ei tule kuitenkaan kasvattaa. Tämä kestää hERα-HeLa-9903-solulinjaa käytettäessä alle kolme kuukautta. Solujen toimintakyky voi kuitenkin heiketä, jos niitä kasvatetaan epäasianmukaisissa viljelyoloissa.

13. DCC-FBS-liuos voidaan valmistaa lisäyksessä 2.2 kuvatun mukaisesti tai hankkia kaupallisista lähteistä.

Hyväksymisperusteet

Estrogeenireseptorin agonistitestin positiiviset ja negatiiviset vertailustandardit

14. Ennen tutkimusta ja sen aikana testijärjestelmän responsiivisuus on todennettava käyttämällä asianmukaisia pitoisuuksia voimakasta estrogeenia: (E2), heikkoa estrogeenia (17α-estradioli), erittäin heikkoa agonistia (17α-metyylitestosteroni) ja negatiivista ainetta (kortikosteronia). Validointitutkimuksesta (1) johdetut hyväksyttävyysalueen arvot on esitetty taulukossa 1. Nämä neljä samanaikaista vertailustandardia on sisällytettävä jokaiseen kokeeseen, ja tulosten on oltava annettujen hyväksymisrajojen mukaiset. Jos näin ei ole, on selvitettävä, miksi hyväksymisperusteet eivät täyttyneet (esimerkiksi solujen käsittelyn tai seerumin ja antibiootin laadun ja pitoisuuden vuoksi), ja testion

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Faksi: +81 72 641 9812

toistettava. Kun kaikki hyväksymisperusteet ovat täyttyneet, on erittäin tärkeää, että materiaalien käyttö on soluviljelyssä johdonmukaista. Näin varmistetaan, että EC_{50}-, PC_{50}-ja PC_{10}-arvojen vaihtelu olisi mahdollisimman vähäistä. Testin herkkyys voidaan varmistaa neljällä samanaikaisella vertailustandardilla, jotka tulee sisällyttää jokaiseen kokeeseen (jotka tehdään samoissa oloissa, samoilla materiaaleilla, samoilla siirrostuksilla ja joiden tekijät ovat samat laboratorioteknikot), koska kolmen positiivisen vertailustandardin PC_{10}-arvojen on oltava hyväksyttävyysalueella, kuten myös PC_{50}-arvojen ja EC_{50}-arvojen, mikäli ne voidaan laskea (ks. taulukko 1).

Taulukko 1

Estrogeenireseptorin agonistitestin neljän vertailustandardin hyväksyttävyysalueen arvot

Nimi	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillslope	Testipitoisuus
17ß-estradioli CAS-numero: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradioli CAS-numero: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikosteroni CAS-numero: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metyylitestosteroni CAS-numero: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Estrogeenireseptorin antagonistitestin positiiviset ja negatiiviset vertailustandardit

15. Ennen tutkimusta ja sen aikana testijärjestelmän responsiivisuus on todennettava käyttämällä asianmukaisia pitoisuuksia positiivisesta aineesta (tamoksifeeni) ja negatiivisesta aineesta (flutamidi). Validointitutkimuksesta (1) johdetut hyväksyttävyysalueen arvot on esitetty taulukossa 2. Nämä kaksi samanaikaista vertailustandardia on sisällytettävä jokaiseen kokeeseen, ja tulosten on oltava perusteissa osoitetun mukaisia. Jos näin ei ole, on selvitettävä, miksi perusteet eivät täyttyneet (esimerkiksi solujen käsittelyn tai seerumin ja antibiootin laadun ja pitoisuuden vuoksi), ja testi on toistettava. Lisäksi on laskettava positiivisen aineen (tamoksifeenin) IC_{50} -arvot, ja tulosten on oltava määrättyjen hyväksymisrajojen mukaiset. Kun kaikki hyväksymisperusteet ovat täyttyneet, on erittäin tärkeää, että materiaalien käyttö on soluviljelyssä johdonmukaista. Näin varmistetaan, että IC50-arvojen vaihtelu olisi mahdollisimman vähäistä. Kahdella samanaikaisella vertailustandardilla, jotka on sisällytettävä jokaiseen kokeeseen (jotka tehdään samoissa oloissa, samoilla materiaaleilla, samoilla siirrostuksilla ja joiden tekijät ovat samat laboratorioteknikot), voidaan varmistaa testin herkkyys (ks. taulukko 2).

Taulukko 2

Estrogeenin antagonistitestin kahden vertailustandardin perusteet ja hyväksyttävyysalue

Nimi	Perusteet	$LogIC_{50}$	Testipitoisuus
Tamoksifeeni CAS-numero: 10540-29-1	Positiivinen: IC50 on laskettava	-5,942-7,596	10-1010-5M
Flutamidi CAS-numero: 13311-84-7	Negatiivinen: IC30-arvoa ei tarvitse laskea	—	10-10 10-5M

Positiiviset ja kantaja-ainekontrollit

16. Estrogeenireseptorin agonistitutkimuksessa (1 nM E2:ta) ja antagonistitutkimuksessa (10μM tamoksifeenia) positiivinen kontrolli on testattava vähintään kolmella näytteellä jokaisesta levystä. Kantaja-aine, jota on käytetty testikemikaalin liuottamiseen, on testattava kantaja-ainekontrollina vähintään kolmella näytteellä jokaisesta levystä. Jos positiivisessa kontrollissa käytetään toista kantaja-ainetta kuin testikemikaalia, tämän kantaja-ainekontrollin lisäksi on testattava toinen kantaja-ainekontrolli vähintään kolmella näytteellä samalta levyltä kuin positiivinen kontrolli.

Estrogeenireseptorin agonistitestin laatuvaatimukset

17. Positiivisen kontrollin (1 nM E2:ta) keskimääräisen lusiferaasiaktiivisuuden on oltava vähintään nelinkertainen kantaja-ainekontrolliin nähden jokaisella levyllä. Tämä vaatimus määritetään validointitutkimuksen päätetapahtuma-arvojen luotettavuuden perusteella (aiemmat arvot 4–30-kertaisia).

18. Testin laatukontrollin osalta samanaikaisen positiivisen kontrollin (1 nM E2:ta) PC10-arvoa vastaavan induktiokertoimen on oltava suurempi kuin 1+2 SD samanaikaisen kantaja-ainekontrollin induktiokertoimesta (= 1). Priorisointitarkoituksiin PC10-arvoa voidaan käyttää vaadittavan aineistoanalyysin yksinkertaistamiseksi tilastoanalyysiin verrattuna. Vaikka tilastoanalyysista saadaan tietoa merkityksellisyydestä, sellainen analyysi ei kuitenkaan ole kvantitatiivinen parametri pitoisuuteen perustuvan potentiaalin osalta, joten se ei ole kovin käyttökelpoinen priorisointitarkoitusten kannalta.

Estrogeenin antagonistitestin laatuvaatimukset

19. Lisäyskontrollin (25 pM E2:ta) keskimääräisen lusiferaasiaktiivisuuden on oltava vähintään nelinkertainen kantaja-ainekontrolliin nähden jokaisella levyllä. Tämä vaatimus määritetään validointitutkimuksen päätetapahtuma-arvojen luotettavuuden perusteella.

20. Testin laatukontrollin osalta suhteellinen transkriptionaalinen aktivaatio (RTA) 1 nM:n määrällä E2:ta on oltava suurempi kuin 100 prosenttia, 1 μM:llä 4-hydroksitamoksifeenia (OHT) sen tulee olla vähemmän kuin 40,6 prosenttia, ja 100 μM:llä digitoniinia (dig) sen on oltava vähemmän kuin 0 prosenttia.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen (ks. 14 kohta sekä taulukot 3 ja 4 tämän testimenetelmän kohdassa ER TA -testin osat).

Kantaja-aine

21. Samanaikaisena kantaja-ainekontrollina on käytettävä dimetyylisulfoksidia (DMSO:ta) tai asianmukaista liuotinta samana pitoisuutena kuin eri positiivisia ja negatiivisia kontrolleja ja testikemikaaleja. Testikemikaalit on liuotettava liuottimeen, joka liuottaa kyseisen kemikaalin ja jonka voi sekoittaa soluviljelyaineeseen. Sopivia kantaja-aineita ovat vesi, etanoli (puhtaus 95–100 prosenttia) ja DMSO. Jos käytetään DMSO:ta, sen pitoisuus saa olla enintään 0,1 tilavuusprosenttia (v/v). Kaikkien kantaja-aineiden osalta on osoitettava, ettei käytetty enimmäistilavuus ole sytotoksinen ja ettei se vaikuta testin suorittamiseen.

Testikemikaalien valmistelu

22. Testikemikaalit on yleensä liuotettava DMSO:hon tai muuhun sopivaan liuottimeen. Ne on sarjalaimennettava samalla liuottimella yleisessä suhteessa 1:10, jotta saadaan kasvatusliuoksella laimennettavia liuoksia.

Liukoisuus ja sytotoksisuus: annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

23. On tehtävä esitesti, jotta voidaan määrittää testattavan kemikaalin asianmukainen pitoisuusalue ja selvittää, liittyykö testikemikaaliin mahdollisesti liukoisuuteen ja sytotoksisuuteen liittyviä ongelmia. Aluksi kemikaalit testataan enimmäispitoisuudella 1 μl/ml, 1 mg/ml tai 1 mM sen mukaan, mikä niistä on pienin. Esitestissä havaitun sytotoksisuuden määrän tai liukoisuuden puutteen perusteella ensimmäisessä varsinaisessa testiajossa on testattava kemikaalia logaritmisina sarjalaimennoksina alkaen hyväksyttävästä enimmäispitoisuudesta (esimerkiksi 1 mM, 100μM, 10μM jne.), ja sameus tai saostuminen tai sytotoksisuus on merkittävä muistiin. Toisessa ja tarvittaessa kolmannessa ajossa pitoisuuksia on muutettava, mikäli tarpeen, jotta voidaan luonnehtia pitoisuus-vastekäyrää paremmin ja jotta vältetään sellaiset pitoisuudet, joiden todetaan olevan liukenemattomia tai aiheuttavan liiallista sytotoksisuutta.

24. Estrogeenireseptorin agonistien ja antagonistien yhteydessä kasvava sytotoksisuus voi muuttaa merkittävästi logistista vastetta tai eliminoida sen, mikä on otettava huomioon aineiston analysoinnissa. Sellaisia sytotoksisuuden testausmenetelmiä, joista voidaan saada tietoa solujen 80-prosenttisesta elinkyvystä, on käytettävä, ja niissä on hyödynnettävä asianmukaista laboratorion kokemukseen perustuvaa testiä.

25. Jos sytotoksisuustestin tulokset osoittavat, että testikemikaalin pitoisuus on vähentänyt solujen määrää 20 prosentilla tai enemmän, tämä pitoisuus on katsottava sytotoksiseksi, ja kaikki sytotoksisen pitoisuuden kanssa yhtä suuret tai suuremmat pitoisuudet on suljettava pois arvioinnista.

Kemiallinen altistus ja testilevyn järjestäminen

26. Kemikaalien laimennukset (vaiheet 1 ja 2) ja solujen altistaminen (vaihe 3) voidaan tehdä näin:

Vaihe 1: Jokainen kemikaali on laimennettava sarjassa DMSO:ssa tai asianmukaisessa liuottimessa. Sen jälkeen kemikaalit on laitettava mikrotiitterilevyille, jotta saadaan lopulliset sarjapitoisuudet alustavassa annoksenmääritystestissä määritetyn mukaisesti (sarjat ovat yleensä 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM ja 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) kolminkertaiseen testaukseen.

Vaihe 2: Kemikaalin laimennus: Laimenna ensin 1,5 µl testikemikaalia liuottimessa 500 µl:ksi kasvatusliuosta.

Vaihe 3: Solujen altistus kemikaalille: Lisää 50 µl nestelaimennosta (valmistettu vaiheessa 2) testilevyn kuoppaan, joka sisältää 10^4 solua / 100 µl / kuoppa

Nesteen suositeltava lopullinen määrä jokaisessa kuopassa on 150 µl. Testinäytteet ja vertailustandardit voidaan sijoittaa taulukossa 3 ja taulukossa 4 näytetyn mukaisesti.

Taulukko 3

Esimerkki levyllä olevan vertailustandardien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin agonistitestin testilevyllä

Rivi	17α-metyylitestosteroni			Kortikosteroni			17α-estradioli			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	pit. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	pit. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	pit. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	pit. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	pit. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	pit. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO); PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2).

27. Vertailustandardit (E2, 17α-estradioli, 17 α- metyylitestosteroni ja kortikosteroni on testattava jokaisessa kokeessa (taulukko 3). Jokaiseen testilevyyn on sisällytettävä positiivisen kontrollin kuopat, joissa on 1 nM E2:sta ja jotka voivat tuottaa E2- ja kantaja-ainekontrollin kuopista suurimman induktion vain DMSO:lla (tai asianmukaisella liuottimella) käsiteltynä (taulukko 4). Jos samassa kokeessa käytetään eri lähteistä peräisin olevia soluja (esimerkiksi eri siirrostusnumero, eri erä jne.), vertailustandardit on testattava jokaisen solulähteen osalta.

Taulukko 4

Esimerkki levyllä olevan testi- ja kontrollikemikaalien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin agonistitestin testilevyllä

Rivi	Testikemikaali 1			Testikemikaali 2			Testikemikaali 3			Testikemikaali 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	pit. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	pit. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	pit. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	pit. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	pit. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	pit. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO); PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2).

Taulukko 5

Esimerkki levyllä olevan vertailustandardien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin antagonistitestin testilevyllä

Rivi	Tamoksifeeni			Flutamidi			Testikemikaali 1			Testikemikaali 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 µM)	″	″	10 µM	″	″	10 µM	″	″	10 µM	″	″
B	pit. 2 (1 µM)	″	″	1 µM	″	″	1 µM	″	″	1 µM	″	″
C	pit. 3 (100 nM)	″	″	100 nM	″	″	100 nM	″	″	100 nM	″	″
D	pit. 4 (10 nM)	″	″	10 nM	″	″	10 nM	″	″	10 nM	″	″
E	pit. 5 (1 nM)	″	″	1 nM	″	″	1 nM	″	″	1 nM	″	″
F	pit. 6 (100 pM)	″	″	100 pM	″	″	100 pM	″	″	100 pM	″	″
G	0,1 % DMSO	″	″	″	″	″	1 µM OHT	″	″	100 µM dig	″	″
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO), PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2), OHT :4-hydroksitamoksifeeni, dig: digitoniini.

= lisätty E2:ta 25pM.

28. Jotta voidaan arvioida kemikaalien antagonistista vaikutusta, riveillä A–G oleviin kuoppiin on lisättävä 25 pM E2:ta. Vertailustandardit (tamoksifeeni ja flutamidi) on testattava jokaisessa ajossa. Jokaiseen testin levyyn on sisällytettävä positiivisen kontrollin kuoppia, joissa on 1 nM E2:ta, jota voidaan käyttää hERα-HeLa-9903-solulinjan kontrollina), kantaja-ainekuoppia, joissa on DMSO:ta (tai asianmukaista liuotinta), 0,1-prosenttista DMSO:ta sisältäviä kuoppia, jotka on käsitelty lisäämällä DMSO:ta lisäyskontrollia vastaavaan täydennettyyn E2:een, lopullisella pitoisuudella eli 1 µM:llä OHT:ta käsiteltyjä kuoppia sekä 100 µM:lla digitoniinia käsiteltyjä kuoppia (taulukko 5). Seuraavan testilevyn on oltava järjestykseltään sama ilman vertailustandardikuoppia (taulukko 6). Jos samassa kokeessa käytetään eri lähteistä peräisin olevia soluja (esimerkiksi eri siirrostusnumero, eri erä jne.), vertailustandardit on testattava jokaisen solulähteen osalta.

Taulukko 6

Esimerkki levyllä olevan testi- ja kontrollikemikaalien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin antagonistitestin testilevyllä

Rivi	Testikemikaali 1			Testikemikaali 2			Testikemikaali 3			Testikemikaali 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 µM)	″	″	10 µM	″	″	10 µM	″	″	10 µM	″	″
B	pit. 2 (1 µM)	″	″	1 µM	″	″	1 µM	″	″	1 µM	″	″
C	pit. 3 (100 nM)	″	″	100 nM	″	″	100 nM	″	″	100 nM	″	″
D	pit. 4 (10 nM)	″	″	10 nM	″	″	10 nM	″	″	10 nM	″	″
E	pit. 5 (1 nM)	″	″	1 nM	″	″	1 nM	″	″	1 nM	″	″
F	pit. 6 (100 pM)	″	″	100 pM	″	″	100 pM	″	″	100 pM	″	″
G	0,1 % DMSO	″	″	″	″	″	1 µM OHT	″	″	100 µM dig	″	″
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO), PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2), OHT: 4-hydroksitamoksifeeni, dig: digitoniini.

: lisätty E2:ta 25 pM.

29. Reunavaikutusten puuttuminen on vahvistettava tarvittaessa, ja jos niitä on aihetta epäillä, levyn järjestystä on muutettava tällaisten vaikutusten välttämiseksi. Esimerkiksi voidaan käyttää sellaista levyn järjestystä, jossa reunakuoppia ei käytetä.

30. Kemikaalien lisäämisen jälkeen testilevyjä on inkuboitava 5-prosenttisessa CO2-inkubaattorissa 37±1 °C:ssa 20–24 tunnin ajan reportterigeenituotteiden indusoimiseksi.

31. Erittäin haihtuvien yhdisteiden kanssa on noudatettava erityistä varovaisuutta. Näissä tapauksissa lähellä olevat kontrollikuopat voivat tuottaa vääriä positiivisia, ja niitä on arvioitava odotuksenmukaisten ja aikaisempien kontrolliarvojen perusteella. Niissä harvoissa tapauksissa, joissa haihtuvuudesta voi olla huolta, sulkijakalvojen käyttö voi auttaa eristämään yksittäiset kuopat tehokkaasti testauksen aikana, joten niiden käyttö on näissä tapauksissa suositeltavaa.

32. Lopullisten testien toistot samasta kemikaalista on tehtävä eri päivinä, jotta varmistetaan testien riippumattomuus.

Lusiferaasitesti

33. Testissä voidaan käyttää kaupallista lusiferaasitestireagenssia [esimerkiksi Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 tai vastaava] tai tavanomaista lusiferaasitestijärjestelmää (esimerkiksi Promega, E1500 tai vastaava), kunhan hyväksymisperusteet täyttyvät. Testin reagenssit on valittava käytettävän luminometrin herkkyyden perusteella. Tavanomaisen lusiferaasitestijärjestelmän yhteydessä on käytettävä soluviljelmän lyysireagenssia (esimerkiksi Promega, E1531 tai vastaava) ennen substraatin lisäämistä. Lusiferaasireagenssi on lisättävä valmistajan ohjeiden mukaisesti.

AINEISTON ANALYSOINTI

Estrogeenireseptorin agonistitesti

34. Jotta estrogeenireseptorin agonistitestin yhteydessä saadaan suhteellisen transkriptionaalisen aktiivisuuden arvo positiivisesta kontrollista (1 nM E2:ta), saman levyn luminesenssisignaalit voidaan analysoida seuraavien vaiheiden mukaisesti (myös muut vastaavat matemaattiset prosessit ovat hyväksyttäviä):

Vaihe 1. Laske kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3. Laske normalisoidun positiivisen kontrollin keskiarvo.

Vaihe 4. Jaa levyn jokaisen kuopan normalisoitu arvo normalisoidun positiivisen kontrollin keskiarvolla (PK=100 %).

Jokaisen kuopan lopullinen arvo on kyseisen kuopan suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus verrattuna positiivisen kontrollin vasteeseen.

Vaihe 5. Laske suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus testikemikaalin jokaisesta pitoisuusryhmästä. Vasteeseen liittyy kaksi ulottuvuutta: keskimääräinen transkriptionaalinen aktiivisuus (vaste) ja pitoisuus, jossa vaste ilmaantuu (ks. seuraava kohta).

EC_{50}-, PC_{50}- ja PC_{10}-arvojen indusoitumiseen liittyvät näkökohdat

35. EC50-arvon laskemiseen tarvitaan täydellinen pitoisuus-vastekäyrä, mutta se ei ole aina mahdollista tai käytännöllistä testipitoisuuden vaihteluvälin rajoitusten vuoksi (esimerkiksi sytotoksisuuden tai liukoisuusongelmien vuoksi). Koska EC50 ja suurin induktio (vastaa Hillin yhtälön ylintä lukua) ovat informatiivisia parametreja, ne on mahdollisuuksien mukaan ilmoitettava. EC50:n ja suurimman induktion laskemisessa on käytettävä asianmukaisia tilasto-ohjelmia (esimerkiksi Graphpad Prism -tilasto-ohjelmaa). Jos Hillin logistinen yhtälö on sovellettavissa pitoisuus-vastetietoihin, EC50 on laskettava tällä yhtälöllä (7):

Y=Bottom + (Top-Bottom) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x Hill slope)), jossa:

X on pitoisuuden logaritmi ja

Y on vaste, ja Y alkaa pienimmästä vasteesta (bottom) ja kulkee suurimpaan vasteeseen (top) logistisella käyrällä. Hillin logistisessa yhtälössä pienimmäksi vasteeksi on määritetty nolla.

36. Jokaisesta testikemikaalista on esitettävä nämä tiedot:

RPCMax, joka on suurin testikemikaalin indusoima vaste, ja se ilmaistaan prosenttiosuutena E2:n (1 nM) indusoimasta vasteesta samalla levyllä, sekä PC_{Max} (RPCMax-arvoon liittyvä pitoisuus); ja

positiivisten kemikaalien osalta pitoisuudet, jotka indusoivat PC10-arvon ja tarvittaessa PC50-arvon.

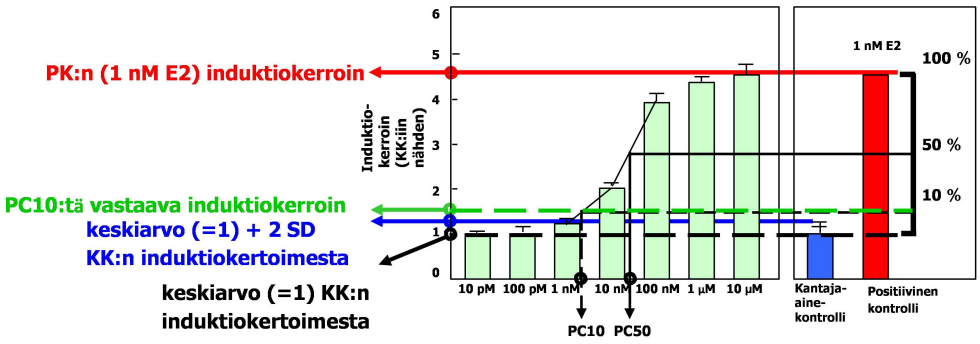
37. PCx-arvo voidaan laskea interpoloimalla kahden pisteen välillä X-Y-koordinaatilla; toinen piste on heti PCx-arvon yläpuolella ja toinen heti sen alapuolella. Kun PCx-arvon ylä- ja alapuolella olevien datapisteiden arvoina ovat koordinaatit (a, b) ja (c, d), PCx-arvo voidaan laskea tällä yhtälöllä:

$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. PC-arvojen kuvaukset ovat seuraavassa kuvassa 1.

Kuva 1

Esimerkki PC-arvojen johtamisesta. PK (1 nM E2:ta) sisältyy jokaiselle testilevylle



Estrogeenin antagonistitesti

39. Jotta estrogeenin antagonistitestin yhteydessä saadaan suhteellisen transkriptionaalisen aktiivisuuden arvo (RTA) lisäyskontrollista (25 pM E2:ta), saman levyn luminesenssisignaalit voidaan analysoida seuraavien vaiheiden mukaisesti (myös muut vastaavat matemaattiset prosessit ovat hyväksyttäviä):

Vaihe 1. Laske kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi. Vaihe 3. Laske normalisoidun lisäyskontrollin keskiarvo.

Vaihe 4. Jaa levyn jokaisen kuopan normalisoitu arvo normalisoidun lisäyskontrollin keskiarvolla (lisäyskontrolli=100 %).

Jokaisen kuopan lopullinen arvo on kyseisen kuopan suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus verrattuna lisäyskontrollin vasteeseen.

Vaihe 5. Laske suhteellisen transkriptionaalisen aktiivisuuden keskiarvo jokaisesta käsittelystä.

IC_{30}- ja IC_{50}-arvojen indusoitumista koskevat näkökohdat

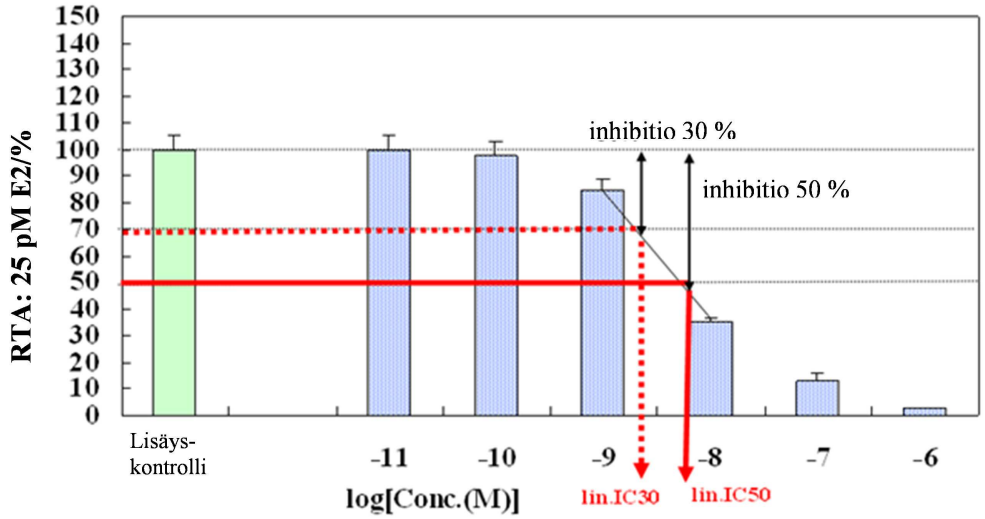
40. Positiivisten kemikaalien osalta on ilmoitettava pitoisuudet, jotka indusoivat IC30-arvon ja tarvittaessa IC50-arvon.

41. ICx-arvo voidaan laskea interpoloimalla kahden pisteen välillä X-Y-koordinaatilla; toinen piste on heti ICx-arvon yläpuolella ja toinen heti sen alapuolella. Kun ICx-arvon ylä- ja alapuolella olevien datapisteiden arvoina ovat koordinaatit (c, d) ja (a, b), ICx-arvo voidaan laskea tällä yhtälöllä:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Kuva 2

Esimerkki IC-arvojen johtamisesta. Lisäyskontrolli (25 pM E2:ta) sisältyy jokaiselle testilevylle



RTA: Suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus

42. Tulosten tulee perustua kahteen (tai kolmeen) riippumattomaan testiajoon. Jos kahdesta ajosta saadaan vertailukelpoiset ja siten toistettavat tulokset, kolmatta ajoa ei tarvitse tehdä. Jotta tulokset olisivat hyväksyttäviä, niiden on

— täytettävä hyväksymisperusteet (ks. hyväksymisperusteet 14–20 kohdasta)

— oltava toistettavissa.

Aineiston tulkintaperusteet

Taulukko 7

Estrogeenireseptorin agonistitestin positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet

Positiivinen	Jos saatu RPCMax on yhtä suuri kuin tai suurempi kuin 10 prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta.
Negatiivinen	Jos saatu RPCMax ei ole vähintään 10 prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta.

Taulukko 8

Estrogeenireseptorin antagonistitestin positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet

Positiivinen	Jos vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta voidaan laskea IC30-arvo.
Negatiivinen	Jos vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta ei voida laskea IC30-arvoa.

43. Aineiston tulkintaperusteet on esitetty taulukoissa 7 ja 8. Positiivisia tuloksia luonnehditaan sekä vaikutuksen suuruusluokalla että sillä pitoisuudella, jolla vaikutus ilmaantuu. Kumpikin näistä tavoitteista täyttyy, kun tulokset ilmoitetaan pitoisuutena, jolla agonistitestissä saadaan 50 prosenttia (PC50) tai 10 prosenttia (PC10) positiivisen kontrollin tuloksista ja jolla antagonistitestissä estyy 50 prosenttia (IC50) tai 30 prosenttia (IC30) lisäyskontrollin arvosta. Testikemikaali määritetään kuitenkin positiiviseksi, jos testikemikaalin indusoima suurin vaste (RPCMax) on yhtä suuri tai suurempi kuin 10 prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta. Negatiiviseksi testikemikaali määritetään silloin, jos RPCMax ei ole vähintään 10:tä prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta.

44. Agonistitestissä arvot PC10, PC50 ja PCMax sekä antagonistitestissä arvot IC30 ja IC50 voidaan laskea laskentataulukolla, joka on saatavana testiohjeen yhteydessä OECD:n julkisella verkkosivulla ([2]).

45. Yleensä riittää, että PC10- tai PC50- sekä IC30- tai IC50-arvot lasketaan vähintään kahdesti. Jos aineiston perusjoukossa samalla pitoisuusalueella on kuitenkin vaihtelua siten, että variaatiokerroin (CV; %) on liian suuri, aineisto ei välttämättä ole luotettava, ja suuren vaihtelun syy on selvitettävä. PC10-arvon laskemisessa käytettävien datapisteiden raakatietotriplikaattien (luminesenssin intensiteettitietojen) variaatiokertoimen olisi oltava alle 20 prosenttia.

46. Hyväksymisperusteiden täyttyminen tarkoittaa, että testijärjestelmä toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että tietty testiajo tuottaisi tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testiajon tulosten toistuvuus on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa.

47. Estrogeenireseptorin agonistitestissä, kun tarvitaan tämän testiohjeen mukaisten seulonta- ja priorisointitarkoitusten ohella lisää tietoa positiivisista testikemikaaleista, etenkin PC10–PC49-kemikaaleista ja niistä kemikaaleista, joiden oletetaan ylistimuloivan lusiferaasia, voidaan vahvistaa, että havaittu lusiferaasiaktiivisuus on yksinomaan ERα-spesifi vaste, käyttämällä ERα-antagonistia (ks. lisäys 2.1).

TESTIRAPORTTI

48. Katso ”ER TA -TESTIN OSAT” -luvun 20 kohta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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, 1459–1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252–4263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89–94.

(5) Kobayashi H., *et al*. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769–771.

(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), 953–959.

(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.

Lisäys 2.1

VÄÄRÄT POSITIIVISET: MUIDEN KUIN RESEPTORIVÄLITTEISTEN LUMINESENSSISIGNAALIEN ARVIOIMINEN

1. Estrogeenireseptorin agonistitestissä väärät positiiviset voivat johtua muusta kuin estrogeenivälitteisestä lusiferaasigeenin aktivoitumisesta tai geenituotteen suorasta aktivoitumisesta tai tähän liittymättömästä fluoresenssista. Tällaiset vaikutukset näkyvät epätäydellisenä tai epätavallisena annos-vastekäyränä. Jos tällaisia vaikutuksia on aihetta epäillä, estrogeenireseptorin antagonistin (esimerkiksi 4-hydroksitamoksifeeni (OHT) myrkyttömänä pitoisuutena) vaikutus vasteeseen on tutkittava. Puhdas antagonisti ICI 182780 ei välttämättä sovi tähän tarkoitukseen, koska riittävä pitoisuus sitä voi pienentää kantaja-ainekontrollin arvoa, mikä puolestaan vaikuttaa aineiston analyysiin.

2. Jotta varmistetaan tämän lähestymistavan validiteetti, samalla levyllä on testattava seuraavat seikat:

   — tuntemattoman kemikaalin agonistinen vaikutus 10 μM:lla tamoksifeenia ja ilman sitä

   — KK (kolmena näytteenä)

   — tamoksifeeni (kolmena näytteenä)

   — 1 nM E2:ta (kolmena näytteenä) agonistin positiivisena kontrollina

   — 1 nM E2:ta + tamoksifeenia (kolmena näytteenä).

Aineiston tulkintaperusteet

Huomautus: Kaikki kuopat on käsiteltävä samalla pitoisuudella kantaja-ainetta.

— Jos käsittely estrogeenireseptorin antagonistilla ei vaikuta tuntemattoman kemikaalin agonistiseen vaikutukseen, kemikaali luokitellaan negatiiviseksi.

— Jos tuntemattoman kemikaalin agonistinen vaikutus estyy kokonaan, on sovellettava päätöksentekoperusteita.

— Jos agonistinen vaikutus pienimmällä pitoisuudella on yhtä suuri tai suurempi kuin PC-10-vaste, tuntematon kemikaali estyy yhtä paljon tai enemmän kuin PC10-vaste. Estrogeenireseptorin antagonistilla käsittelemättömien ja käsiteltyjen kuoppien välisten vasteiden ero lasketaan. Tätä eroa on pidettävä todellisena vasteena, ja sitä on käytettävä laskettaessa asianmukaisia parametreja, jotta luokittelupäätös voidaan tehdä.

Tietojen analysointi

Tarkista suoritusvaatimukset.

Tarkista samoissa oloissa käsiteltyjen kuoppien variaatiokerroin.

1. Laske kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

2. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisen sellaisen kuopan arvosta, jota **ei** ole käsitelty tamoksifeenilla.

3. Laske tamoksifeenin keskiarvo.

4. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisen sellaisen kuopan arvosta, joka on käsitelty tamoksifeenilla.

5. Laske positiivisen kontrollin keskiarvo.

6. Laske kaikkien muiden kuoppien suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus positiiviseen kontrolliin nähden.

Lisäys 2.2

DEKSTRAANILLA PINNOITETULLA HIILELLÄ (DCC) KÄSITELLYN SEERUMIN VALMISTAMINEN

1. Dekstraanilla pinnoitettua hiiltä sisältävällä seerumilla käsittely on yleinen menetelmä, jolla poistetaan estrogeenisia yhdisteitä solujen kasvatusliuokseen lisättävästä seerumista. Näin vältetään seerumissa oleviin estrogeenijäämiin liittyvä vastausharha. Tällä menettelyllä voidaan käsitellä 500 ml naudan sikiön verestä valmistettua seerumia.

Osat

2. Seerumin valmistamisessa tarvitaan seuraavat materiaalit ja laitteet:

Materiaalit

Aktiivihiili

Dekstraani

Magnesiumkloridiheksahydraatti (MgCl2·6H2O)

Sakkaroosi

1 M HEPES-puskuriliuos (pH 7,4)

Suodatinjärjestelmällä tuotettu ultrapuhdas vesi

Laitteet

Autoklaavattu lasiastia (koko määritettävä asianmukaisesti), yleinen laboratoriosentrifugi (jonka lämpötilaksi voidaan asettaa 4 °C)

Menettely

3. Seuraava menettely koskee 50 ml:n sentrifugiputkien käyttöä:

[Päivä 1] Valmista dekstraanilla pinnoitettu hiilisuspensio 1 litrasta ultrapuhdasta vettä, joka sisältää 1,5 mM magnesiumkloridia, 0,25 M sakkaroosia, 2,5 g hiiltä, 0,25 g dekstraania ja 5 mM HEPES-liuosta. Sekoita suspensio 4 °C:ssa ja anna sen olla yön yli.

[Päivä 2] Jaa suspensio 50 ml:n sentrifugiputkiin ja sentrifugoi ne kierrosluvulla 10 000 rpm 4 °C:ssa 10 minuutin ajan. Poista supernatantti ja varastoi puolet hiilisedimentistä 4 °C:seen käytettäväksi päivänä 3. Suspendoi toinen puoli hiilestä FBS:n kanssa, joka on sulatettu varovasti saostumisen välttämiseksi ja lämpöinaktivoitu 56 °C:ssa 30 minuutin ajan, ja siirrä seos autoklaavattuun lasiastiaan, esimerkiksi Erlenmeyer-pulloon. Sekoita tämä suspensio varovasti 4 °C:ssa ja anna sen olla yön yli.

[Päivä 3] Jaa suspensio ja FBS sentrifugiputkiin ja sentrifugoi ne kierrosluvulla 10 000 rpm 4 °C:ssa 10 minuutin ajan. Kerää FBS ja siirrä se uuteen hiilikerrokseen, joka on valmistettu ja varastoitu päivänä 2. Suspendoi hiilisedimentti ja sekoita tämä suspensio autoklaavatussa lasiastiassa 4 °C:ssa ja anna sen olla yön yli.

[Päivä 4] Jaa suspensio putkiin ja sentrifugoi ne kierrosluvulla 10 000 (lämpötila 4 °C) 10 minuutin ajan. Steriloi supernatantti suodattamalla se 0,2 µm:n steriilin suodattimen läpi. Tämä dekstraanilla ja hiilellä käsitelty FBS on säilytettävä -20 °C:ssa, ja se pitää käyttää vuoden kuluessa.

Lisäys 3

VM7LUC-SOLULINJAAN PERUSTUVA ESTROGEENIRESEPTORIN TRANSAKTIVAATIOTESTI ESTROGEENIRESEPTORIN AGONISTIEN JA ANTAGONISTIEN MÄÄRITTÄMISEKSI

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä testissä käytetään VM7Luc4E2-solulinjaa ([1]). Sen ovat validoineet NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) ja vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea ICCVAM (1). VM7Luc-solulinja ilmentää pääasiassa endogeenista ERα-reseptoria ja vähemmässä määrin myös ERβ-reseptoria (2) (3) (4).

2. Tätä testiä voidaan käyttää hyvin monenlaisiin aineisiin, kunhan ne liukenevat dimetyylisulfoksidiin (DMSO; CAS-nro 67-68-5), eivät reagoi siihen tai soluviljelyaineeseen eivätkä ole sytotoksisia testattavina pitoisuuksina. Jos DMSO:n käyttö ei ole mahdollista, voidaan käyttää toista kantaja-ainetta, kuten etanolia tai vettä (ks. 12 kohta). VM7Luc ER TA -(ant)agonistitestin osoitettu suorituskyky viittaa siihen, että tämän testin tuloksista voidaan saada tietoa estrogeenivälitteisistä vaikutustavoista, ja sitä voidaan harkita määritettäessä niiden aineiden tärkeysjärjestystä, joista on syytä tehdä lisätestejä.

3. Tämä testi on kehitetty nimenomaan hERα- ja hERß-välitteisen transaktivaation havaitsemiseen; päätetapahtumana mitataan kemiluminesenssia. Biotesteissä kemiluminesenssia käytetään laajalti, koska luminesenssin signaali-tausta-suhde on suuri. Solupohjaisissa testeissä tulikärpäsen lusiferaasientsyymin aktiivisuutta voivat kuitenkin häiritä aineet, jotka estävät lusiferaasientsyymiä, mikä aiheuttaa joko selvää inhibiota tai luminesenssin voimakkuuden kasvamista proteiinien stabilisoitumisen vuoksi. Lisäksi joistakin lusiferaasipohjaisista estrogeenireseptorin reportterigeenitesteistä on myös ilmoitettu yli 1 µM:n suuruisten fytoestrogeenipitoisuuksien yhteydessä muun kuin reseptorin välittämiä luminesenssisignaaleja, jotka johtuvat lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta. Vaikka annos-vastekäyrä osoittaa, että estrogeenireseptorijärjestelmän varsinainen aktivoituminen tapahtuu pienemmillä pitoisuuksilla, fytoestrogeenien tai samankaltaisten yhdisteiden, joiden epäillään tuottavan fytoestrogeenien kaltaista lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, aiheuttamaa lusiferaasin ilmentymistä on tutkittava huolellisesti ER TA -testijärjestelmillä, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja.

4. Kohdat ”YLEISJOHDANTO” JA ”ER TA -TESTIN OSAT” on luettava, ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Testiä käytetään osoittamaan ligandin sitoutuminen estrogeenireseptoriin, minkä jälkeen reseptori-ligandikompleksi siirtyy tumaan. Tumassa reseptori-ligandikompleksi sitoutuu tiettyihin DNA:n responssielementteihin ja transaktivoi reportterigeenin (*luc*). Tämä käynnistää lusiferaasin tuotannon ja sen myötä valoemission, joka voidaan kvantifioida luminometrillä. Lusiferaasin aktiivisuutta voidaan arvioida nopeasti ja edullisesti monilla kaupallisesti saatavilla olevilla testisarjoilla. VM7Luc ER TA -testissä käytetään estrogeenille herkkää ihmisen rintasyövän adenokarsinoomasta peräisin olevaa solulinjaa (VM7), johon on pysyvästi transfektoitu tulikärpäsen *luc*-reportterikonstrukti neljän estrogeeniherkän elementin säätelemänä hiiren rintasyöpäviruksen promoottoria edeltävään sekvenssikohtaan,jotta

([1]) Ennen kesäkuuta 2016 tämän solulinjan nimi oli BG1Luc. BG-1-soluja kuvasivat ensimmäisen kerran Geisinger ja muut (1998) (12), ja myöhemmin niitä luonnehtivat National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) -tutkimuslaitoksen tutkijat (13). Melko hiljattain havaittiin, että tutkijoiden käyttämistä BG-1-soluista on kaksi erilaista varianttia, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Lin työtovereineen toteuttama tarkempi analyysi ja DNA-testi (2014) (14) näiden kahden BG-1-variantin solulinjoista osoitti, että BG-1 Fr oli ainutkertainen ja että BG-1 NIEHS, testin kehittämisessä käytetty alkuperäinen solulinja, ei ollutkaan ihmisen munasarjakarsinooman BG1-solulinja, vaan ihmisen rintasyövän MCF7-solulinjan variantti. Testissä käytetty solulinja, jonka nimi oli aikaisemmin BG1Luc4E2 (15), on nyt nimeltään VM7Luc4E2 (”V” = variantti; ”M7” = MCF7-solut). Niinpä testin nimi on nyt VM7Luc ER TA. Vaikka tämä muuttaa sen solulinjan alkuperää, johon testi perustuu, se ei kuitenkaan vaikuta julkaistuihin validointitutkimuksiin eikä tämän testin käyttökelpoisuuteen ja soveltamiseen niiden kemikaalien seulonnassa, joilla voi olla estrogeenisia tai antiestrogeenisia vaikutuksia.

havaittaisiin estrogeenireseptoriin agonistisesti tai antagonistisesti vaikuttavat aineet *in vitro*. Tämä hiiren rintasyöpäviruksen promoottori ilmentää vain vähän ristireaktiivisuutta muiden steroidien ja muiden hormonien kuin steroidien kanssa (8). Aineiston tulkintaperusteet on kuvattu yksityiskohtaisesti 41 kohdassa. Positiivisena vasteena pidetään pitoisuus-vastekäyrää, jossa on vähintään kolmessa pisteessä ei-päällekkäiset virhepalkit (keskiarvo ± SD) ja vähintään 20 prosentin muutos amplitudissa (normalisoitu suhteellinen valoyksikkö [RLU]) vertailustandardin enimmäisarvosta (agonistitestissä 17β-estradioli [E2; CAS-nro 50-28-2], antagonistitestissä raloksifeeni HCl [Ral; CAS-nro 84449-90-1] / E2).

MENETTELY

Solulinja

6. Testissä on käytettävä VM7Luc4E2-solulinjaa, jossa on pysyvästi transfektoituja soluja. Tällä hetkellä solulinjaa on saatavana vain teknisen lisenssisopimuksen nojalla Kalifornian yliopistosta (University of California, Davis, Kalifornia, Yhdysvallat) ([2]) ja Xenobiotic Detection Systems Inc. -yritykseltä (Durham, Pohjois-Carolina, Yhdysvallat) ([3]).

Solulinjan stabiilisuus

7. Jotta solulinjan stabiilisuus ja eheys säilyy, soluja on kasvatettava useampi kuin yksi siirrostus pakastetusta varastosta solujen kasvatusliuoksessa (ks. 9 kohta). Soluja ei kuitenkaan tule kasvattaa yli 30:tä siirrostusta. VM7Luc4E2-solulinjan osalta 30 siirrostuksen tekeminen kestää noin kolme kuukautta.

Soluviljelmä ja maljausolot

8. Kaikkien materiaalien ja menetelmien laadun varmistamiseksi on noudatettava menettelyjä, jotka on esitetty hyviä soluviljelykäytäntöjä koskevassa oppaassa Guidance on Good Cell Culture Practice (5) (6). Näin taataan kaikkien töiden integriteetti, validiteetti ja toistettavuus.

9. VM7Luc4E2-soluja säilytetään RPMI 1640 -kasvatusaineessa, jota täydennetään 0,9-prosenttisella Pen-Strepillä ja 8,0-prosenttisella FBS-seerumilla asianmukaisessa kudosviljelyinkubaattorissa. Lämpötilan on oltava 37 ^{0}C ± 1 ^{0}C, ilmankosteuden 90 % ± 5 % ja ilman hiilidioksidipitoisuuden 5,0 % ± 1 %.

10. Kun saavutetaan ~80 prosentin konfluenssi, VM7Luc4E2-soluista tehdään jatkoviljely, ja ne asetetaan estrogeenittomaan ympäristöön 48 tunnin ajaksi ennen kuin solut laitetaan 96-kuoppaisille levyille altistettavaksi testikemikaaleille. Sen jälkeen analysoidaan estrogeenin aiheuttama lusiferaasin aktiivisuus. Estrogeeniton kasvatusaine (EFM) sisältää Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) -ainetta ilman fenolipunaista. Siihen lisätään 4,5-prosenttista hiili-/dekstraanikäsiteltyä FBS:ää, 1,9-prosenttista L-glutamiinia ja 0,9-prosenttista Pen-Strepiä. Missään muoviesineissä ei saa olla estrogeenista vaikutusta [ks. tarkka tutkimusprotokolla (7)].

Hyväksymisperusteet

11. Testin hyväksyminen tai hylkääminen perustuu vertailustandardin ja kontrollitulosten arviointiin jokaisen 96-kuoppaisella levyllä tehdyn kokeen osalta. Jokainen vertailustandardi testataan useampana pitoisuutena, ja jokaisesta vertailu- ja kontrollipitoisuudesta on useita näytteitä. Tuloksia verrataan näiden parametrien laatukontrolleihin,jotka

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, USA, sähköpostiosoite: msdenison@ucdavis.edu, +1 530 754 8649.

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, sähköpostiosoite: info@dioxins.com, puhelin: +1 919 688 4804, faksi: +1 919 688 4404.

on saatu kunkin laboratorion pätevyyden osoittamisen aikana tuottamista aikaisemmista agonisti- ja antagonistitietokannoista. Aikaisempia tietokantoja päivitetään vertailustandardien ja kontrollien arvoilla jatkuvasti. Jos laitteita tai laboratorio-oloja muutetaan, aikaisemmat tietokannat voidaan joutua päivittämään.

Agonistitesti

Annoksenmääritystesti

- Induktio: Levyn induktio on mitattava jakamalla keskimäärin suurin E2-vertailustandardin suhteellisen valoyksikön (RLU) arvo keskimääräisellä DMSO-kontrollin RLU-arvolla. Yleensä saavutetaan viisinkertainen induktio, mutta hyväksynnän kannalta riittää, että se on suurempi tai yhtä suuri kuin nelinkertainen.

- DMSO-kontrollin tulokset: Liuotinkontrollin RLU-arvot saavat olla enintään 2,5 kertaa aikaisemman liuotinkontrollin keskimääräinen RLU-arvon keskihajonta.

- Jos kumpikaan hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Laaja testi

Testissä sovelletaan agonistin annoksenmääritystestin hyväksymisperusteita ja seuraavia tietoja:

- Vertailustandarditulokset: E2-vertailustandardin pitoisuus-vastekäyrän on oltava S-kirjaimen muotoinen, ja vähintään kolmen arvon on oltava pitoisuus-vastekäyrän lineaarisella osuudella.

- Positiivisen kontrollin tulokset: Metoksikloorikontrollin RLU-arvojen on oltava suuremmat kuin DMSO:n keskiarvo plus kolme kertaa sen keskihajonta.

- Jos mikään yksittäinen hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Antagonistitesti

Annoksenmääritystesti

- Pelkistyminen: Levyn pelkistyminen mitataan jakamalla keskimäärin suurin Ral-/E2-vertailustandardin RLU-arvo DMSO-kontrollin keskimääräisellä RLU-arvolla. Yleensä saavutetaan viisinkertainen pelkistyminen, mutta hyväksynnän kannalta riittää, että se on suurempi tai yhtä suuri kuin kolminkertainen.

- E2-kontrollin tulokset: E2-kontrollin RLU-arvot saavat olla enintään 2,5 kertaa aikaisemman E2-kontrollin keskimääräinen RLU-arvon keskihajonta.

- DMSO-kontrollin tulokset: DMSO-kontrollin RLU-arvot saavat olla enintään 2,5 kertaa aikaisemman liuotinkontrollin keskimääräinen RLU-arvon keskihajonta.

• Jos mikään yksittäinen hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Laaja testi

Testissä sovelletaan antagonistin annoksenmääritystestin hyväksymisperusteita ja seuraavia tietoja:

• Vertailustandarditulokset: Ral-/E2-vertailustandardin pitoisuus-vastekäyrän on oltava S-kirjaimen muotoinen, ja vähintään kolmen arvon on oltava pitoisuus-vastekäyrän lineaarisella osuudella.

• Positiivisen kontrollin tulokset: Tamoksifeeni-/E2-kontrollin RLU-arvojen on oltava pienemmät kuin E2-kontrollin keskiarvo miinus kolme kertaa sen keskihajonta.

• Jos mikään yksittäinen hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Vertailustandardit, positiiviset ja kantaja-ainekontrollit

Kantaja-ainekontrolli (agonisti- ja antagonistitestit)

12. Kantaja-aine, jota on käytetty testikemikaalien liuottamiseen, on testattava kantaja-ainekontrollina. VM7Luc ER TA -testin validoinnissa käytetty kantaja-aine oli 1-prosenttinen (v/v) dimetyylisulfoksidi (DMSO, CAS-nro 67-68-5) (ks. 24 kohta). Jos käytetään muuta kantaja-ainetta kuin DMSO:ta, kaikki vertailustandardit, kontrollit ja testikemikaalit on testattava samassa kantaja-aineessa tarvittaessa.

Vertailustandardi (agonistin annoksenmääritys)

13. Vertailustandardi on E2 (CAS-nro 50-28-2). Annoksenmääritystestissä vertailustandardi koostuu E2:n neljän pitoisuuden sarjalaimennoksesta ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ ja $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), ja jokainen pitoisuus testataan rinnakkaisessa kuopassa.

Vertailustandardi (laaja agonistitesti)

14. Laajassa testissä E2 koostuu 1:2-sarjalaimennoksesta, joka puolestaan koostuu 11 pitoisuudesta (vaihdellen välillä $3{,}67 \times 10^{-10}$ – $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) E2:ta rinnakkaisissa kuopissa.

Vertailustandardi (antagonistin annoksenmääritys)

15. Vertailustandardi on tämä yhdistelmä: Ral (CAS-nro 84449-90-1) ja E2 (CAS-nro 50-28-2). Annoksenmääritystestissä Ral/E2 koostuu Ral:n sarjalaimennoksesta ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ ja $1{,}92 \times 10^{-10}$M) ja kiinteästä pitoisuudesta ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2:ta rinnakkaisissa kuopissa.

Vertailustandardi (laaja antagonistitesti)

16. Laajassa testissä Ral/E2 koostuu Ral:n sarjalaimennoksesta suhteessa 1:2 (vaihdellen välillä $2{,}45 \times 10^{-8}$ – $9{,}57 \times 10^{-11}$M) ja kiinteästä pitoisuudesta ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2, ja Ral:ia/E2:ta laitetaan yhdeksän pitoisuutta rinnakkaisiin kuoppiin.

Heikko positiivinen kontrolli (agonisti)

17. Heikko positiivinen kontrolli on 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoksikloori (metoksikloori; CAS-nro 72-43-5) estrogeenittomassa kasvatusaineessa.

Heikko positiivinen kontrolli (antagonisti)

18. Heikko positiivinen kontrolli sisältää tamoksifeenia (CAS-nro 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M ja 9,18 × 10^{-11} M E2:ta estrogeenittomassa kasvatusaineessa.

E2-kontrolli (vain antagonistitesti)

19. E2-kontrolli on 9,18 × 10^{-11} M E2:ta estrogeenittomassa kasvatusaineessa, ja sitä käytetään lähtötason negatiivisena kontrollina.

Induktiokerroin (agonisti)

20. Vertailustandardin (E2) lusiferaasiaktiivisuuden induktio mitataan jakamalla keskimäärin suurin E2-vertailustandardin RLU-arvo DMSO-kontrollin keskimääräisellä RLU-arvolla. Tuloksen pitää olla suurempi kuin nelinkertainen.

Induktiokerroin (antagonisti)

21. Vertailustandardin (Ral/E2) keskimääräinen lusiferaasiaktiivisuus mitataan jakamalla keskimäärin suurin Ral/E2-vertailustandardin RLU-arvo DMSO-kontrollin keskimääräisellä RLU-arvolla. Tuloksen pitää olla suurempi kuin kolminkertainen.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen (ks. 14 kohta sekä taulukot 3 ja 4 tämän testimenetelmän kohdassa ER TA -TESTIN OSAT).

Kantaja-aine

22. Testikemikaalit on liuotettava liuottimeen, johon testikemikaali liukenee ja jonka voi sekoittaa solujen kasvatusliuokseen. Sopivia kantaja-aineita ovat vesi, etanoli (puhtaus 95–100 prosenttia) ja DMSO. Jos käytetään DMSO:ta, sen pitoisuus saa olla enintään 1 tilavuusprosentti (v/v). Kaikkien kantaja-aineiden osalta on osoitettava, ettei käytetty enimmäistilavuus ole sytotoksinen ja ettei se vaikuta testin suorittamiseen. Vertailustandardit ja kontrollit liuotetaan 100-prosenttiseen liuottimeen ja laimennetaan sen jälkeen asianmukaisiksi pitoisuuksiksi estrogeenittomassa kasvatusaineessa.

Testikemikaalien valmistelu

23. Testikemikaalit liuotetaan 100-prosenttiseen DMSO:hon (tai asianmukaiseen liuottimeen) ja laimennetaan sen jälkeen asianmukaisiksi pitoisuuksiksi estrogeenittomassa kasvatusaineessa. Kaikkien testikemikaalien on annettava tasapainottua huoneenlämpötilassa, ennen kuin ne liuotetaan ja laimennetaan. Jokaiseen kokeeseen on valmistettava tuoreet testikemikaaliliuokset. Liuoksissa ei saa olla huomattavaa saostumista tai sameutta. Vertailustandardien ja kontrollien kantaliuokset voidaan valmistaa bulkkiliuoksina; lopullinen vertailustandardi, kontrollilaimennokset ja testikemikaalit on kuitenkin valmistettava tuoreena kuhunkin kokeeseen ja käytettävä 24 tunnin kuluessa valmistamisesta.

Liukoisuus ja sytotoksisuus: annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

24. Annoksenmääritystesti koostuu seitsemästä kohdasta – 1:10-laimennoksista, jotka ajetaan rinnakkaisnäytteinä. Aluksi testikemikaalit testataan enimmäispitoisuudella 1 mg/ml (~1 mM) (agonistitesti) ja 20 µg/ml (~10 µM) (antagonistitesti). Annoksenmäärityskokeilla määritetään seuraavat seikat:

— testikemikaalin aloituspitoisuudet, joita käytetään laajassa testissä

— testikemikaalin laimennukset (1:2 tai 1:5), joita käytetään laajassa testissä.

25. Solujen elinkyvyn / sytotoksisuuden arviointi sisältyy agonisti- ja antagonistitestien protokollaan (7), ja se kuuluu myös annoksenmääritykseen ja laajaan testiin. Sytotoksisuusmenetelmä, jolla arvioitiin solujen elinkykyä VM7Luc ER TA -testin validoinnin aikana (1), oli skaalattu laadullinen visuaalinen tarkkailumenetelmä, mutta sytotoksisuuden määrittämisessä voidaan käyttää myös kvantitatiivista menetelmää (ks. protokolla (7)). Sellaisia tietoja testikemikaalipitoisuuksista, jotka aiheuttavat yli 20 prosentin vähenemisen elinkyvyssä, ei voida käyttää.

Testikemikaalille altistus ja testilevyn järjestäminen

26. Solut lasketaan ja laitetaan 96-kuoppaisille kudosviljelylevyille (2 x 10^5 solua yhteen kuoppaan) estrogeenittomaan kasvatusaineeseen, ja niitä inkuboidaan 24 tunnin ajan, jotta solut kiinnittyvät levyyn. Estrogeeniton kasvatusaine poistetaan ja korvataan niin ikään estrogeenittomassa kasvatusaineessa olevilla testi- ja vertailukemikaaleilla, joita inkuboidaan 19–24 tuntia. Erityistä varovaisuutta on noudatettava erittäin haihtuvien aineiden kanssa, koska lähellä olevat kontrollikuopat voivat tuottaa niiden vuoksi vääriä positiivisia tuloksia. Näissä tapauksissa sulkijakalvoista voi olla apua yksittäisten kuoppien eristämisessä testauksen aikana, joten niiden käyttö on suositeltavaa.

Annoksenmääritystestit

27. Annoksenmääritystesteissä käytetään kaikkia 96-kuoppaisen levyn kuoppia testattaessa enintään kuusi testikemikaalia seitsenvaiheisina 1:10-sarjalaimennoksina rinnakkaisnäyttein (ks. kuvat 1 ja 2).

— *Agonistin* annoksenmääritystestissä käytetään neljää E2-pitoisuutta rinnakkaisnäytteinä vertailustandardina ja neljää rinnakkaiskuoppaa DMSO-kontrollille.

— *Antagonistin* annoksenmääritystestissä käytetään kolmea Ral/E2-pitoisuutta ja 9,18 × 10^{-11} M:ta E2:ta rinnakkaisnäytteinä vertailustandardina, ja E2-kontrollille ja DMSO-kontrollille on kolme rinnakkaista kuoppaa.

Kuva 1

Agonistin annoksenmääritystesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	KK	KK	KK	KK	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Lyhenteet: E2-1–E2-4 = E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienempään); TC1-1–TC1-7 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (TC1) (suurimmasta pienimpään); TC2-1– TC2-7 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (TC2) (suurimmasta pienimpään); TC3-1– TC3-7 = testikemikaalin 3 pitoisuudet (TC3) (suurimmasta pienimpään); TC4-1– TC4-7 = testikemikaalin 4 pitoisuudet (TC4) (suurimmasta pienimpään); TC5-1– TC5-7 = testikemikaalin 5 pitoisuudet (TC5) (suurimmasta pienimpään); TC6-1– TC6-7 = testikemikaalin 6 pitoisuudet (TC6) (suurimmasta pienimpään); KK = kantaja-ainekontrolli (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Kuva 2

Antagonistin annoksenmääritystesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	KK	KK	KK	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Lyhenteet: E2 = E2-kontrolli; Ral-1–Ral-3 = raloksifeeni-/E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); TC1-1–TC1-7 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (TC1) (suurimmasta pienimpään); TC2-1– TC2-7 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (TC2) (suurimmasta pienimpään); TC3-1– TC3-7 = testikemikaalin 3 pitoisuudet (TC3) (suurimmasta pienimpään); TC4-1– TC4-7 = testikemikaalin 4 pitoisuudet (TC4) (suurimmasta pienimpään); TC5-1– TC5-7 = testikemikaalin 5 pitoisuudet (TC5) (suurimmasta pienimpään); TC6-1– TC6-7 = testikemikaalin 6 pitoisuudet (TC6) (suurimmasta pienimpään); KK = kantaja-ainekontrolli (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Huomautus: Kaikki testikemikaalit testataan tässä määrässä E2:ta: 9,18 × 10-11 M.

28. Nesteen suositeltava lopullinen määrä jokaisessa kuopassa on 200 µl. Käytä vain sellaisia testilevyjä, joissa solujen elinkyky kaikissa kuopissa on vähintään 80 prosenttia.

29. Laajan ***agonistitestin*** aloituspitoisuuksien määritys kuvataan perusteellisesti agonistitestin protokollassa (7). Määritysperusteet ovat lyhyesti seuraavat:

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä ei ole pisteitä, jotka ovat suurempia kuin keskiarvo plus kolme kertaa DMSO-kontrollin keskihajonta, tehdään laaja testi käyttämällä 11-kohtaista 1:2-sarjalaimennosta alkaen suurimmasta liukenevasta pitoisuudesta.

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä on pisteitä, jotka ovat suurempia kuin keskiarvo plus kolme kertaa DMSO-kontrollin keskihajonta, laajan testin 11-kohtaisessa laimennusmallissa käytettävän aloituspitoisuuden on oltava yhden login korkeampi kuin pitoisuus, jolla annoksenmääritystestissä saatiin suurin mukautettu RLU-arvo. Yksitoistakohtainen laimennusmalli perustuu joko laimennussuhteisiin 1:2 tai 1:5 seuraavien perusteiden mukaisesti:

  On käytettävä 11-kohtaista sarjalaimennosta suhteessa 1:2, jos näin saatava pitoisuusalue kattaa vasteiden koko vaihteluvälin annoksenmääritystestissä laaditun pitoisuus-vastekäyrän perusteella. Muussa tapauksessa pitää käyttää laimennussuhdetta 1:5.

— Jos testikemikaalin pitoisuus-vastekäyrä annoksenmääritystestissä on kaksifaasinen, kumpikin faasi on tutkittava laajassa testissä.

30. Laajan ***antagonistitestin*** aloituspitoisuuksien määritys kuvataan perusteellisesti antagonistitestin protokollassa (7). Määritysperusteet ovat lyhyesti seuraavat:

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä ei ole pisteitä, jotka ovat pienempiä kuin keskiarvo miinus kolme kertaa E2:n keskihajonta, tehdään laaja kontrollitesti käyttämällä 11-kohtaista 1:2-sarjalaimennosta alkaen suurimmasta liukenevasta pitoisuudesta.

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä on pisteitä, jotka ovat pienempiä kuin keskiarvo miinus kolme kertaa E2-kontrollin keskihajonta, laajan testin 11-kohtaisessa laimennusmallissa käytettävän aloituspitoisuuden on oltava jokin seuraavista:

• pitoisuus, jolla saatiin pienin mukautettu RLU-arvo annoksenmääritystestissä

• suurin liukeneva pitoisuus (ks. antagonistitestin protokolla (7), kuva 14-2)

• pienin sytotoksinen pitoisuus (ks. antagonistitestin protokolla (7), esimerkki kuvassa 14-3).

— Yksitoistavaiheinen laimennusmalli perustuu joko suhteessa 1:2 tai 1:5 tehtävään sarjaan tai laimennukseen seuraavien perusteiden mukaisesti:

On käytettävä 11-kohtaista sarjalaimennosta suhteessa 1:2, jos näin saatava pitoisuusalue kattaa vasteiden koko vaihteluvälin annoksenmääritystestissä laaditun pitoisuus-vastekäyrän perusteella. Muussa tapauksessa pitää käyttää laimennussuhdetta 1:5.

Laajat testit

31. Laaja testi koostuu 11-kohtaisista sarjalaimennoksista (joko suhteessa 1:2 tai suhteessa 1:5 laajan testin kriteerien mukaisen aloituspitoisuuden perusteella), ja jokainen pitoisuus testataan kolmessa kuopassa 96-kuoppaisella levyllä (ks. kuvat 3 ja 4).

— Laajassa *agonistitestissä* käytetään E2:sta 11:tä pitoisuutta rinnakkaisnäytteinä vertailustandardina. Jokaiselle levylle sisällytetään neljä rinnakkaisnäytekuoppaa DMSO-kontrollille ja neljä rinnakkaisnäytekuoppaa metoksikloorikontrollille ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Laajassa antagonistitestissä käytetään yhdeksää pitoisuutta Ral:ia/E2:ta sekä $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2:ta vertailustandardina (kaksi rinnakkaisnäytettä). Neljään rinnakkaisnäytekuoppaan laitetaan $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2-kontrollia, neljään rinnakkaisnäytekuoppaan DMSO-kontrollit ja neljään rinnakkaisnäytekuoppaan $3{,}36 \times 10^{-6}$M tamoksifeenia.

Kuva 3

Laaja agonistitesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	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	KK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	KK
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meto
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meto
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meto
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meto

Lyhenteet: TC1-1–TC1-11 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); TC2-1–TC2-11 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); E2-1–E2-11 = E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienempään); meto = p,p' metoksikloori, heikko positiivinen kontrolli; KK = DMSO (1 % v/v) EFM -kantaja-ainekontrolli

Kuva 4

Laaja antagonistitesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	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	KK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	KK
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Lyhenteet: E2 = E2-kontrolli; Ral-1–Ral-9 = raloksifeeni-/E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); tam = tamoksifeeni/E2, heikko positiivinen kontrolli; TC1-1–TC1-11 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (TC1) (suurimmasta pienimpään); TC2-1– TC2-11 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (TC2) (suurimmasta pienimpään); KK = kantaja-ainekontrolli (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Huomautus: Kuten edellä on mainittu, kaikki vertailu- ja testikuopat sisältävät kiinteän pitoisuuden E2:ta (9,18 x 10–11 M).

32. Laajojen testien toistot samasta kemikaalista on tehtävä eri päivinä, jotta varmistetaan testien riippumattomuus. Laajoja testejä on tehtävä vähintään kaksi. Jos testien tulokset ovat ristiriitaiset (ts. toinen on positiivinen, toinen negatiivinen) tai jos jokin testeistä on puutteellinen, on tehtävä kolmas testi.

Luminesenssin mittaaminen

33. Luminesenssia mitataan 300–650 nm:n alueella käyttäen injektoivaa luminometriä ja ohjelmaa, joka säätelee injektiotilavuutta ja mittausväliä (7). Jokaisen kuopan valoemissio ilmoitetaan myös RLU:na kuoppaa kohti.

AINEISTON ANALYSOINTI

EC_{50}-/IC_{50}-arvojen määritys

34. EC_{50}-arvo (puolet testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta [agonistit]) ja IC_{50}-arvo (puolet testikemikaalin suurimmasta estävästä pitoisuudesta [antagonistit]) määritetään pitoisuus-vastetiedoista. Jos testikemikaali on positiivinen yhtenä tai useampana pitoisuutena, testikemikaalin se pitoisuus, joka aiheuttaa puolet suurimmasta vasteesta (IC_{50} tai EC_{50}), lasketaan käyttämällä Hillin funktioanalyysia tai sopivaa vaihtoehtoa. Hillin funktio on neljään parametriin perustuva logistinen matemaattinen malli, jolla testikemikaalin pitoisuus liitetään vasteeseen (yleensä S-kirjaimen muotoisella käyrällä) alla olevalla yhtälöllä:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}$$

Jossa:

Y = vaste (ts. RLU-arvot)

X = pitoisuuden logaritmi

Bottom = minimivaste

Top = maksimivaste

lg EC_{50} (tai lg IC_{50}) = X:n logaritmi vasteen keskikohtana ylimmän ja alimman välissä

Hillslope = käyrän kaltevuus.

Mallilla lasketaan paras sovitus parametreille top, bottom, hillslope sekä IC_{50} ja EC_{50}. EC_{50}- ja IC_{50}-arvojen laskemisessa on käytettävä asianmukaista tilasto-ohjelmaa (esimerkiksi Graphpad Prism^{R} -tilasto-ohjelmaa).

Poikkeamien määritys

35. Tilastollisen analyysin laatua voidaan parantaa sisällyttämällä siihen (esimerkiksi) Q-testi (ks. agonisti- ja antagonistitestien protokollat (7)). Sillä voidaan määrittää ”käyttämättömät” kuopat, jotka suljetaan pois aineiston analyysista.

36. E2-vertailustandardin rinnakkaisnäytteiden (otoksen koko on kaksi) osalta rinnakkaisnäytteen mukautettu RLU-arvo E2:n tietyn pitoisuuden yhteydessä katsotaan poikkeamaksi, jos sen arvo on yli 20 prosenttia suurempi tai pienempi kuin kyseisen pitoisuuden mukautettu RLU-arvo aikaisemmassa tietokannassa.

Luminometritietojen kerääminen ja mukauttaminen annoksenmääritystestissä

37. Luminometrin raakatiedot on siirrettävä testiä varten laadittuun taulukkolaskentamalliin. Lisäksi on selvitettävä, onko sellaisia poikkeavia datapisteitä, jotka on poistettava. (Ks. testin hyväksymisperusteista parametrit, jotka määritetään analyyseissa.) Seuraavat laskelmat on tehtävä:

Agonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin (KK) keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (E2) keskimääräinen induktiokerroin.

Vaihe 4 Laske testikemikaalien keskimääräinen EC_{50}-arvo.

Antagonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (Ral/E2) keskimääräinen pelkistyskerroin.

Vaihe 4 Laske E2-vertailustandardin keskiarvo.

Vaihe 5 Laske testikemikaalien keskimääräinen IC50-arvo.

Luminometritietojen kerääminen ja mukauttaminen laajassa testissä

38. Luminometrin raakatiedot on siirrettävä testiä varten laadittuun taulukkolaskentamalliin. Lisäksi on selvitettävä, onko sellaisia poikkeavia datapisteitä, jotka on poistettava. (Ks. testin hyväksymisperusteista parametrit, jotka määritetään analyyseissa.) Seuraavat laskelmat on tehtävä:

Agonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (E2) keskimääräinen induktiokerroin.

Vaihe 4 Laske E2:n ja testikemikaalien keskimääräinen EC_{50}-arvo.

Vaihe 5 Laske metoksikloorin keskimääräinen mukautettu RLU-arvo.

Antagonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (Ral/E2) keskimääräinen induktiokerroin.

Vaihe 4 Laske Ral:n/E2:n ja testikemikaalien keskimääräinen IC_{50}-arvo.

Vaihe 5 Laske tamoksifeenin keskimääräinen mukautettu RLU-arvo.

Vaihe 6 Laske E2-vertailustandardin keskiarvo.

Aineiston tulkintaperusteet

39. VM7Luc ER TA -testi on tarkoitettu näyttöön perustuvan toimintatavan osaksi, kun tavoitteena on auttaa asettamaan aineita tärkeysjärjestykseen hormonaalisten haitta-aineiden *in vivo* -testausta varten. Yksi tämän priorisointimenettelyn osa on testikemikaalin luokittelu positiiviseksi tai negatiiviseksi joko estrogeenireseptorin agonistisen tai antagonistisen vaikutuksen osalta. VM7Luc ER TA -testin validointitutkimuksessa käytetyt positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1

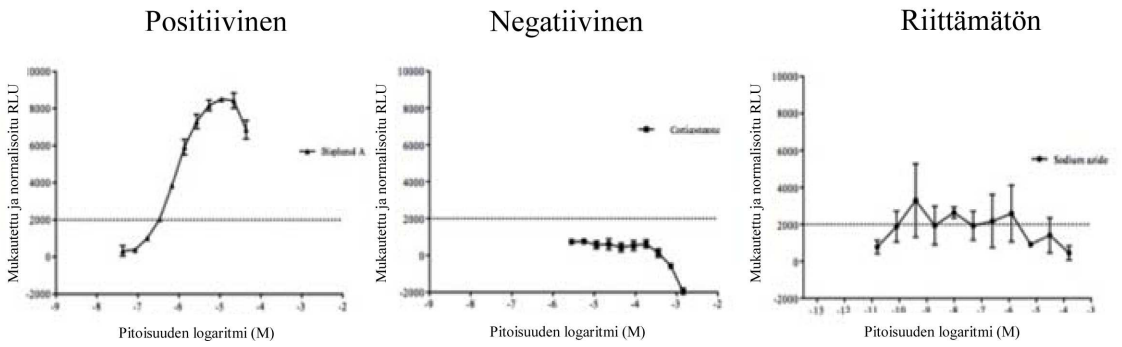
Positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet

AGONISTINEN VAIKUTUS	
Positiivinen	— Kaikilla testikemikaaleilla, jotka luokitellaan positiivisiksi estrogeenireseptorin agonistisen vaikutuksen osalta, on oltava pitoisuus-vastekäyrä, jossa on peruslinja ja nouseva suora ja joka päättyy tasanteeseen tai huippuun. Joissakin tapauksissa vain kaksi näistä ominaisuuksista (peruslinja-nouseva suora tai nouseva suora-huippu) voidaan määrittää. — Nousevan suoran määrittävällä viivalla pitää olla vähintään kolmessa pisteessä ei-päällekkäiset virhepalkit (keskiarvo ± SD). Peruslinjan muodostavat pisteet suljetaan pois, mutta käyrän lineaariseen osuuteen voi sisältyä huippu tai tasanteen ensimmäinen piste. — Positiivinen luokitus edellyttää, että vasteen amplitudi (peruslinjan ja huipun välinen ero) on vähintään 20 prosenttia vertailustandardin (E2:n) enimmäisarvosta (ts. vähintään 2 000 RLU:ta, kun vertailustandardin [E2] suurin vastearvo mukautetaan 10 000 RLU:hun). — Mikäli mahdollista, jokaisesta positiivisesta testikemikaalista tulisi laskea EC_{50}-arvo.
Negatiivinen	Keskimääräinen mukautettu RLU on tietyn pitoisuuden osalta yhtä suuri tai pienempi kuin DMSO-kontrollin keskimääräinen RLU-arvo plus kolme kertaa DMSO:n RLU-arvon keskihajonta.
Puutteellinen	Aineistoa, jota ei voida pitää validina osoittamaan sen paremmin vaikutusta kuin sen puuttumistakaan huomattavien laadullisten tai määrällisten rajoitusten vuoksi, pidetään puutteellisena, eikä sitä voida käyttää määritettäessä, onko testikemikaali positiivinen vai negatiivinen. Kemikaalit on testattava uudelleen.
ANTAGONISTINEN VAIKUTUS	
Positiivinen	— Testikemikaalin tiedot tuottavat pitoisuus-vastekäyrän, jossa on peruslinjan jälkeen laskeva suora. — Laskevan suoran määrittävällä viivalla pitää olla vähintään kolmessa pisteessä ei-päällekkäiset virhepalkit; peruslinjan muodostavat pisteet suljetaan pois, mutta käyrän lineaariseen osuuteen voi sisältyä tasanteen ensimmäinen piste. — Vaikutuksen on oltava vähintään 20 prosenttia pienempi kuin vertailustandardin (Ral/E2) enimmäisarvo (ts. 8 000 RLU:ta tai vähemmän, kun vertailustandardin [Ral/E2] suurin vastearvo mukautetaan 10 000 RLU:hun). — Testikemikaalin suurimpien ei-sytotoksisten pitoisuuksien on oltava enintään $1x10^{-5}$ M. — Mikäli mahdollista, jokaisesta positiivisesta testikemikaalista tulisi laskea IC_{50}-arvo.
Negatiivinen	Kaikki datapisteet ovat EC_{80}-arvon yläpuolella (80 prosenttia E2-vasteesta tai 8 000 RLU:ta) pitoisuuksina, jotka ovat alle $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Puutteellinen	Aineistoa, jota ei voida pitää validina osoittamaan sen paremmin vaikutusta kuin sen puuttumistakaan huomattavien laadullisten tai määrällisten rajoitusten vuoksi, pidetään puutteellisena, eikä sitä voida käyttää määritettäessä, onko testikemikaali positiivinen vai negatiivinen. Kemikaali on testattava uudelleen.

40. Positiivisia tuloksia luonnehditaan sekä vaikutuksen suuruusluokalla että sillä pitoisuudella, jolla vaikutus ilmaantuu, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista, negatiivisista ja puutteellisista tiedoista on kuvissa 5 ja 6.

Kuva 5

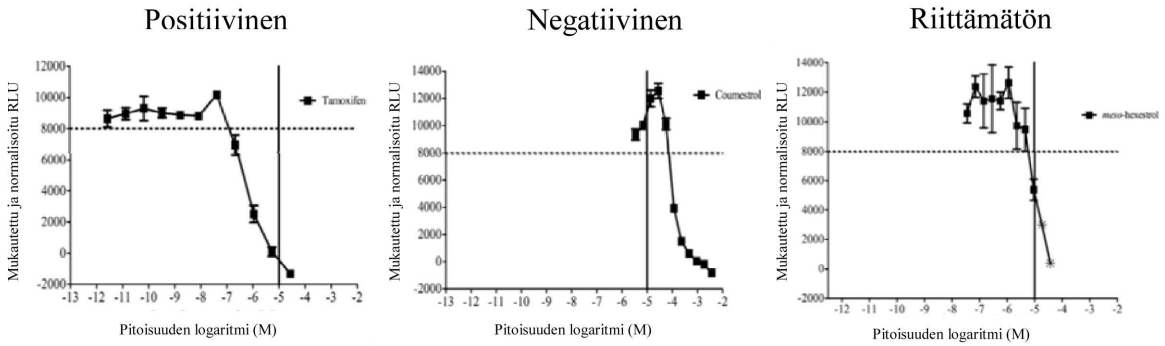
Esimerkkejä agonisteista: positiivisia, negatiivisia ja puutteellisia tietoja



Katkoviivan merkitys: 20 prosenttia E2-vasteesta, 2 000 mukautettua ja normalisoitua RLU:ta.

Kuva 6

Esimerkkejä antagonisteista: positiivisia, negatiivisia ja puutteellisia tietoja



Katkoviivan merkitys: 80 prosenttia Ral/E2-vasteesta, 8 000 mukautettua ja normalisoitua RLU:ta.

Kiinteä viiva tarkoittaa arvoa 1,00 x 10-5 M. Jotta vaste katsottaisiin positiiviseksi, sen on oltava 8 000 RLU:n viivan alapuolella ja pitoisuuksien on oltava alle 1,00 x 10-5M.

Tähdellä merkityt pitoisuudet meso-heksestrolikaaviossa tarkoittavat elinkykypisteitä ”2” tai enemmän.

Meso-heksestrolin testituloksia pidetään puutteellisina, koska ainoa vaste, joka on alle 8 000 RLU:ta, ilmaantui pitoisuudella 1,00 x 10-5M.

41. EC_{50}- ja IC_{50}-arvot voidaan laskea käyttämällä neljään parametriin perustuvaa Hillin funktiota (ks. tarkempia tietoja agonistitestin ja antagonistitestin protokollista (7)). Hyväksymisperusteiden täyttyminen tarkoittaa, että järjestelmä toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että tietty testiajo tuottaisi tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testiajon tulosten toistuvuus on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa (ks. ER TA -TESTIN OSAT -luvun 19 kohta).

TESTIRAPORTTI

42. Katso ”ER TA -TESTIN OSAT” -luvun 20 kohta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): s. 270–273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: s. 261–287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67–82.

(9) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol 71(10), s. 1459–69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology, 17(6):646–57.

(11) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4252–63.

(12) Geisinger, *et al*. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(13) Baldwin, *et al*. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(14) Li, Y., *et al*. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072–2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67–82.

Lisäys 4

ESTROGEENI-A:N TRANSAKTIVAATIOTESTI, JOSSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA, KEMIKAALIEN ESTROGEENIRESEPTORIIN KOHDISTUVAN AGONISTISEN JA ANTAGONISTISEN VAIKUTUKSEN HAVAITSEMISEKSI ERA CALUX -SOLULINJAA KÄYTTÄEN

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. ERα CALUX -transaktivaatiotestissä käytetään ihmisen U2OS-solulinjaa ihmisen estrogeenireseptori alfan (hERα) välittämän agonistisen ja antagonistisen vaikutuksen havaitsemiseksi. Pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan ERα CALUX -biotestin validointitutkimus, jonka teki BioDetection Systems BV (Amsterdam, Alankomaat), osoitti, että testi on merkityksellinen ja luotettava aiotussa käyttötarkoituksessaan (1). ERα CALUX -solulinja ilmentää vain pysyvästi transfektoitua ERα-reseptoria (2) (3).

2. Tämä testi on kehitetty nimenomaan hERα-välitteisen transaktivaation havaitsemiseen; päätetapahtumana mitataan bioluminesenssia. Bioluminesenssia käytetään biotesteissä yleisesti sen erittäin hyvän signaali-kohinasuhteen vuoksi (4).

3. Yli 1 µM:n suuruisten fytoestrogeenipitoisuuksien on ilmoitettu yliaktivoivan lusiferaasireportterigeenin, mistä seuraa ei-reseptorivälitteinen luminesenssi (5) (6) (7). Näin ollen suuremmat pitoisuudet fytoestrogeeneja tai muita samanlaisia yhdisteitä, jotka voivat yliaktivoida lusiferaasin ilmentymisen, on tutkittava huolellisesti pysyvästi estrogeenireseptorin transaktivaatiotesteissä, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja (ks. lisäys 2).

4. Kohdat ”YLEISJOHDANTO” JA ”ER TA -TESTIN OSAT” on luettava, ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Biotestiä käytetään arvioitaessa ligandin sitoutumista estrogeenireseptoriin ja sitä seuraavaa reseptori-ligandikompleksin siirtymistä tumaan. Tumassa reseptori-ligandikompleksi sitoutuu tiettyihin DNA:n responssielementteihin ja transaktivoi tulikärpäsen lusiferaasigeenin, jolloin lusiferaasientsyymin solunsisäinen ilmentyminen lisääntyy. Lusiferiininimisen lusiferaasisubstraatin lisäämisen jälkeen lusiferiini muuntuu bioluminesoivaksi tuotteeksi. Tuotettu valo voidaan havaita ja kvantifioida helposti luminometrillä.

6. Testijärjestelmässä käytetään pysyvästi transfektoituja ERα CALUX -soluja. ERα CALUX -solut ovat peräisin ihmisen osteoblastisen osteosarkooman U2OS-solulinjasta. Ihmisen U2OS-soluja transfektoitiin pysyvästi 3xHRE-TATA-Luc:n ja pSG5-neo-hERα:n kanssa kalsiumfosfaatin yhteissaostus -menetelmää käyttäen. U2OS-solulinjan katsottiin olevan paras vaihtoehto estrogeenille (ja muille steroidihormoneille) herkäksi reportterisolulinjaksi, sillä U2OS-solulinjassa todettiin olevan vain vähän endogeenista reseptoriaktiivisuutta tai sitä ei ollut lainkaan. Endogeenisten reseptoreiden puuttumista selvitettiin käyttämällä ainoastaan lusiferaasireportteriplasmideja, joissa ei havaittu aktiivisuutta reseptorin ligandien lisäämisen jälkeen. Lisäksi tämä solulinja tuki voimakkaita hormonivälitteisiä vasteita, kun siihen lisättiin sukulaisreseptoreita tilapäisesti (2) (3) (8).

7. Kemikaalien estrogeenisen tai antiestrogeenisen vaikutuksen testaaminen ERα CALUX -solulinjalla sisältää esiseulonta-ajon ja laajoja ajoja. Esiseulonta-ajossa määritetään testikemikaalien liukoisuus, sytotoksisuus ja tarkempi pitoisuusalue laajaa testiä varten. Laajojen ajojen aikana testikemikaalien tarkennettuja pitoisuusalueita testataan ERα CALUX -biotesteillä, ja sen jälkeen testikemikaalit luokitellaan joko agonistisesti tai antagonisesti vaikuttaviksi.

8. Aineiston tulkintaperusteet on kuvattu yksityiskohtaisesti 59 kohdassa. Testikemikaalia pidetään agonismin kannalta positiivisena, jos vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta antaa vasteen, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 10 prosenttia vertailustandardi 17â-estradiolin suurimmasta vasteesta (PC_{10}). Testikemikaalia pidetään antagonismin kannalta positiivisena, jos vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta antaa vasteen, joka on yhtä suuri tai pienempi kuin 80 prosenttia vertailustandardi tamoksifeenin suurimmasta vasteesta (PC_{80}).

MENETTELY

Solulinjat

9. Testissä on käytettävä U2OS ERα CALUX -solulinjaa, jossa on pysyvästi transfektoituja soluja. Solulinjan voi hankkia BioDetection Systems BV:ltä (Amsterdam, Alankomaat) teknisellä lisenssisopimuksella.

10. Vain mykoplasmattomia soluviljelmiä tulisi käyttää. Käytettävissä soluerissä on joko oltava todistus siitä, että ne ovat mykoplasmakontaminaation osalta negatiivisia, tai niille on tehtävä mykoplasmatesti ennen käyttöä. Suositeltava menetelmä on RT-PCR (reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio), koska sillä mykoplasmainfektio havaitaan herkästi (9).

Solulinjan stabiilisuus

11. Jotta CALUX-solut säilyvät stabiileina ja ehyinä, niitä on säilytettävä nestemäisessä typessä (-80 °C). Kun solut on sulatettu uutta viljelmää varten, niitä on jatkoviljeltävä vähintään kahdesti, ennen kuin niitä käytetään kemikaalien estrogeeniagonistisen ja -antagonistisen vaikutuksen arvioinnissa. Soluja ei kuitenkaan tule kasvattaa yli 30:tä siirrostusta.

12. Jotta solulinjan stabiilisuutta voidaan valvoa pidemmällä aikavälillä, agonistisen ja antagonistisen testijärjestelmän herkkyys on varmennettava tarkistamalla vertailustandardin EC_{50}- tai IC_{50}-arvot. Lisäksi on seurattava positiivisen kontrollinäytteen ja negatiivisen kontrollinäytteen suhteellista induktiota. Tulosten on oltava ERα CALUX -biotestin agonistiosaa (taulukko 3C) tai antagonistiosaa (taulukko 4 C) koskevien hyväksymisperusteiden mukaiset. Agonistivaikutuksen osalta vertailustandardit sekä positiiviset ja negatiiviset kontrollit on esitetty taulukossa 1 ja antagonistivaikutuksen osalta taulukossa 2.

Soluviljelmä ja maljausolot

13. U2OS-solut on viljeltävä kasvatusaineessa (DMEM/F12 (1:1) -aine, jossa pH-indikaattorina on fenolipunainen, täydennettynä naudan sikiön verestä valmistetulla seerumilla (7,5 %), ei-välttämättömillä aminohapoilla (1 %) sekä penisilliinillä, streptomysiinillä ja genetisiinillä (G-418) valintamarkkerina (10 yksikköä/ml). Solut on laitettava hiilidioksidi-inkubaattoriin (5 % CO_2), ja lämpötilan pitää olla 37 °C ja ilmankosteuden 100 %. Kun solut saavuttavat 85–95 prosentin konfluenssin, ne on joko jatkoviljeltävä tai valmisteltava istutettaviksi 96-kuoppaisiin mikrotiitterilevyihin. Viime mainittujen osalta solut on uudelleensuspendoitava (1×10^5 solua/ml) estrogeenittomaan kasvatusaineeseen (DMEM/F12 (1:1) -aine ilman fenolipunaista, täydennettynä dekstraanilla päällystetyllä hiilellä käsitellyllä naudan sikiön verestä valmistetulla seerumilla (5 % v/v), ei-välttämättömillä aminohapoilla (1 % v/v) sekä penisilliinillä ja streptomysiinillä (10 yksikköä/ml) ja laitettava 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn kuoppiin (100 µl homogenisoitua solususpensiota). Soluja on esi-inkuboitava hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO_2, 37^0C, ilmankosteus 100 %) 24 tunnin ajan ennen altistusta. Muoviesineiden pitää olla estrogeenittomia.

Hyväksymisperusteet

14. Testikemikaali(e)n agonistiset ja antagonistiset vaikutukset testataan testisarjoissa. Yksi testisarja koostuu enintään kuudesta mikrotiitterilevystä. Kukin testisarja sisältää vähintään yhden täyden sarjan laimennoksia vertailustandardista, positiivisen kontrollinäytteen, negatiivisen kontrollinäytteen ja liuotinkontrollit. Kuvissa 1 ja 2 näytetään levyn järjestys agonisti- ja antagonistitestisarjoissa.

15. Jokainen vertailustandardin laimennos, testikemikaalit, kaikki liuotinkontrollit sekä positiiviset ja negatiiviset kontrollit on analysoitava kolmena rinnakkaisnäytteenä. Kunkin kolmesta analyysista on täytettävä taulukossa 3A ja taulukossa 4A esitetyt vaatimukset.

16. Kokonainen sarja laimennoksia vertailustandardista (agonistitestissä 17β-estradioli; antagonistitestissä tamoksifeeni) mitataan kunkin testisarjan ensimmäiseltä levyltä. Jotta voidaan vertailla viiden muun mikrotiitterilevyn analyysituloksia ensimmäiseen mikrotiitterilevyyn, joka sisältää vertailustandardin koko pitoisuus-vastekäyrän, kaikilla levyillä on oltava kolme kontrollinäytettä: liuotinkontrolli, vertailustandardin suurin testattu pitoisuus ja vertailustandardin likimääräinen EC_{50}-pitoisuus (agonismi) tai IC_{50}-pitoisuus (antagonismi). Ensimmäisen levyn ja viiden muun levyn kontrollinäytteiden keskiarvon välisen suhteen on täytettävä taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

17. Jokaisesta testisarjan mikrotiitterilevystä lasketaan z-kerroin (10). Z-kerroin on laskettava käyttämällä vertailustandardin suurimpaan ja pienimpään pitoisuuteen liittyviä vasteita. Mikrotiitterilevyä pidetään validina, jos se täyttää taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

18. Vertailustandardin annos-vastekäyrän on oltava S-kirjaimen muotoinen. Vertailustandardin sarjalaimennoksiin aiheutuneesta vasteesta johdettujen EC_{50}- tai IC_{50}-arvon on täytettävä taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

19. Jokaisessa testisarjassa on oltava positiivinen ja negatiivinen kontrollinäyte. Sekä positiivisen että negatiivisen kontrollinäytteen lasketun suhteellisen induktion on täytettävä taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

20. Kaikissa mittauksissa vertailustandardin suurimman pitoisuuden induktiokerroin on mitattava jakamalla keskimäärin suurin 17β-estradioli-vertailustandardin suhteellinen valoyksikkö (RLU) -vaste vertailuliuotinkontrollin RLU-vasteen keskiarvolla. Tämän induktiokertoimen on täytettävä sitä koskevat vähimmäisvaatimukset, jotka on esitetty taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti).

21. Vain edellä mainitut hyväksymisperusteet täyttävät mikrotiitterilevyt katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa.

22. Hyväksymisperusteita sovelletaan sekä esiseulonta-ajoihin että laajoihin ajoihin.

Taulukko 1

Vertailustandardin, positiivisen kontrollin ja negatiivisen kontrollin pitoisuudet agonistisessa CALUX-biotestissä

	Aine	CAS-nro	Testipitoisuusalue (M)
Vertailustandardi	17ß-estradioli	50-28-2	$1*10^{-13}$ – $1*10^{-10}$
Positiivinen kontrolli (PK)	17α-metyylitestosteroni	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negatiivinen kontrolli (NK)	Kortikosteroni	50-22-6	$1*10^{-8}$

Taulukko 2

Vertailustandardin, positiivisen kontrollin ja negatiivisen kontrollin pitoisuudet antagonistisessa CALUX-biotestissä

	Aine	CAS-nro	Testipitoisuusalue (M)
Vertailustandardi	Tamoksifeeni	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-05}$
Positiivinen kontrolli (PK)	4-hydroksitamoksifeeni	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negatiivinen kontrolli (NK)	Resveratroli	501-36-0	$1*10^{-5}$

Taulukko 3

Agonistisen ERα CALUX -biotestin hyväksymisperusteet

A – yksittäiset näytteet levyllä		**Peruste**
1	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (NK, PK, testikemikaalin ja vertailustandardin kukin laimennos paitsi C0)	< 15 %
2	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (vertailustandardi ja testikemikaalin liuotinkontrollit (C0, LK))	< 30 %
3	LDH:n enimmäisvuoto sytotoksisuuden mittarina.	< 120 %
B – yhdellä mikrotiitterilevyllä		
4	Vertailustandardin liuotinkontrollin (C0; levy 1) ja testikemikaalin liuotinkontrollin (LK; levyt 2–x) suhde	0,5–2,0
5	Likim. EC50-arvon ja levyn 1 suurimpien vertailustandardipitoisuuksien sekä likim. EC50-arvon ja levyjen 2–x suurimpien vertailustandardipitoisuuksien (C4, C8) suhde	0,70–1,30
6	Z-kerroin kullekin levylle	> 0,6
C – yhdessä analyysisarjassa (kaikki levyt yhdessä sarjassa)		
7	Vertailustandardin S-käyrä	Kyllä (17ß-estradioli)
8	EC50-alue, vertailustandardi 17ß-estradioli	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Suurimman 17ß-estradiolipitoisuuden pienin induktiokerroin vertailustandardin liuotinkontrolliin nähden.	5
10	Suhteellinen induktio (%), PK	> 30 %
11	Suhteellinen induktio (%), NK	< 10 %

Likim.: likimääräinen; PK: positiivinen kontrolli; NK: negatiivinen kontrolli; LK: testikemikaalin liuotinkontrolli; C0: vertailustandardin liuotinkontrolli; SD: keskihajonta; LDH: laktaattidehydrogenaasi.

Taulukko 4

Antagonistisen ERα CALUX -biotestin hyväksymisperusteet

A – yksittäiset näytteet levyllä		**Peruste**
1	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (NK, PK, testikemikaalin ja vertailustandardin kukin laimennos, liuotinkontrolli (C0))	< 15 %
2	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (kantaja-ainekontrollista (KK) ja suurimmasta vertailustandardipitoisuudesta (C8))	< 30 %
3	LDH:n enimmäisvuoto sytotoksisuuden mittarina.	< 120 %
B – yhdellä mikrotiitterilevyllä		
4	Vertailustandardin liuotinkontrollin (C0; levy 1) ja testikemikaalin liuotinkontrollin (LK; levyt 2–x) suhde	0,70–1,30
5	Levyn 1 likim. IC50-vertailustandardipitoisuuksien sekä levyjen 2–x likim. IC50-vertailustandardipitoisuuksien (C4) suhde	0,70–1,30
6	Levyn 1 suurimpien vertailustandardipitoisuuksien ja levyjen 2–x suurimpien vertailustandardipitoisuuksien (C8) suhde	0,50–2,0
7	Z-kerroin kullekin levylle	> 0,6
C – yhdessä analyysisarjassa (kaikki levyt yhdessä sarjassa)		
8	Vertailustandardin S-käyrä	Kyllä (tamoksifeeni)
9	IC50-alue, vertailustandardi (tamoksifeeni)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Vertailustandardin liuotinkontrollin pienin induktiokerroin suurimpaan tamoksifeenipitoisuuteen nähden.	2,5
11	Suhteellinen induktio (%), PK	< 70 %
12	Suhteellinen induktio (%), NK	> 85 %

Likim.: likimääräinen; PK: positiivinen kontrolli; NK: negatiivinen kontrolli; KK: kantaja-ainekontrolli (liuotinkontrolli ilman kiinteää pitoisuutta agonistista vertailustandardia); LK: testikemikaalin liuotinkontrolli; C0: vertailustandardin liuotinkontrolli; SD: keskihajonta; LDH: laktaattidehydrogenaasi.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli, vertailustandardit, positiiviset kontrollit, negatiiviset kontrollit

23. Esiseulonta-ajossa ja laajassa ajoissa on käytettävä samaa liuotin-/kantaja-ainekontrollia, vertailustandardeja, positiivisia kontrolleja ja negatiivisia kontrolleja. Lisäksi vertailustandardien sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollien pitoisuus tulee olla sama.

Liuotinkontrolli

24. Liuotin, jota on käytetty testikemikaalien liuottamiseen, on testattava liuotinkontrollina. ERα CALUX -biotestin validoinnissa käytettiin kantaja-aineena dimetyylisulfoksidia (DMSO, 1 % (v/v); CAS-nro 67-68-5). Jos käytetään muuta liuotinta kuin DMSO:ta, kaikki vertailustandardit, kontrollit ja testikemikaalit on testattava samassa kantaja-aineessa. On huomattava, että antagonistitutkimuksen liuotinkontrolli sisältää kiinteän pitoisuuden agonistivertailustandardia (17β-estradioli) (suurin piirtein EC_{50}-pitoisuus). Antagonistitutkimuksessa käytettävän liuottimen testaamiseksi on valmistettava ja testattava kantaja-ainekontrolli.

Kantaja-ainekontrolli (antagonistitesti)

25. Antagonistitutkimuksen testiliuosta täydennetään kiinteällä pitoisuudella agonistivertailustandardia (17β-estradioli) (suurin piirtein EC_{50}-pitoisuus). Kun halutaan testata antagonistitutkimuksessa testikemikaalien liuottamiseksi käytettävää liuotinta, on valmistettava testiliuos, joka ei sisällä kiinteää pitoisuutta agonistivertailustandardia (17β-estradioli). Tämä kontrollinäyte on tarkoitettu kantaja-ainekontrolliksi. ERα CALUX -biotestin validoinnissa käytettiin kantaja-aineena dimetyylisulfoksidia (DMSO, 1 % (v/v); CAS-nro 67-68-5). Jos käytetään muuta liuotinta kuin DMSO:ta, kaikki vertailustandardit, kontrollit ja testikemikaalit on testattava samassa kantaja-aineessa.

Vertailustandardit

26. Agonistivertailustandardi on 17β-estradioli (taulukko 1). Vertailustandardit koostuvat sarjasta 17β-estradiolin kahdeksan pitoisuuden laimennoksia ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Antagonistivertailustandardi on tamoksifeeni (taulukko 2). Vertailustandardit koostuvat sarjasta tamoksifeenin kahdeksan pitoisuuden laimennoksia ($3*10^{-09}$, $1*10^{-08}$, $3*10^{-08}$, $1*10^{-07}$, $3*10^{-07}$, $1*10^{-06}$, $3*10^{-06}$, $1*10^{-05}$ M). Jokainen antagonistivertailustandardin pitoisuus inkuboidaan yhdessä agonistivertailustandardin, 17β-estradiolin, kiinteän pitoisuuden kanssa ($3*10^{-12}$ M).

Positiivinen kontrolli

28. Agonistitutkimuksessa positiivisena kontrollina on 17α-metyylitestosteroni (taulukko 1).

29. Antagonistitutkimuksessa positiivisena kontrollina on 4-hydroksitamoksifeeni (taulukko 2). Antagonistinen positiivinen kontrolli inkuboidaan yhdessä agonistivertailustandardin, 17β-estradiolin, kiinteän pitoisuuden kanssa ($3*10^{-12}$ M).

Negatiivinen kontrolli

30. Agonistitutkimuksessa negatiivisena kontrollina on kortikosteroni (taulukko 1).

31. Antagonistitutkimuksessa negatiivisena kontrollina on resveratroli (taulukko 2). Antagonistinen negatiivinen kontrolli inkuboidaan yhdessä agonistivertailustandardin, 17β-estradiolin, kiinteän pitoisuuden kanssa ($3*10^{-12}$ M).

Laboratorion pätevyyden osoittaminen (ks. 14 kohta sekä taulukot 3 ja 4 tämän testimenetelmän kohdassa ER TA -TESTIN OSAT).

Kantaja-aine

32. Testikemikaalien liuottamisessa käytetyn liuottimen pitäisi liuottaa testikemikaali kokonaan, ja sen täytyy olla sekoitettavissa solujen kasvatusaineeseen. Sopivia liuottimia ovat DMSO, vesi ja etanoli (puhtaus 95–100 %). Jos liuottimena käytetään DMSO:ta, sen enimmäispitoisuus inkuboinnin aikana saa olla 1 % (v/v). Ennen liuottimen käyttöä on varmistettava testaamalla, ettei se ole sytotoksinen ja ettei se häiritse testin tekemistä.

Vertailustandardien, positiivisten ja negatiivisten kontrollien sekä testikemikaalien valmistelu

33. Vertailustandardit, positiiviset ja negatiiviset kontrollit sekä testikemikaalit liuotetaan 100-prosenttiseen DMSO:hon (tai muuhun asianmukaiseen liuottimeen). Asianmukaiset (sarja)laimennokset on valmistettava samalla liuottimella. Ennen liuottamista kaikkien aineiden on annettava tasapainottua huoneenlämpötilassa. Tuoreissa vertailustandardien, positiivisten ja negatiivisten kontrollien sekä testikemikaalien kantaliuoksissa ei saa olla huomattavaa saostumista tai sameutta. Vertailustandardien ja kontrollien kantaliuokset voidaan valmistaa bulkkiliuoksina. Testikemikaaleista on valmistettava tuoreet kantaliuokset ennen kutakin koetta. Vertailustandardien, positiivisten ja negatiivisten kontrollien sekä testikemikaalien lopulliset laimennokset on valmistettava tuoreeltaan jokaiseen kokeeseen ja käytettävä 24 tunnin kuluessa valmistamisesta.

Liukoisuus, sytotoksisuus ja annoksenmääritys

34. Esiseulonta-ajossa määritetään testikemikaalien liukoisuus valitussa liuottimessa. Sitä varten valmistetaan kantaliuos, jonka enimmäiskonsentraatio on 0,1 M. Jos tämän pitoisuuden yhteydessä esiintyy liukoisuusongelmia, on valmistettava laimeampia kantaliuoksia, kunnes testikemikaalit liukenevat täysin. Esiseulonta-ajossa testataan 1:10-sarjalaimennoksia testikemikaalista. Agonisti- tai antagonistitestissä testin enimmäiskonsentraatio on 1 mM. Esiseulonnan perusteella testikemikaaleille johdetaan asianmukainen tarkennettu pitoisuusalue, joka on testattava laajojen ajojen aikana. Laajassa testauksessa käytettävien laimennosten tulee olla 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x ja 3000x.

35. Agonisti- ja antagonistitestiprotokollaan sisältyy sytotoksisuuden testaus (11). Se sisältyy myös sekä esiseulonta-ajoon että laajoihin ajoihin. ERα CALUX -biotestin validoinnin aikana sytotoksisuuden arvioimisessa käytetty menetelmä oli laktaattidehydrogenaasin (LDH:n) vuototesti yhdistettynä solujen laadulliseen silmämääräiseen tarkastukseen (ks. lisäys 4.1) testikemikaaleille altistamisen jälkeen. Myös muita sytotoksisuuden määrittämiseen tarkoitettuja kvantitatiivisia menetelmiä (esimerkiksi tetratsoliumpohjainen (MTT) kolorimetrinen menetelmä tai sytotoksisuuden CALUX-biotesti) voidaan käyttää. Yleensä testikemikaalipitoisuuksia, joiden yhteydessä solujen elinkyky pienenee yli 20 prosenttia, pidetään sytotoksisina, eikä niitä voida siksi käyttää aineiston analysoinnissa. LDH-vuototestin osalta testikemikaalin pitoisuutta pidetään sytotoksisena, jos LDH-vuoto on yli 120 prosenttia.

Testikemikaalille altistus ja testilevyn järjestäminen

36. Sen jälkeen, kun viljellyt solut on trypsinoitu konfluentista pullosta, ne uudelleensuspendoidaan tiheyteen 1×10^5 solua/ml estrogeenittomaan kasvatusliuokseen. 100 µl uudelleensuspendoituja soluja maljataan 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn sisempiin kuoppiin. Ulompiin kuoppiin laitetaan 200 µl fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS:ää) (ks. kuvat 1 ja 2). Maljattuja soluja esi-inkuboidaan hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO_2, 37°C, ilmankosteus 100 %) 24 tunnin ajan.

37. Esi-inkuboinnin jälkeen levyistä tutkitaan silminnähtävä sytotoksisuus (ks. lisäys 4.1), kontaminaatio ja konfluenssi. Testauksessa käytetään vain levyjä, joissa ei ole silminnähtävää sytotoksisuutta eikä kontaminaatiota ja joiden konfluenssi on vähintään 85 prosenttia. Sisempien kuoppien aine poistetaan varovasti ja sen tilalle laitetaan 200 µl estrogeenitonta testiliuosta, joka sisältää asianmukaiset laimennossarjat vertailustandardeista, testikemikaaleista, positiivisista ja negatiivisista kontrolleista sekä liuotinkontrolleista (taulukko 5: agonistitutkimukset; taulukko 6: antagonistitutkimukset). Kaikki vertailustandardit, testikemikaalit, positiiviset ja negatiiviset kontrollit sekäliuotinkontrollit

testataan kolmena rinnakkaisnäytteenä. Kuvassa 1 esitetään levyn järjestys agonistitestissä. Kuvassa 2 esitetään levyn järjestys antagonistitestissä. Levyn järjestys esiseulontatestissä ja laajassa testissä on sama. Antagonistitestissä kaikki sisemmät kuopat (paitsi kantaja-ainekontrollin kuopat) sisältävät myös kiinteän pitoisuuden agonistivertailustandardia, 17β-estradiolia ($3*10^{-12}$ M). Jokaiselle testikemikaalilevylle on lisättävä vertailustandardit C8 ja C4.

38. Kun solut on altistettu kaikille kemikaaleille, 96-kuoppaisia mikrotiitterilevyjä on inkuboitava toiset 24 tuntia hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO_2, 37°C, ilmankosteus 100 %).

Kuva 1

96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen järjestys esiseulonnassa ja agonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

Levy 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
E		LK	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
F		LK	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
G		LK	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
H												

Seuraavat levyt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
C		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
D		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
E		LK	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		LK	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		LK	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = vertailustandardiliuotin.

C(1–8) = vertailustandardin sarjalaimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan).

PK = positiivinen kontrolli.

NK = negatiivinen kontrolli.

TCx-(1–8) = testikemikaalin laimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan) esiseulonta-ajossa ja testikemikaalin x agonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

LK = testikemikaalin liuotinkontrolli (mieluiten sama liuotin kuin C0:ssa mutta mahdollisesti toisesta erästä).

Harmaat solut: = ulommat kuopat, joihin on laitettu 200 µl PBS:ää.

Kuva 2

96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen järjestys antagonistitestin esiseulonnassa ja antagonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

Levy 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	KK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	KK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	KK	
E		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
F		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
G		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
H												

Seuraavat levyt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (reals.)	
C		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (reals.)	
D		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (reals.)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (reals.)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (reals.)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (reals.)	
H												

C0 = vertailustandardiliuotin.

C(1–8) = vertailustandardin sarjalaimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan).

NK = negatiivinen kontrolli.

PK = positiivinen kontrolli.

TCx-(1–8) = testikemikaalin laimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan) esiseulonta-ajossa ja testikemikaalin x agonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

LK = testikemikaalin liuotinkontrolli (mieluiten sama liuotin kuin C0:ssa mutta mahdollisesti toisesta erästä).

KK = kantaja-ainekontrolli (liuotinkontrolli ilman kiinteää pitoisuutta agonistista vertailustandardia, 17β-estradiolia).

Harmaat solut: = ulommat kuopat, joihin on laitettu 200 µl PBS:ää.

Huom.: Kaikki sisemmät kuopat (paitsi kantaja-ainekontrollin kuopat) sisältävät myös kiinteän pitoisuuden agonistivertailustandardia, 17β-estradiolia ($3*10^{-12}$ M).

Luminesenssin mittaaminen

39. Luminesenssin mittaaminen kuvataan yksityiskohtaisesti agonisti- ja antagonistitestin protokollassa (10). Kuopissa oleva aine pitää poistaa, ja soluja on lyysattava inkubaation jälkeen 24 tunnin ajan, jotta solukalvo avautuu ja lusiferaasin aktiivisuus voidaan mitata.

40. Tässä menettelyssä luminesenssin mittaamiseen tarvitaan luminometri, jossa on kaksi injektoria. Lusiferaasireaktio aloitetaan injektoimalla lusiferiinisubstraatti. Reaktio pysäytetään lisäämällä 0,2 M NaOH:ta. Reaktio pysäytetään, jotta estetään luminesenssin siirtyminen yhdestä kuopasta toiseen.

41. Jokaisen kuopan valoemissio ilmoitetaan myös suhteellisina valoyksikköinä kuoppaa kohti.

Esiseulonta-ajo

42. Esiseulonnan analyysitulosten avulla määritetään testikemikaalien tarkennettu pitoisuusalue laajaan testiin. Esiseulonnan analyysitulosten arviointi ja testikemikaalien tarkennetun pitoisuusalueen määrittäminen laajaan testiin kuvataan perusteellisesti agonisti- ja antagonistitestin protokollassa (10). Tässä esitetään vain lyhyt yhteenveto menettelyistä, joilla määritetään testikemikaalien pitoisuusalue agonisti- ja antagonistitesteihin. Katso taulukoista 5 ja 6 ohjeet sarjalaimennuksesta.

Pitoisuuksien valinta agonististen vaikutusten arviointiin

43. Esiseulonta-ajossa on tarkoitus testata testikemikaalit käyttämällä sarjalaimennuksia taulukossa 5 (agonistitesti) ja taulukossa 6 (antagonistitesti) esitetyn mukaisesti. Kaikki pitoisuudet on testattava kolmessa kuopassa kuvassa 1 (agonistitesti) tai kuvassa 2 (antagonistitesti) esitetyn järjestyksen mukaisesti.

44. Vain analyysitulokset, jotka täyttävät hyväksymisperusteet (taulukko 3), katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa. Jos yksi tai useampi analyysisarjan mikrotiitterilevyistä ei täytä hyväksymisperusteita, kyseiset levyt on analysoitava uudelleen. Jos ensimmäinen levy, joka sisältää koko laimennossarjan vertailustandardista, ei täytä hyväksymisperusteita, koko testisarja (kuusi levyä) on analysoitava uudelleen.

45. Testikemikaalien alustavia pitoisuusalueita on mukautettava ja esiseulonta-ajo on toistettava, jos

— sytotoksisuutta havaitaan. Esiseulontamenettely on toistettava testikemikaalin pienemmillä pitoisuuksilla, jotka eivät ole sytotoksisia.

— testikemikaalin esiseulonnasta ei saada täydellistä annos-vastekäyrää, koska testatut pitoisuudet tuottavat maksimi-induktion. Esiseulonta-ajo on toistettava käyttämällä pienempiä pitoisuuksia testikemikaalista.

46. Kun havaitaan validi annokseen liittyvä vaste, on valittava (pienin) pitoisuus, jolla havaitaan maksimi-induktio ja jolla sytotoksisuutta ei ilmene. Laajoissa ajoissa testattavan testikemikaalin suurimman pitoisuuden tulee olla kolme kertaa tämä valittu pitoisuus.

47. Testikemikaalista on tehtävä täydellinen tarkennettu laimennussarja taulukossa 5 esitettyjen laimennusvaiheiden mukaisesti aloittaen suurimmalla pitoisuudella, kuten edellä on määritetty.

48. Testikemikaali, joka ei aiheuta agonistista vaikutusta, on testattava laajoissa ajoissa aloittamalla esiseulonnan aikana määritetystä suurimmasta ei-sytotoksisesta pitoisuudesta.

Pitoisuuksien valinta antagonististen vaikutusten arviointiin

49. Vain analyysitulokset, jotka täyttävät hyväksymisperusteet (taulukko 4), katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa. Jos yksi tai useampi analyysisarjan mikrotiitterilevyistä ei täytä hyväksymisperusteita, kyseiset levyt on analysoitava uudelleen. Jos ensimmäinen levy, joka sisältää koko laimennossarjan vertailustandardista, ei täytä hyväksymisperusteita, koko testisarja (kuusi levyä) on analysoitava uudelleen.

50. Testikemikaalien alustavia pitoisuusalueita on mukautettava ja esiseulonta-ajo on toistettava, jos

— sytotoksisuutta havaitaan. Esiseulontamenettely on toistettava testikemikaalin pienemmillä pitoisuuksilla, jotka eivät ole sytotoksisia.

— testikemikaalin esiseulonnasta ei saada täydellistä annos-vastekäyrää, koska testatut pitoisuudet tuottavat maksimi-inhibition. Esiseulonta on toistettava käyttämällä pienempiä pitoisuuksia testikemikaalista.

51. Kun todetaan validi annokseen liittyvä vaste, on valittava (pienin) pitoisuus, jolla havaitaan maksimi-inhibitio ja jolla sytotoksisuutta ei ilmene. Laajoissa ajoissa testattavan testikemikaalin suurimman pitoisuuden tulee olla kolme kertaa tämä valittu pitoisuus.

52. Testikemikaalista on tehtävä täydellinen tarkennettu laimennussarja taulukossa 6 esitettyjen laimennusvaiheiden mukaisesti aloittaen suurimmalla pitoisuudella, kuten edellä on määritetty.

53. Testikemikaalit, jotka eivät aiheuta antagonistista vaikutusta, on testattava laajoissa ajoissa aloittamalla esiseulonnan aikana testatusta suurimmasta ei-sytotoksisesta pitoisuudesta.

Laajat ajot

54. Kun tarkennetut pitoisuusalueet on valittu, testikemikaalit on testattava perusteellisesti käyttämällä sarjalaimennuksia taulukossa 5 (agonistitesti) ja taulukossa 6 (antagonistitesti) esitetyn mukaisesti. Kaikki pitoisuudet on testattava kolmessa kuopassa kuvassa 1 (agonistitesti) tai kuvassa 2 (antagonistitesti) esitetyn järjestyksen mukaisesti.

55. Vain analyysitulokset, jotka täyttävät hyväksymisperusteet (taulukot 3 ja 4), katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa. Jos yksi tai useampi analyysisarjan mikrotiitterilevyistä ei täytä hyväksymisperusteita, kyseiset levyt on analysoitava uudelleen. Jos ensimmäinen levy, joka sisältää koko laimennossarjan vertailustandardista, ei täytä hyväksymisperusteita, koko testisarja (kuusi levyä) on analysoitava uudelleen.

Taulukko 5

Agonistitestissä käytettyjen vertailustandardien, kontrollien ja testikemikaalien pitoisuus ja laimennokset

Vertailus. 17β-estradioli		TCx - esiseulonta-ajo		TCx - laaja ajo		Kontrollit	
conc. (M)		Laimennus		Laimennus		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$3*10^{-06}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NK	$1*10^{-08}$
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	LK	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 – testikemikaali x
PK – positiivinen kontrolli (17α-metyylitestosteroni)
NK – negatiivinen kontrolli (kortikosteroni)
C0 – vertailustandardin liuotinkontrolli
LK – testikemikaalin liuotinkontrolli

Taulukko 6

Antagonistitestissä käytettyjen vertailustandardien, kontrollien ja testikemikaalien pitoisuus ja laimennokset

Vertailus. tamoksifeeni		TCx - esiseulonta-ajo		TCx - laaja ajo		Kontrollit	
pit. (M)		Laimennus		Laimennus		pit. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$1*10^{-09}$
C1	$3*10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NK	$1*10^{-05}$
C2	$1*10^{-08}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-08}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	LK	0
C4	$1*10^{-07}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Täydennetty agonisti**	
C6	$1*10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**pit. (M)**	
C7	$3*10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17ß-estradioli	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-05}$						

TCx – testikemikaali x
PK – positiivinen kontrolli (4-hydroksitamoksifeeni)
NK – negatiivinen kontrolli (resveratroli)
C0 – vertailustandardin liuotinkontrolli
LK – testikemikaalin liuotinkontrolli
KK – kantaja-ainekontrolli (ei sisällä kiinteää pitoisuutta agonistista vertailustandardia 17β-estradiolia ($3*10^{-12}$ M)

Tietojen keruu ja analysointi

56. Esiseulonta-ajon ja laajan ajon jälkeen on määritettävä testikemikaalin EC_{10}-, EC_{50}-, PC_{10}- ja PC_{50}-arvot ja maksimi-induktio (TCx_{max}) agonistitestin osalta. Antagonistitestissä on laskettava IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} ja minimi-induktio (TCx_{min}). Kuvassa 3 (agonistitesti) ja kuvassa 4 (antagonistitesti) nämä parametrit on esitetty graafisesti. Tarvittavat parametrit lasketaan jokaisen testikemikaalin suhteellisen induktion perusteella (suhteessa vertailustandardin maksimi-induktioon (= 100 %)). Tietojen arvioinnissa on käytettävä epälineaarista regressiota (vaihteleva kerroin, 4 parametria) seuraavan yhtälön mukaan:

$$Y = Ylin + \frac{(\text{Ylin} - \text{Alin})}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope})}$$

Jossa:

X = annoksen tai pitoisuuden logaritmi

Y = vaste (suhteellinen induktio (%))

Ylin = maksimi-induktio (%)

Alin = minimi-induktio (%)

$LogEC_{50}$ = sen pitoisuuden logaritmi, jolla havaitaan 50 prosenttia maksimivasteesta

HillSlope = Hillslope tai kulmakerroin

57. Luminometrin raakatiedot, jotka ilmoitetaan suhteellisina valoyksikköinä (RLU), on siirrettävä taulukkolaskentamalliin, joka on laadittu esiseulontaa ja laajaa ajoa varten. Raakatietojen on täytettävä hyväksymisperusteet, jotka on esitetty taulukossa 3A ja 3B (agonistitesti) tai 4A ja 4B (antagonistitesti). Jos raakatiedot täyttävät hyväksymisperusteet, tarvittavat parametrit määritetään seuraavilla laskutoimituksilla:

Agonistitesti

— Vähennä vertailustandardin liuotinkontrollin keskimääräinen RLU vertailustandardien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Vähennä testikemikaalin liuotinkontrollin keskimääräinen RLU testikemikaalien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Laske suhteellinen induktio vertailustandardin jokaisesta pitoisuudesta. Aseta vertailustandardin suurimman pitoisuuden induktion arvoksi 100 %.

— Laske testikemikaalin jokaisen pitoisuuden suhteellinen induktio verrattuna vertailustandardin suurimpaan pitoisuuteen, joka on 100 %.

— Arvioi analyysin tulokset epälineaarisen regression (vaihteleva kulmakerroin, 4 parametria) kannalta.

— Määritä vertailustandardin EC_{50}- ja EC_{10}-arvo.

— Määritä testikemikaalien EC_{50}- ja EC_{10}-arvot.

— Määritä testikemikaalin suurin suhteellinen induktio (TC_{max}).

— Määritä testikemikaalien PC_{10}- ja PC_{50}-arvot.

Testikemikaalien osalta täydellistä annos-vastekäyrää ei aina saavuteta esimerkiksi sytotoksisuuteen tai liukoisuuteen liittyvien ongelmien vuoksi. Tällöin EC_{50}-, EC_{10}- ja PC_{50}-arvoja ei voida määrittää. Näissä tapauksissa voidaan määrittää vain PC_{10} ja TC_{max}.

Antagonistitesti

— Vähennä vertailustandardin suurimman pitoisuuden keskimääräinen RLU vertailustandardien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Vähennä vertailustandardin suurimman pitoisuuden keskimääräinen RLU testikemikaalien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Laske suhteellinen induktio vertailustandardin jokaisesta pitoisuudesta. Aseta vertailustandardin pienimmän pitoisuuden induktion arvoksi 100 %.

— Laske testikemikaalin jokaisen pitoisuuden suhteellinen induktio verrattuna vertailustandardin pienimpään pitoisuuteen, joka on 100 %.

— Arvioi analyysin tulokset epälineaarisen regression (vaihteleva kulmakerroin, 4 parametria) kannalta.

— Määritä vertailustandardin IC_{50}- ja IC_{20}-arvo.

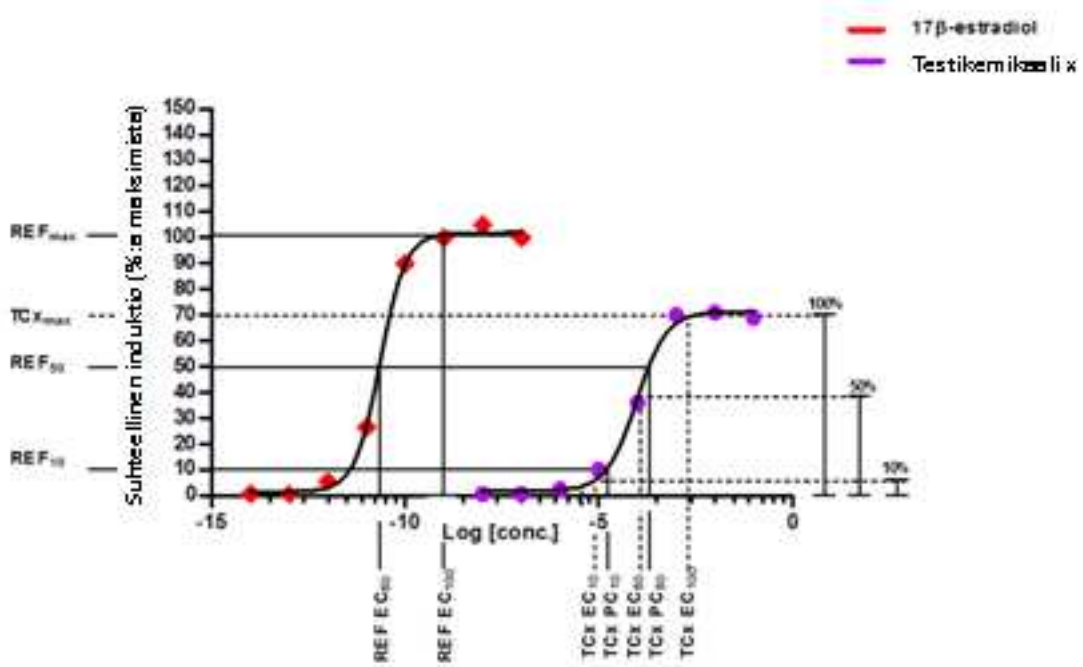
— Määritä testikemikaalien IC_{50}- ja IC_{20}-arvot.

— Määritä testikemikaalin pienin suhteellinen induktio (TC_{min}).

— Määritä testikemikaalien PC_{80}- ja PC_{50}-arvot.

Kuva 3

Yhteenveto agonistitestissä määritetyistä parametreista



EC_{10} = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 10 prosenttia sen maksimivasteesta.

EC_{50} = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 50 prosenttia sen maksimivasteesta.

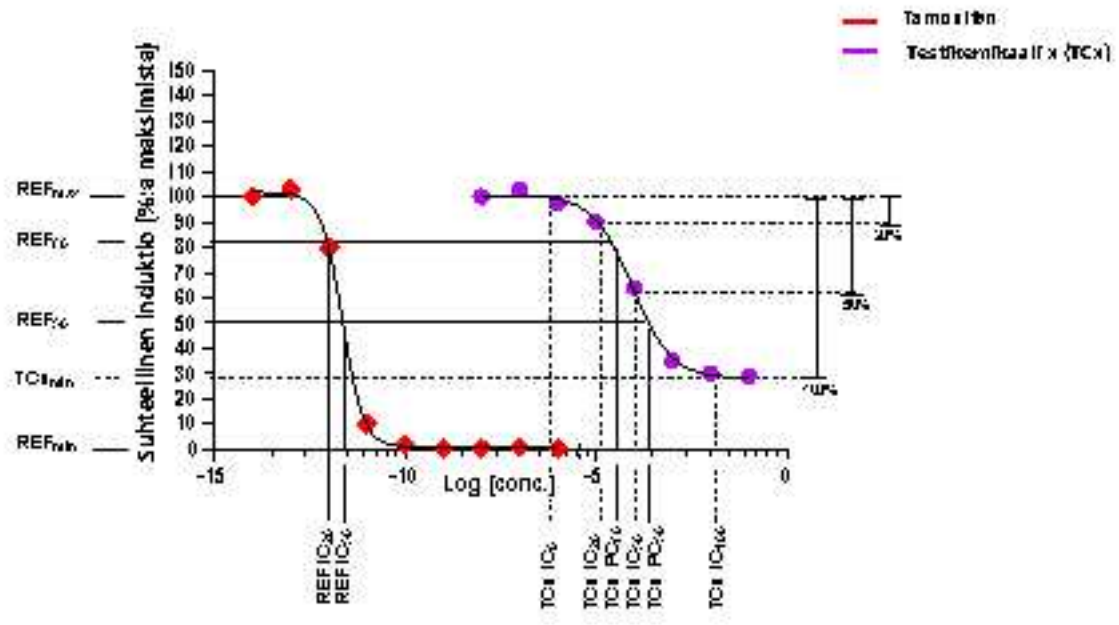
PC_{10} = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin EC_{10}-arvo.

PC_{50} = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin EC_{50}-arvo.

TCx_{max} = testikemikaalin suurin suhteellinen induktio.

Kuva 4

Yhteenveto antagonistitestissä määritetyistä parametreista



IC20 = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 80 prosenttia sen maksimivasteesta (20 prosentin inhibitio).

IC50 = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 50 prosenttia sen maksimivasteesta (50 prosentin inhibitio).

PC80 = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin IC20-arvo.

PC50 = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin IC50-arvo.

TCxmin = testikemikaalin pienin suhteellinen induktio.

Testikemikaalien osalta täydellistä annos-vastekäyrää ei aina saavuteta esimerkiksi sytotoksisuuteen tai liukoisuuteen liittyvien ongelmien vuoksi. Tällöin IC_{50}-, IC_{20}- ja PC_{50}-arvoja ei voida määrittää. Näissä tapauksissa voidaan määrittää vain PC_{20} ja TC_{min}.

58. Tulosten tulee perustua kahteen (tai kolmeen) riippumattomaan testiajoon. Jos kahdesta ajosta saadaan vertailukelpoiset ja siten toistettavat tulokset, kolmatta ajoa ei tarvitse tehdä. Jotta tulokset olisivat hyväksyttäviä, niiden on

— täytettävä hyväksymisperusteet (ks. hyväksymisperusteet 14–22 kohdasta)

— oltava toistettavissa.

Aineiston tulkintaperusteet

59. Aineiston tulkinnassa ja päätettäessä, katsotaanko testikemikaali positiiviseksi vai negatiiviseksi, tulee käyttää seuraavia perusteita:

Agonistitesti

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **positiiviseksi**, jos

1 TC_{max} on yhtä suuri tai 10 prosenttia suurempi kuin vertailustandardin maksimivaste (REF_{10}).

2 Vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta ovat yhtä suuria tai suurempia kuin REF_{10}.

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **negatiiviseksi**, jos

1 TC_{max} on korkeintaan 10 prosenttia suurempi kuin vertailustandardin maksimivaste (REF_{10}).

2 Vähemmän kuin kaksi testikemikaalin pitoisuutta ovat yhtä suuria tai suurempia kuin REF_{10}.

Antagonistitesti

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **positiiviseksi**, jos

1 TC_{min} on yhtä suuri tai pienempi kuin 80 prosenttia vertailustandardin maksimivasteesta (REF_{80} = 20 prosentin inhibitio).

2 Vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta ovat yhtä suuria tai pienempiä kuin kuin REF_{80}.

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **negatiiviseksi**, jos

1 TC_{min} on suurempi kuin 80 prosenttia vertailustandardin maksimivasteesta (REF_{80} = 20 prosentin inhibitio).

2 Vähemmän kuin kaksi testikemikaalin pitoisuutta ovat yhtä suuria tai pienempiä kuin REF_{80}.

60. Testikemikaalin positiivisen vasteen voimakkuuden luonnehtimiseksi on ilmoitettava vaikutuksen suuruusluokka (agonistitesti: TC_{max}; antagonistitesti: TC_{min}) ja pitoisuus, jolla vaikutus ilmaantuu (agonistitesti: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonistitesti: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

TESTIRAPORTTI

61. Katso ”ER TA -TESTIN OSAT” -luvun 20 kohta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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.

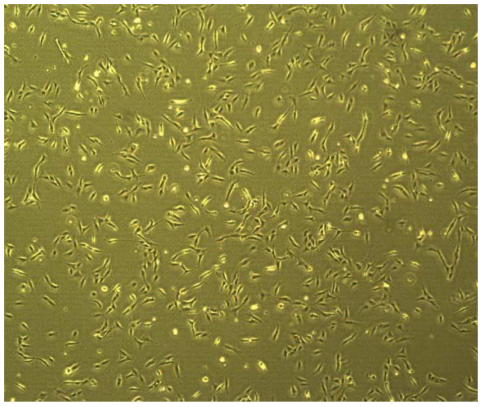
(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769–771.

(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

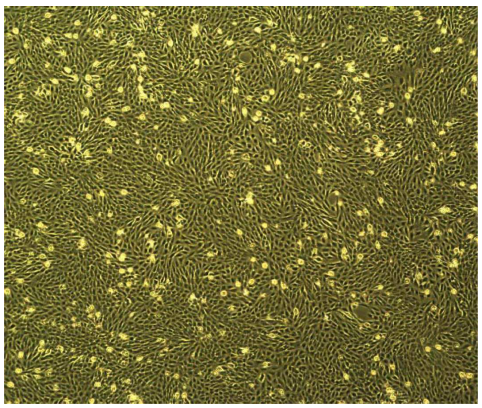
(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Lisäys 4.1

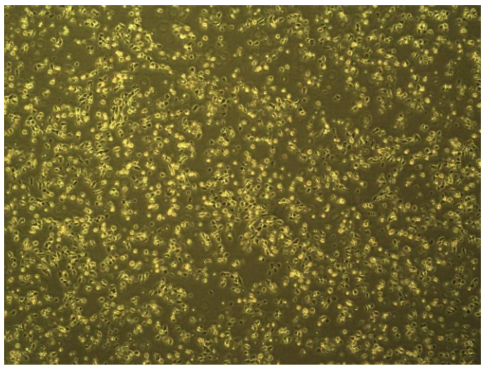
SOLUJEN ELINKYVYN SILMÄMÄÄRÄINEN TARKASTUS



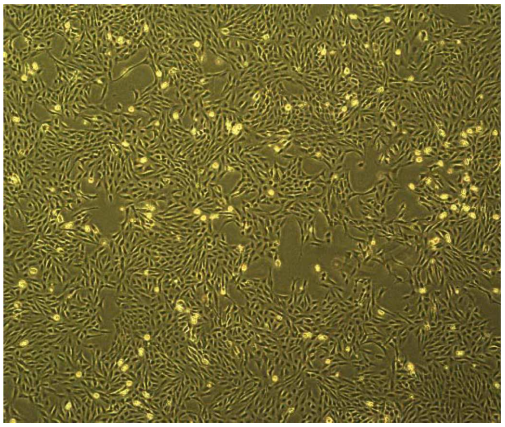
Konfluenssi < 5 %. Solut on juuri istutettu. Solujen elinkyky 100 %. Luokittelu: ”ei sytotoksisuutta”



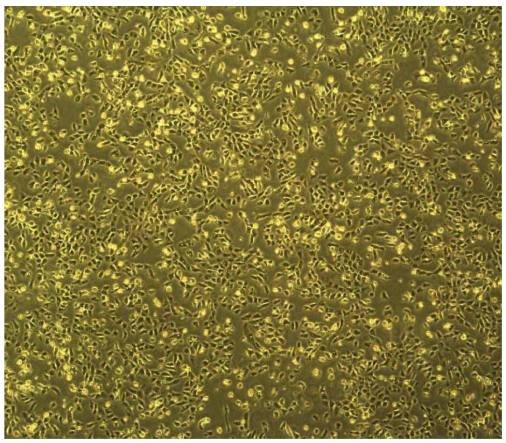
Konfluenssi > 95 %. Solut ovat pakkautuneet tiheään ja niiden määrä alkaa lisääntyä. Solujen elinkyky > 95 %.
Luokittelu: ”ei sytotoksisuutta”



Solun elinkyky < 5 %. Solut ovat erkaantuneet toisistaan kokonaan, ja niiden välinen yhteys on katkennut. Solut ovat pyöristyneet. Luokittelu: ”sytotoksisuutta”



Konfluenssi > 85 %. Tässä vaiheessa solut altistetaan testikemikaaleille. Solujen elinkyky > 95 %. Luokittelu: ”ei sytotoksisuutta”



Solujen elinkyky < 25 %. Solut erkanevat toisistaan, ja niiden välinen yhteys heikkenee. Solut pyöristyvät. Luokittelu: ”sytotoksisuutta”

B.67 *IN VITRO* -GEENIMUTAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUILLA TYMIDIINIKINAASIN GEENIÄ KÄYTTÄEN

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 490 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan ja uusitaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Hiiren lymfoomatesti ja TK6-testi, jossa käytetään tymidiinikinaasin lokusta, sisältyivät alun perin testimenetelmään B.17. Genotoksisuuden testaamista käsittelevän kansainvälisen työryhmän (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmä on sen jälkeen laatinut kansainvälisesti yhtenäistetyt suositukset hiiren lymfoomatestin hyväksymisperusteista ja aineiston tulkinnasta (1) (2) (3) (4) (5), ja nämä suositukset sisältyvät tähän uuteen testimenetelmään B.67. Tämä testimenetelmä on laadittu hiiren lymfoomatestiä ja TK6-testiä varten, koska siinä hyödynnetään myös tymidiinikinaasin lokusta. Hiiren lymfoomatestiä on käytetty laajalti sääntelytarkoituksiin, kun taas TK6-testiä on käytetty paljon harvemmin. On kuitenkin todettava, että päätetapahtumien samanlaisuudesta huolimatta nämä kaksi solulinjaa eivät ole vaihdettavissa keskenään, ja sääntelyohjelmissa voidaan perustellusti priorisoida toista tietyssä sääntelykäytössä. Hiiren lymfoomatestin validointi osoitti, että sillä voidaan havaita geenimutaatioiden lisäksi myös testikemikaalin kyky aiheuttaa rakenteellisia kromosomivaurioita. Tämä testimenetelmä kuuluu geneettisen toksikologian testimenetelmiin. OECD on laatinut asiakirjan (6), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Nisäkässoluilla tehtävän *in vitro* -geenimutaatiotestin tarkoituksena on havaita kemikaalien aiheuttamia geenimutaatioita. Näissä testeissä käytettävillä solulinjoilla mitataan reportterigeeneissä, erityisesti endogeenisessä tymidiinikinaasin geenissä (lyhenne *TK* ihmisen soluista ja *Tk* jyrsijän soluista; tässä testimenetelmässä näihin viitataan yhteisesti lyhenteellä *TK*) olevia forward-mutaatioita. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi näiden kahden solulinjan kanssa: hiiren lymfooman solulinja L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C - (yleinen nimitys L5178Y) ja ihmisen lymfoblastoidi solulinja TK6 (yleinen nimitys TK6). Vaikka nämä kaksi solulinjaa eroavat toisistaan alkuperältään, solukasvultaan, p53-statukseltaan jne., *TK*-geenimutaatiotestit voidaan kuitenkin tehdä samalla tavoin kummassakin solutyypissä tässä testimenetelmässä kuvatulla tavalla.

3. Tymidiinikinaasin geenin autosomaalisuuden ja heterotsygoottisuuden avulla voidaan havaita elinkykyiset pesäkkeet, joiden soluista puuttuu tymidiinikinaasientsyymi $TK^{+/-}$ – $TK^{-/-}$ -mutaation seurauksena. Tämä puutos voi johtua *TK*-geeniin vaikuttavista geneettisistä tapahtumista, joita ovat sekä geenimutaatiot (pistemutaatiot, lukukehysmutaatiot, pienet deleetiot jne.) että kromosomaaliset tapahtumat (suuret deleetiot, kromosomien uudelleenjärjestymiset ja mitoottinen rekombinaatio). Viime mainitut tapahtumat ilmenevät heterotsygoottisuuden puutteena, mikä on yleinen geneettinen muutos kasvaimen suppressorigeeneissä ihmisen tuumorigeneesin yhteydessä. Teoriassa hiiren lymfoomatestillä voidaan havaita *TK*-geeniä kantavan koko kromosomin puuttuminen, joka johtuu sukkularihmaston häiriöistä ja/tai mitoottisesta nondisjunktiosta. Sytogeneettisen ja molekulaarisen analyysin yhdistelmä osoittaa selvästi, että jotkin hiiren lymfoomatestissä tavattavat TK-mutantit ovat seurausta nondisjunktiosta. Todistusnäyttö kuitenkin osoittaa, että *TK*-geenimutaatiotesteillä ei voida luotettavasti havaita aneugeeneja tavanomaisia sytotoksisuuskriteerejä sovellettaessa (kuten tässä testimenetelmässä kuvataan), joten näiden testien käyttö aneugeenien havaitsemiseksi ei ole asianmukaista (7) (8) (9).

4. *TK*-geenimutaatiotesteissä luodaan kaksi eri fenotyyppiluokkaa *TK*-mutanteista: normaalisti kasvavat mutantit, jotka kasvavat samaa vauhtia kuin heterotsygoottiset TK-solut, ja hitaasti kasvavat mutantit, joiden kaksinkertaistumisaika on pidentynyt. Hiiren lymfoomatestissä normaalisti kasvavat ja hitaasti kasvavat mutantit määritetään suureksi mutaatiopesäkkeeksi ja pieneksi mutaatiopesäkkeeksi, ja TK6-testissä ne määritetään aikaisin ilmaantuvaksi pesäkkeeksi ja myöhään ilmaantuvaksi pesäkkeeksi. Hiiren lymfoomatestin osalta sekä suurten että pienten mutaatiopesäkkeiden molekulaarinen ja sytogeneettinen luonne on selvitetty yksityiskohtaisesti (8) (10) (11)(12) (13). Myös aikaisin ja myöhään ilmaantuvien TK6-mutanttien molekulaarista ja sytogeneettistä luonnetta on tutkittu laajasti (14) (15) (16) (17). Kummankin solutyypin hitaasti kasvavilla mutanteilla on ollut geneettinen vaurio, johon sisältyy oletus kasvua säätelevästä geenistä (säätelevistä geeneistä) TK:n lokuksen lähellä. Tästä seuraa kaksinkertaistumisaikojen piteneminen ja myöhään ilmaantuvien tai pienten pesäkkeiden muodostuminen (18). Hitaasti kasvavien mutanttien muodostuminen on yhdistetty kemikaaleihin, jotka aiheuttavat suuria rakenteellisia muutoksia kromosomitasolla. Solut, joiden vaurioon ei sisälly oletusta kasvua säätelevästä geenistä (säätelevistä geeneistä) TK:n lokuksen lähellä, kasvavat samaa vauhtia kuin parentaaliset solut, ja niistä tulee normaalisti kasvavia mutantteja. Pääasiassa normaalisti kasvavien mutanttien muodostuminen on liitetty kemikaaleihin, jotka aiheuttavat pääasiassa pistemutaatioita. Sen vuoksi on tärkeää laskea sekä hitaasti että normaalisti kasvavat mutantit, jotta löydetään kaikki mutantit ja jotta saadaan tietoa testikemikaalin aiheuttaman vaurion tyypistä (tyypeistä) (mutageenit vs. klastogeenit) (10) (12) (18) (19).

5. Testimenetelmä sisältää yleistä tietoa, jota sovelletaan sekä hiiren lymfoomatestiin että TK6-testiin, ja erityisohjeita kumpaakin yksittäistä testiä varten.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

7. *In vitro* -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita.

8. On huolehdittava siitä, että vältetään olosuhteet, jotka voisivat johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin (ts. mahdollinen yhteisvaikutus testausjärjestelmän kanssa), jotka eivät johdu testikemikaalien ja solun geneettisen materiaalin suorasta yhteisvaikutuksesta. Tällaisiin olosuhteisiin sisältyvät pH:n tai osmolaliteetin muutokset, yhteisvaikutus väliaineen komponenttien kanssa (20) (21) tai liiallinen sytotoksisuus (22) (23) (24). Hiiren lymfoomatestissä ja TK6-testissä sytotoksisuutta pidetään liian suurena, jos se ylittää 28 kohdassa määritetyt sytotoksisuuden enimmäistasot. Lisäksi on muistettava, että testikemikaalit, jotka ovat tymidiinin analogeja tai käyttäytyvät niiden tavoin, voivat lisätä mutaationopeutta spontaanien taustamutaatioiden valikoivan kasvun kautta solun käsittelyn aikana, ja niiden asianmukainen arviointi edellyttää muita testimenetelmiä (25).

9. Valmistettujen nanomateriaalien osalta tähän testimenetelmään voidaan joutua tekemään erityisiä mukautuksia, mutta niitä ei ole kuvattu tässä testimenetelmässä.

10. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

11. Mutantit solut, joista $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ -mutaation seurauksena puuttuu tymidiinikinaasientsyymin vaikutus, ovat resistenttejä pyrimidiinianalogitrifluorotymidiinin (TFT) sytotoksisille vaikutuksille. *TK*:n läsnä ollessa solut ovat herkkiä TFT:lle, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut pystyvät siis lisääntymään TFT:n läsnä ollessa ja muodostamaan näkyviä pesäkkeitä, kun taas TK-entsyymiä sisältävät solut eivät pysty.

TESTIN PERIAATE

12. Suspensiossa olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi (ks. 33 kohta) testikemikaalille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä (ks. 19 kohta) ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota. Sytotoksisuus määritetään hiiren lymfoomatestissä suhteellisena kokonaiskasvuna (relative total growth, RTG – ks. 25 kohta) ja TK6-testissä suhteellisena eloonjääneisyytenä (relative survival, RS – ks. 26 kohta). Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusaineessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle valitulle solutyypille ominainen (ks. 37 kohta), jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista. Fenotyypin ilmentymisen jälkeen mutaationopeus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttipesäkkeiden toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle ja toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella mutanttien selektion aikaisella kloonaustehokkuudella korjattuna.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Solut

13. Hiiren lymfoomatesti: Koska hiiren lymfoomatestin kehittämisessä ja luonnehtimisessa käytettiin L5178Y-solujen alalinjaa $TK^{+/-}$ −3.7.2C, tätä nimenomaista alalinjaa on käytettävä hiiren lymfoomatestissä. L5178Y-solulinja on peräisin metyylikolantreenin aiheuttamasta DBA-2-kannan hiiren kateenkorvan lymfoomasta (26).Clive

työtovereineen käsitteli L5178Y-soluja (jotka Clive nimesi $TK^{+/+}$ −3-soluiksi) etyylimetaanisulfonaatilla ja eristi $TK^{-/-}$(nimitys $TK^{-/-}$ −3.7) -kloonin käyttämällä bromodeoksiuridiinia selektiivisenä aineena. $TK^{-/-}$-kloonista eristettiin spontaani $TK^{+/-}$-klooni (nimitys $TK^{+/-}$ −3.7.2.) ja alaklooni (nimitys $TK^{+/-}$−3.7.2C), ja niiden käyttöä hiiren lymfoomatestissä luonnehdittiin (27). Solulinjan karyotyyppi on julkaistu (28) (29) (30) (31). Modaalinen kromosomimäärä on 40. Yksi kromosomi on metasentrinen (t12;13), ja se tulisi laskea yhdeksi kromosomiksi. Hiiren *TK*:n lokus sijaitsee kromosomin 11 distaalipäässä. L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C -solulinjassa on mutaatioita kummassakin p53-alleelissa, ja se tuottaa mutanttia p53-proteiinia (32) (33). Se, että testillä voidaan havaita laaja-alaisia vaurioita, johtuu todennäköisesti $TK^{+/-}$−3.7.2C -solulinjan p53-statuksesta (17).

14. TK6-testi: TK6 on ihmisen lymfoblastoidi solulinja. Parentaalinen solulinja on Epstein-Barrin viruksella muunnettu solulinja WI-L2, joka saatiin alun perin 5-vuotiaalta perinnöllistä sferosytoosia sairastavalta pojalta. Ensimmäiselle eristetylle kloonille, HH4:lle, aiheutettiin mutaatio ICR191:llä, ja heterotsygoottinen *TK*-solulinja, TK-6, luotiin (34). TK-6-solut ovat lähes diploidisia, ja edustava karyotyyppi on 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Ihmisperäinen *TK*:n lokus sijaitsee kromosomin 17 pitkässä varressa. TK6 on p53-kompetentti solulinja, koska sen molemmissa alleeleissa on villityypin p53-sekvenssi ja se ilmentää vain villityypin p53-proteiinia (36).

15. Sekä hiiren lymfoomatestissä että TK6-testissä testilaboratorion kannattaa varmistaa varastokantaa tehdessään tai täydentäessään, ettei *Mycoplasma*-kontaminaatiota ole. Lisäksi laboratorion täytyy tehdä solujen karyotyypitys tai värjätä kromosomit, joissa *TK*:n lokus sijaitsee, sekä tarkistaa populaation kaksinkertaistumisajat. Normaali solusyklin kesto testilaboratoriossa käytetyissä soluissa on määritettävä, ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen (16) (19) (37). Tätä varastokantaa on säilytettävä vähintään -150° C:ssa, ja kaikki työvarastokannat on valmistettava siitä.

16. Viljelmästä voidaan joutua puhdistamaan olemassa olevat mutantit solut [ellei liuotinkontrollin mutaationopeus jo ole hyväksyttävä – ks. hiiren lymfoomatestin osalta taulukko 2] joko ennen kuin tehdään suuri määrä syväjäädytyksellä säilöttäviä varastokantoja tai juuri ennen solujen käyttöä kokeessa. Tämä tehdään käyttämällä metotreksaattia (aminopteriinia) siihen, ettei valinta kohdistu niihin soluihin, joista puuttuu TK, ja lisäämällä viljelmään tymidiiniä, hypoksantiinia ja glysiiniä (L5178Y) tai 2'-deoksisytidiiniä (TK6) TK-kompetenttien solujen optimaalisen kasvun varmistamiseksi (19) (38) (39), ja TK6:n osalta (40)). Yleisiä ohjeita soluviljelmien ylläpitämisen hyvistä käytännöistä ja tarkempia ohjeita L5178Y- ja TK6-soluista on lähdeviitteissä (19) (31) (37) (39) (41). Jos laboratoriot tarvitsevat varastosolukantoja joko hiiren lymfoomatestin tai TK6-testin aloittamista varten tai uusien varastosolukantojen hankkimiseksi, on olemassa soluvarasto tarkkaan luonnehdituista soluista (37).

Kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet

17. Kummassakin testissä viljelmiä on ylläpidettävä soveltuvassa kasvatusliuoksessa ja inkubaatio-olosuhteissa (esim. kasvatusastiat, kosteutettu ilma, jonka hiilidioksidipitoisuus on 5 prosenttia, ja inkubointilämpötila 37 °C). Soluviljelmät on pidettävä aina sellaisissa olosuhteissa, joiden avulla varmistetaan, että ne kasvavat log-vaiheessa. On erityisen tärkeää valita sellaiset kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja optimaalisen kloonaustehokkuuden sekä mutanteille että ei-mutanteille soluille. Sekä hiiren lymfoomatestissä että TK6-testissä on tärkeää, että viljelyolosuhteilla varmistetaan sekä suurten pesäkkeiden / aikaisin ilmaantuvien että pienten pesäkkeiden / myöhään ilmaantuvien TK-mutanttien optimaalinen kasvu. Tarkempia tietoja viljelystä ja siitä, miten hevosen seerumi inaktivoidaan asianmukaisesti lämmöllä, jos mutanttien selektion aikana käytetään RPMI-kasvatusliuosta, on lähdeviitteissä (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Soluviljelmien valmistelu

18. Solulinjat kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään kasvatusliuokseen sellaiseen tiheyteen, että suspensioviljelmissä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti altistus- ja ilmentymisaikana.

Metabolinen aktivaatio

19. L5178Y- ja TK6-solujen yhteydessä on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä, koska näiden solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei toisin toimiminen ole perusteltua, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (43) (44) (45) tai fenobarbitaalin ja ß-naftoflavonin (46) (47) (48) (49) (50) (51) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmäei

ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen kanssa (52), ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254 (45) (46) (47) (48) (49). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 prosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiaineessa. Testikemikaalien luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää.

Testikemikaalin valmistus

20. Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä (ks. 21 kohta). Nestemäiset testikemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmän käsittelyä. Kaasujen tai haihtuvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä tarvittavia muutoksia; kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (53) (54) (55). Testikemikaali on valmistettava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

TESTAUSOLOSUHTEET

Liuottimet

21. Liuotin on valittava siten, että testikemikaalin liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä se haittaa testin tekemistä esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai häiritsemällä metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai kasvatusliuoksen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Hyvin tunnettuja liuottimia ovat vesi ja dimetyylisulfoksidi. Yleensä orgaanisten liuottimien osuus ei saa ylittää yhtä ja vesipitoisten liuottimien (suolaliuos tai vesi) kymmentä tilavuusprosenttia lopullisessa kasvatusaineessa. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia (esimerkiksi etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testikemikaali sopivat yhteen ja etteivät ne ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Jos tällaisia tukevia tietoja ei ole, on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1, määritelmät), jotka osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta haitallisia tai mutageenisiä vaikutuksia.

SYTOTOKSISUUDEN MITTAUS JA ALTISTUSPITOISUUKSIEN VALINTA

22. Testikemikaalin suurinta pitoisuutta määritettäessä on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 28 kohta), saostumista kasvatusliuokseen (ks. 29 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 8 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä kasvatusliuoksen pH-arvon merkittävän muuttumisen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen kasvatusliuos väärien positiivisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

23. Pitoisuuden valinta perustuu sytotoksisuuteen ja muihin näkökohtiin (ks. 27–30 kohta). Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä saattaa olla hyödyllinen, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Vaikka alustava sytotoksisuustesti tehtäisiin, sytotoksisuus on kunkin viljelmän osalta silti mitattava myös pääasiallisessa kokeessa. Jos tehdään annoksenmääritystesti, sen pitää kattaa laaja pitoisuusalue, ja se voidaan lopettaa joko päivänä 1 altistuksen jälkeen tai sitä voidaan jatkaa päivän 2 ilmentymisen ja mutanttien selektion ajan (jos käytetyt pitoisuudet osoittautuvat asianmukaisiksi).

24. Sytotoksisuus on määritettävä jokaisesta yksittäisestä testiviljelmästä ja kontrolliviljelmästä: hiiren lymfoomatestin (2) ja TK6-testin (15) menetelmät on määritetty kansainvälisesti hyväksytyssä käytännössä.

25. Hiiren lymfoomatestin molemmat versiot (agar ja mikrokuoppalevy): Sytotoksisuus on arvioitava käyttämällä suhteellista kokonaiskasvua (relative total growth, RTG), jonka määrittelivät alkujaan Clive ja Spector vuonna 1975 (2). Tähän sisältyy suhteellinen suhteellinen suspensiokasvu (RSG: testiviljelmä vs. liuotinkontrolli) solun käsittelyn aikana, ilmentymisaika ja suhteellinen kloonaustehokkuus (RCE: testiviljelmä vs. liuotinkontrolli) mutanttien selektion aikana (2). Suhteellinen suspensiokasvu sisältää myös mahdollisen solukadon, jota voi ilmetä testiviljelmässä käsittelyn aikana (ks. laskentakaavat lisäyksestä 2).

26. TK6-testi: Sytotoksisuus on arvioitava käyttämällä suhteellista eloonjääneisyyttä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuutta heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna solumäärän perusteella verrattuna negatiiviseen kontrolliin (jolle määritetty eloonjääneisyys on 100 %) (ks. kaavio lisäyksestä 2).

27. Vähintään neljää hyväksymisperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (paitsi liuotin- ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, kunkin testattavan pitoisuuden yhteydessä voidaan käyttää joko rinnakkaisia tai yksittäistä altistettuja viljelmiä. Rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset on raportoitava erikseen, mutta ne voidaan yhdistää tietojen analyysia varten (55). Testikemikaaleille, jotka osoittavat vain vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta, noin kaksin- tai kolminkertaiset pitoisuusvälit ovat yleensä riittävät. Jos sytotoksisuutta esiintyy, pitoisuudet on valittava siten, että ne kattavat sytotoksisuuden vaihteluvälin 28 kohdassa kuvatusta sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja jotta saataisiin tietoja sytotoksisuuden koko vaihteluvälistä tai voitaisiin tutkia pitoisuus-vastesuhdetta tarkasti, voi olla tarpeen käyttää pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja useampaa kuin neljää pitoisuutta erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 70 kohta). Useamman kuin neljän pitoisuuden käyttö voi olla erityisen tärkeää silloin, kun käytetään yksittäisiä viljelmiä.

28. Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, hiiren lymfoomatestissä suurimmalla pitoisuudella pitäisi saavuttaa 20 ja 10 prosentin välillä vaihteleva suhteellinen kokonaiskasvu. TK6-testissä pitäisi saavuttaa suhteellinen eloonjääneisyys, joka vaihtelee välillä 20 ja 10 prosenttia (67 kohta).

29. Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienempinä pitoisuuksina, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalille altistumisen päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla nähtävää sameutta tai saostumista. Vaikka sytotoksisuutta esiintyy pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suositeltavaa testata ainoastaan yksi sameutta tai näkyvää saostumista tuottava pitoisuus, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Koska hiiren lymfoomatestissä ja TK6-testissä käytetään suspensioviljelmiä, on huolehdittava siitä, ettei saostuminen vaikuta testin suorittamiseen. Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän kasvatusliuokseen.

30. Jos saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta ei havaita, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (57) (58). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali [ts. UVCB-aine] tai ympäristöstä otettu näyte tms., suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esimerkiksi 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (59).

Kontrollit

31. Kaikkiin testiolosuhteisiin on sisällytettävä samanaikaiset negatiiviset kontrollit (ks. 21 kohta), jotka koostuvat pelkästään käsittelyväliaineessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

32. Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan, jotta voidaan osoittaa laboratorion kyky tunnistaa mutageenejä käytetyn testisuunnitelman mukaisissa olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus (tarvittaessa) ja jotta voidaan osoittaa, että sekä pienet / myöhään ilmaantuvat ja suuret / aikaisin ilmaantuvat *TK*-mutaatiopesäkkeet havaitaan asianmukaisesti. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään jäljempänä taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenitoksisuustestit ovat riittävän standardoituja samanaikaisesti metabolisen aktivaation kanssa ja ilman sitä tehtäviä, lyhyitä (3–4 tuntia) ja kestoltaan samoja käsittelyjä varten, positiivisten kontrollien käyttö voidaan rajoittaa metabolista aktivaatiota edellyttävään mutageeniin. Tässä tapauksessa tämä yksittäinen positiivinen kontrollivaste osoittaa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän toiminnan että testausjärjestelmän herkkyyden. Pitkäaikaisessa käsittelyssä (esimerkiksi 24 tuntia ilman S9-jaetta) on kuitenkin oltava oma positiivinen kontrollinsa, koska käsittelyn kesto poikkeaa testistä, jossa käytetään metabolista aktivointia. Kutakin positiivista kontrollia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa oleva lisääntyminen taustaan verrattuna, jotta voidaan osoittaa testausjärjestelmän herkkyys. Tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso ei saa vaarantaa vasteen luotettavuutta (ks. 28 kohta).

Taulukko 1

Vertailuaineet, joita suositellaan laboratorion pätevyyden arvioimiseen ja positiivisten kontrollien valintaan

Luokka	Aine	CAS-nro
1. Mutageenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota		
	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
	Mitomysiini C	50-07-7
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5
2. Mutageenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota		
	Bentso(a)-pyreeni	50-32-8
	Syklofosfamidi (monohydraatti)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetyylibentsantraseeni	57-97-6
	3-metyylikolantreeni	56-49-5

MENETTELY

Käsittely testikemikaalilla

33. Lisääntyvät solut altistetaan testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (asianmukainen aika on yleensä 3–4 tuntia). On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (59). Jos lyhytaikaisesta käsittelystä saadaan hiiren lymfoomatestissä negatiivisia tuloksia ja jos tietojen perusteella näyttää siltä, että pidempi käsittely olisi tarpeen [esimerkiksi nukleosidianalogit, huonosti liukenevat kemikaalit (5) (59)], on harkittava testin tekemistä siten, että käsittelyaika on pidempi, esimerkiksi 24 tuntia ilman S9-jaetta.

34. Jokaisessa testiviljelmässä (kontrolli ja altistus) kussakin testivaiheessa käytettävien solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaanimutaationopeuteen. Yleisohje on käsitellä ja siirrostaa jokaisessa viljelmässä riittävästi soluja, jotta kaikissa testin vaiheissa (käsittely, fenotyypin ilmentyminen ja mutanttien selektio) on vähintään 10 mutta mieluiten 100 spontaania mutaatiota (56).

35. Hiiren lymfoomatestissä suositeltu hyväksyttävä spontaani mutaationopeus on $35–140 \times 10^{-6}$ (agar-versio) ja $50–170 \times 10^{-6}$ (mikrokuoppalevyversio) (ks. taulukko 2). Jotta jokaisessa testiviljelmässä olisi vähintään 10 ja mieluiten 100 spontaania mutanttia, jotka selviytyvät käsittelystä, soluja on käsiteltävä vähintään 6×10^6. Kun käsitellään tämä määrä soluja ja kun soluja on riittävästi ilmentymisen ja mutanttien selektioon liittyvän kloonauksen aikana, saadaan riittävästi spontaaneja mutantteja (vähintään 10) kaikissa kokeen vaiheissa, myös sellaisilla pitoisuuksilla käsitellyissä viljelmissä, joiden aiheuttama sytotoksisuus on 90 prosenttia (mitattuna 10 prosentin suhteellisella kokonaiskasvulla) (19) (38) (39).

36. TK6-testissä spontaani mutaationopeus on yleensä välillä 2 ja 10×10^{-6}. Jotta jokaisessa testiviljelmässä olisi vähintään 10 spontaania mutanttia, jotka selviytyvät käsittelystä, soluja on käsiteltävä vähintään 20×10^6. Kun käsitellään tämä määrä soluja, saadaan riittävä määrä spontaaneja mutantteja (vähintään 10) myös sellaisilla pitoisuuksilla käsitellyissä viljelmissä, jotka aiheuttavat käsittelyn aikana 90 prosentin sytotoksisuuden (suhteellinen eloonjääneisyys 10 prosenttia). Lisäksi on viljeltävä riittävä määrä soluja ilmentymisaikana, ja solut on maljattava mutanttien selektiota varten (60).

Fenotyypin ilmentymisaika sekä sytotoksisuuden ja mutaationopeuden mittaus

37. Käsittelyjakson päätteeksi soluja viljellään määrätyn ajan, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista; tämä aika on jokaiselle solulinjalle ominainen. Hiiren lymfoomatestissä fenotyypin ilmentymisaika on kaksi päivää. TK6-testissä fenotyypin ilmentymisaika on 3–4 päivää. Jos käytetään 24 tunnin pituista käsittelyä, ilmentymisaika alkaa käsittelyn päätyttyä.

38. Fenotyypin ilmentymisajan aikana solut lasketaan päivittäin. Hiiren lymfoomatestissä päivittäisten solumäärien avulla lasketaan päivittäinen suspensiokasvu. Kahden päivän ilmentymisajan jälkeen soluja suspendoidaan kasvatusliuoksessa selektiivisen aineen kanssa ja ilman sitä mutanttien lukumäärän (valintatestilevyt) ja kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden testilevyt) määrittämiseksi. Hiiren lymfoomatestissä on kaksi yhtä hyväksyttävää menetelmää mutanttien selektion kloonaukseen: toisessa käytetään pehmeää agaria ja toisessa nestemäistä kasvatusainetta 96-kuoppaisissa levyissä (19) (38) (39). TK6-testissä kloonaus tehdään käyttämällä nestemäisiä kasvatusaineita ja 96-kuoppaisia levyjä (16).

39. Trifluorotymidiini (TFT) on ainoa suositeltava selektiivinen aine *TK*-mutanteille (61).

40. Hiiren lymfoomatestissä agarlevyjen ja mikrokuoppalevyjen pesäkkeet lasketaan 10–12 päivän inkuboinnin jälkeen. TK6-testissä mikrokuoppalevyjen pesäkkeet lasketaan 10–14 päivän kuluttua aikaisin ilmaantuvien mutanttien osalta. Jotta voidaan määrittää hitaasti kasvavat (myöhään ilmaantuvat) TK6-mutantit, soluja täytyy ruokkia viljelyaineella ja TFT:llä aikaisin ilmaantuvien mutanttien laskemisen jälkeen, ja sen jälkeen levyjä on inkuboitava vielä 7–10 päivää (62). Lue 42 ja 44 kohdasta lisätietoja hitaasti ja normaalisti kasvavien *TK*-mutanttien laskemisesta.

41. Hiiren lymfoomatestin osalta asianmukaiset laskelmat kahdelle testille ja kahdelle menetelmälle (agar- ja mikrokuoppalevy) ovat lisäyksessä 2. Agar-levyllä tehtävässä hiiren lymfoomatestissä pesäkkeet lasketaan ja mutanttipesäkkeiden lukumäärä mukautetaan kloonaustehokkuudella, jotta saadaan laskettua mutaationopeus. Hiiren lymfoomatestin ja TK6-testin mikrokuoppalevyllä tehtävässä versiossa kloonaustehokkuus määritetään sekä valinnan että kloonaustehokkuuden testilevyiltä Poissonin jakauman mukaisesti (63). Mutaationopeus lasketaan näiden kahden kloonaustehokkuuden perusteella.

Mutanttipesäkkeiden luonnehdinta

42. Jos testikemikaalista saadaan hiiren lymfoomatestissä positiivinen tulos (ks. 62–63 kohta), pesäkkeitä on luonnehdittava kuvaamalla pesäkkeiden kokoa tai kasvua ainakin yhdessä testiviljelmässä (yleensä suurin hyväksyttävä positiivinen pitoisuus) ja negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Jos testikemikaalista saadaan negatiivinen tulos (ks. 64 kohta), mutanttipesäkkeiden luonnehdinta on tehtävä negatiivisten ja positiivisten kontrollien perusteella. Hiiren lymfoomatestin mikrokuoppalevymenetelmässä pieniä pesäkkeitä muodostaviksi mutanteiksi määritellään sellaiset pesäkkeet, jotka kattavat alle 25 prosenttia kuopan halkaisijasta. Suuria pesäkkeitä muodostaviksi mutanteiksi määritellään puolestaan sellaiset pesäkkeet, jotka kattavat yli 25 prosenttia kuopan halkaisijasta. Agar-menetelmässä mutanttipesäkkeiden laskemisessa ja pesäkkeiden koon määrittämisessä käytetään automaattista pesäkelaskuria. Kirjallisuudessa on yksityiskohtaisia kuvauksia pesäkkeiden koon määrittämistavoista (19) (38) (40). Negatiivisen ja positiivisen kontrollin pesäkkeiden luonnehdinta on tarpeen, jotta voidaan osoittaa, että tutkimukset on tehty asianmukaisesti.

43. Testikemikaalia ei voida määrittää negatiiviseksi, ellei positiivisessa kontrollissa havaita riittävästi sekä suuria että pieniä pesäkkeitä muodostavia mutantteja. Pesäkkeiden luonnehdinnan avulla voidaan saada yleistä tietoa testikemikaalin kyvystä aiheuttaa pistemutaatioita ja/tai kromosomeihin liittyviä tapahtumia (4 kohta).

44. TK6: Normaalisti kasvavat ja hitaasti kasvavat mutantit erotellaan sillä, että niiden inkubointiaika on erilainen (ks. 40 kohta). TK6-testissä sekä aikaisin että myöhään ilmaantuvat mutantit lasketaan kaikista viljelmistä, myös negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Negatiivisen ja positiivisen kontrollin pesäkkeiden luonnehdinta on tarpeen, jotta voidaan osoittaa, että tutkimukset on tehty asianmukaisesti. Testikemikaalia ei voida määrittää negatiiviseksi, ellei positiivisessa kontrollissa havaita riittävästi sekä aikaisin että myöhään ilmaantuvia mutantteja. Pesäkkeiden luonnehdinnan avulla voidaan saada yleistä tietoa testikemikaalin kyvystä aiheuttaa pistemutaatioita ja/tai kromosomeihin liittyviä tapahtumia (4 kohta).

Laboratorion pätevyys

45. Jotta laboratoriolla voidaan osoittaa olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion täytyy olla suorittanut useita kokeita positiivisilla vertailuaineilla, jotka vaikuttavat eri mekanismien välityksellä (ainakin yksi metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja yksi ilman sitä vaikuttava aine, jotka valitaan taulukossa 1 luetelluista aineista), sekä useita negatiivisia kontrolleja (käsittelemättömiä viljelmiä sekä erilaisia liuottimia/kantaja-aineita käyttäen). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden olisi oltava yhdenmukaisia lähdekirjallisuuden kanssa. Tätä vaatimusta ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joilla on 47–50 kohdassa määritelty aikaisempia tuloksia sisältävä tietokanta. Hiiren lymfoomatestissä sekä positiivisista että negatiivisista kontrolleista saatujen arvojen on oltava IWGT:n suositusten mukaiset (ks. taulukko 2).

46. Tiettyjä positiivisia kontrolliaineita (ks. taulukko 1) on tutkittava lyhyillä ja pitkillä altistuksilla (jos pitkiä altistuksia käytetään) ilman metabolista aktivaatiota ja myös lyhyellä altistuksella metabolisen aktivaation läsnä ollessa, jotta osoitetaan laboratorion pätevyys havaita mutageenisia kemikaaleja, määrittää metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus ja osoittaa solujen käsittelyn aikaisten kasvuolosuhteiden, fenotyypin ilmentymisen sekä mutanttien selektion asianmukaisuus ja laskentamenetelmien soveltuvuus. Valittujen aineiden eri pitoisuudet on valittava siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, testijärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

47. Laboratorion on määritettävä:

— aiempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

48. Kun hankitaan aluksi tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten, samanaikaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen negatiivisten kontrollitietojen kanssa. Kun kontrollin jakaumaan lisätään enemmän kokeellista tietoa, samanaikaisten negatiivisten kontrollien tulisi mieluiten sijoittua kyseisen jakauman 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (64) (65).

49. Laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeella, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa testiolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (65)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja sen osoittamiseksi, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (66). Tarkempia tietoja ja suosituksia siitä, miten aikaisempia tietoja sisältävä tietokanta laaditaan ja miten sitä käytetään, on kirjallisuudessa (64).

50. Negatiivisten kontrollitietojen on koostuttava mutaationopeuksista yhdessä viljelmässä tai mieluiten rinnakkaisviljelmissä 27 kohdan mukaisesti. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 prosentin kontrollirajojen sisälle. Jos negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 prosentin kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisempien kontrollien jakaumaan edellyttäen, että ne eivät ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 49 kohta) ja että kyse ei ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

51. Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon tietojen yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aiempia kontrolleja koskevien tietokantojen kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

52. Sekä hiiren lymfoomatestistä että TK6-testistä esitettävien tietojen on sisällettävä käsiteltyjen ja kontrolliviljelmien osalta sytotoksisuuden (suhteellinen kokonaiskasvu tai suhteellinen eloonjääneisyys) ja mutaationopeuden laskemiseen tarvittavat tiedot, jotka kuvataan jäljempänä.

53. Hiiren lymfoomatestin osalta yksittäisiä viljelmiä koskevina tietoina on esitettävä suhteellinen suspensiokasvu, suhteellinen kokonaiskasvu, kloonaustehokkuus mutanttien selektion aikana ja mutanttipesäkkeiden lukumäärä (agar-versiosta) tai tyhjien kuoppien lukumäärä (mikrokuoppalevy-versio). Mutaationopeus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumääränä miljoonaa eloonjäänyttä solua kohti. Jos vaste on positiivinen, pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeudet (ja/tai kokonaismutaationopeuden prosenttiosuus) on ilmoitettava vähintään yhdestä testikemikaalin pitoisuudesta (yleensä suurin positiivinen pitoisuus) sekä negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista. Jos vaste on negatiivinen, pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeus on ilmoitettava negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista.

54. TK6-testin osalta yksittäisiä viljelmiä koskevina tietoina on esitettävä suhteellinen eloonjääneisyys, kloonaustehokkuus mutanttien selektion aikana sekä tyhjien kuoppien lukumäärä aikaisin ja myöhään ilmaantuvista mutanteista. Mutaationopeus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumääränä eloonjääneiden solujen lukumäärää kohti, ja se on ilmoitettava sekä kokonaismutaationopeutena että aikaisin ja myöhään ilmaantuvien mutanttien mutaationopeutena (ja/tai prosenttiosuutena kokonaismutaationnopeudesta).

Hyväksymisperusteet

55. Niin hiiren lymfoomatestissä kuin TK6-testissä seuraavien perusteiden on täytyttävä ennen tietyn testikemikaalin kokonaistulosten määrittämistä:

— Testi toteutettiin kahdenlaisissa olosuhteissa (lyhyt käsittely metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä – ks. 33 kohta), ellei toisesta saatu positiivisia tuloksia.

— Soluja ja pitoisuuksia on analysoitu riittävät määrät (ks. 27, 34–36 kohta).

— Suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 28–30 kohdassa esitettyjä kriteerejä.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien hyväksymisperusteet

56. IWGT:n hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmä analysoi suuren määrän hiiren lymfoomatestistä saatuja tietoja, ja tämän analyysin perusteella päädyttiin kansainväliseen yksimielisyyteen nimenomaan hiiren lymfoomatestiä koskevista hyväksymisperusteista (1) (2)(3) (4) (5). Näin ollen tässä testimenetelmässä annetaan erityissuosituksia negatiivisten ja positiivisten kontrollien hyväksyttävyyden määrittämisestä ja yksittäisiä aineita koskevien tuloksien arvioinnista hiiren lymfoomatestissä. TK6-testiä koskeva tietokanta on paljon pienempi, eikä työryhmä ole arvioinut sitä.

57. Hiiren lymfoomatestissä jokaisesta kokeesta on arvioitava, täyttääkö käsittelemätön kontrolli / liuotinkontrolli IWGT:n hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmän seuraavat hyväksymisperusteet ((4) ja jäljempänä oleva taulukko 2): 1) mutaationopeus (huomaa, että IWGT on hyväksynyt omat mutaationopeudet hiiren lymfoomatestin agar- ja mikrokuoppalevyversioille), 2) kloonaustehokkuus mutanttien selektion aikana ja 3) liuotinkontrollin suspensiokasvu (ks. laskentakaavat lisäyksestä 2).

Taulukko 2

Hiiren lymfoomatestin hyväksymisperusteet

Parametri	Pehmeä agar -menetelmä	Mikrokuoppalevymenetelmä
Mutaationopeus	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Kloonaustehokkuus	65–120 %	65–120 %
Suspensiokasvu	8–32-kertainen (3–4 tunnin käsittely) 32–180-kertainen (24 tunnin käsittely, jos tehty)	8–32-kertainen (3–4 tunnin käsittely) 32–180-kertainen (24 tunnin käsittely, jos tehty)

58. Hiiren lymfoomatestin yhteydessä jokaisesta testistä on arvioitava myös se, täyttääkö positiivinen kontrolli (täyttävätkö positiiviset kontrollit) vähintään toisen kahdesta seuraavasta IWGT-työryhmän laatimasta hyväksymisperusteesta:

— Positiivisen kontrollin on osoitettava kokonaismutaationopeuden absoluuttinen lisääntyminen, jonka on siis oltava suurempi kuin spontaani mutaationopeus taustalla [aiheutettu mutaationopeus], vähintään 300×10^{-6}. Vähintään 40 prosenttia aiheutetusta mutaationopeudesta on näyttävä pienten pesäkkeiden mutaationopeudessa.

— Positiivisessa kontrollissa pienten pesäkkeiden mutaationopeus on lisääntynyt vähintään 150×10^{-6} enemmän kuin samanaikaisessa käsittelemättömässä / liuotinkontrollissa (pienten pesäkkeiden aiheutettu mutaationopeus 150×10^{-6}).

59. TK6-testiä pidetään hyväksyttävänä, jos samanaikainen negatiivinen kontrolli katsotaan voitavan lisätä laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 48–49 kohdassa kuvatun mukaisesti. Lisäksi samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 32 kohta) on aiheutettava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuottavat tilastollisesti merkitsevää lisääntymistä verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin.

60. Kummassakin testissä positiivisessa kontrolliviljelmässä havaitun sytotoksisuuden ylärajan on oltava sama kuin kokeellisissa viljelmissä. Toisin sanoen suhteellisen kokonaiskasvun / suhteellisen eloonjääneisyyden on oltava vähintään 10 prosenttia. Yhden pitoisuuden käyttäminen (tai yhden positiivisen kontrollin viljelmien pitoisuuksista, jos käytetään useampaa kuin yhtä pitoisuutta) riittää osoittamaan, että positiivisen kontrollin hyväksymisperusteet ovat täyttyneet. Lisäksi positiivisen kontrollin mutaationopeuden on oltava laboratoriolle määritetyn hyväksyttävyysalueen mukainen.

Tulosten arviointi ja tulkinta

61. Hiiren lymfoomatestin osalta IWGT:n hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmä on tehnyt huomattavan paljon töitä biologisen merkityksellisyyden ja positivista vastetta koskevien kriteerien eteen (4). Siksi tässä testimenetelmässä annetaan erityissuosituksia hiiren lymfoomatestillä testattuja testikemikaaleja koskevien tulosten tulkintaan (ks. 62–64 kohta). TK6-testiä koskeva tietokanta on paljon pienempi, eikä työryhmä ole arvioinut sitä. Sen vuoksi TK6-testistä saatujen tietojen tulkintaa koskevat suositukset ovat paljon yleisluonteisempia (ks. 65–66 kohta). Lisäsuositukset koskevat kumpaakin testiä (ks. 67–71 kohta).

Hiiren lymfoomatesti

62. Positiivisten ja negatiivisten vasteiden määrittämiseen suositellaan tiettyä lähestymistapaa, jotta voidaan varmistaa, että lisääntynyt mutaationopeus on biologisesti merkityksellinen. Yleensä muiden testien yhteydessä käytettävän tilastoanalyysin sijasta tämä lähestymistapa perustuu ennalta määritetyn aiheutetun mutaationopeuden (mutaationopeuden lisääntyminen samanaikaista kontrollia suuremmaksi) käyttöön. Tämä nopeus määritetään globaalilla arviointikertoimella (global evaluation factor, GEF), joka pohjautuu osallistuvilta laboratorioilta saatujen negatiivisen kontrollin mutaationopeustietojen jakaumaan (4). Hiiren lymfoomatestin agar-versiossa globaali arviointikerroin on 90×10^{-6} ja mikrokuoppalevyversiossa se on 126×10^{-6}.

63. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, jos missä tahansa tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 33 kohta) samanaikaista taustanopeutta suuremmaksi lisääntyvä mutaationopeus ylittää globaalin arviointikertoimen ja jos lisääntyminen liittyy pitoisuuteen (selvitetään esimerkiksi trenditestillä). Tällöin katsotaan, että testikemikaali voi aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä.

64. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos missä tahansa tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 33 kohta) pitoisuuteen liittyvää vastetta ei ilmaannu, tai jos mutaationopeus lisääntyy, se ei kuitenkaan ylitä globaalia arviointikerrointa. Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä.

TK6

65. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 33 kohta):

— vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

— kasvu liittyy pitoisuuteen, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä (ks. 33 kohta)

— mikä tahansa tuloksista on aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 48 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopivimmista tilastomenetelmistä (66) (67).

66. Mikäli kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi negatiiviseksi, jos kaikissa tarkastelluissa koeolosuhteissa (ks. 33 kohta):

— mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— pitoisuuteen liittyvää kasvua ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

— kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman rajoissa (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 48 kohta).

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä.

Sekä hiiren lymfoomatesti että TK-6-testi:

67. Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmalla pitoisuudella pitäisi saavuttaa 20 ja 10 prosentin välillä vaihteleva suhteellinen kokonaiskasvu / suhteellinen eloonjääneisyys. Asiantuntijat ovat yksimielisiä siitä, että on syytä suhtautua varauksellisesti, kun tulkitaan sellaisia positiivisia tuloksia, joiden mukaan suhteellinen kokonaiskasvu / suhteellinen eloonjääneisyys on vain välillä 20 tai 10 prosenttia, ja kun tulosta ei katsottaisi positiiviseksi, jos mutaationopeus lisääntyisi vain siten, että se olisi enintään 10 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä (mikäli arvioitu) (2) (59).

68. Tietyissä tilanteissa lisätiedoista voi olla apua testikemikaalin ei-mutageenisuuden selvittämisessä, jos ei ole sellaista viljelmää, johon liittyvä suhteellisen kokonaiskasvun arvo olisi 10–20 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä. Nämä tilanteet ovat seuraavat: 1) Näyttöä mutageenisuudesta ei ole (esimerkiksi ei annosvastetta, ei suurempia mutaationopeuksia kuin samanaikaisissa negatiivisissa kontrolleissa tai aikaisemmissa taustavaihteluväleissä jne.) sarjassa datapisteitä, jotka ulottuvat välille 100 prosenttia ja 20 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä ja kun vähintään yksi datapiste on välillä 20 ja 25 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä. 2) Näyttöä mutageenisuudesta ei ole (esimerkiksi ei annosvastetta, ei suurempia mutaationopeuksia kuin samanaikaisissa negatiivisissa kontrolleissa tai aikaisemmissa taustavaihteluväleissä jne.) sarjassa datapisteitä, jotka ulottuvat välille 100 prosenttia ja 25 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä ja kun on myös negatiivinen datapiste, joka on hieman alle 10 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä. Kummassakin näissä tapauksessa testikemikaalin voidaan katsoa olevan negatiivinen.

69. Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

70. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen edellä kuvatulla tavalla ja/tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvion ja /tai lisätutkimusten avulla. Kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja testiolosuhteita [esimerkiksi pitoisuusvälien muuttaminen, jotta parannetaan todennäköisyyttä saada datapisteitä, jotka sijoittuvat suhteellisen kokonaiskasvun / suhteellisen eloonjääneisyyden välille 10–20 prosenttia, muiden metabolisten aktivaatio-olosuhteiden (kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä) käyttäminen ja käsittelyn keston muuttaminen saattaa olla hyödyllistä.

71. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Tällöin testikemikaalin vaste jää epäselväksi (sen tulkitaan olevan yhtä todennäköisesti positiivinen tai negatiivinen).

TESTIRAPORTTI

72. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen pitoisuus lopullisessa kasvatusliuoksessa.

Solut:

Laboratorion kantaviljelmät:

— solujen tyyppi ja lähde sekä niiden historia testauslaboratoriossa

— karyotyypin ominaisuudet ja/tai kromosomien modaalinen lukumäärä

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät.

— mykoplasman puuttuminen

— solujen kaksinkertaistumisajat.

Testiolosuhteet:

— pitoisuuksien valintaperusteet ja soluviljelmien lukumäärä, myös esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— kasvatusliuosten koostumus, hiilidioksidipitoisuus, kosteustaso

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena kasvatusliuoksessa (esim. µg tai mg/ml tai mM kasvatusliuoksessa)

— kasvatusliuokseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubointilämpötila

— inkubointiaika

— altistuksen kesto

— solutiheys altistuksen aikana

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa viljelynesteessä, S9-jakeen laadunvalvonta)

— positiiviset ja negatiiviset kontrolliaineet, kaikkien käsittelyolosuhteiden lopulliset pitoisuudet

— ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä ja jatkoviljelmät ja kasvatusliuoksen vaihtoajat tarvittaessa)

— selektiivisen aineen tunnistetiedot ja sen pitoisuus

— hiiren lymfoomatestin käytetty versio (agar vai mikrokuoppalevy)

— testien hyväksyttävyyttä koskevat perusteet

— elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät

— sytotoksisuuden mittauksessa käytetyt menetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— inkubointiaikojen kesto maljauksen jälkeen

— pesäkkeiden määritelmät, kun pesäkkeen koko ja tyyppi on otettu huomioon (myös ”pienten” ja ”suurten” pesäkkeiden kriteerit tarvittaessa)

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— pH:n, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät, jos määritetty ja tarpeen.

Tulokset:

— altistettujen solujen lukumäärä ja jokaisesta viljelmästä jatkoviljeltyjen solujen lukumäärä

— toksisuusparametrit (hiiren lymfoomatestistä suhteellinen kokonaiskasvu ja TK6-testistä suhteellinen eloonjääneisyys)

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta

— selektiiviseen ja ei-selektiiviseen kasvatusliuokseen maljattujen solujen lukumäärä

— ei-selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien pesäkkeiden lukumäärä ja selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien resistenttien pesäkkeiden lukumäärä ja niihin liittyvät mutaationopeudet

— pesäkkeen koot negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa ja tieto siitä, onko testikemikaali positiivinen vähintään yhdellä pitoisuudella, ja siihen liittyvät mutaationopeudet

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin) ja positiivisista kontrolleista saadut tiedot (pitoisuudet ja liuottimet), myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat niiden testien lukumäärä, joihin aikaisemmat kontrollit perustuvat

— tilastoanalyysit (yksittäisistä viljelmistä ja yhdistetyistä rinnakkaisviljelmistä, jos tarpeen) sekä mahdolliset p-arvot hiiren lymfoomatestistä globaalia arviointikerrointa koskeva arviointi.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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 (TK) 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 (TK) 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. (Tekeillä oleva käsikirjoitus.)

(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. Teoksessa: 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. Teoksessa: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, s. 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). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus, Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP).

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

(54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja Brooks, A. L. (1983). (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. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, s. 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. Saatavana osoitteessa [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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneugeeni: Kemikaali tai prosessi, joka on vuorovaikutuksessa solun mitoottisen ja meioottisen jakautumissyklin vaiheiden kanssa ja johtaa solujen tai organismien aneuploidiaan.

Aneuploidia: Yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat emäsparien korvautumisen DNA:ssa.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kloonaustehokkuus: Niiden harvakseltaan maljattujen solujen prosenttiosuus, jotka pystyvät kasvamaan pesäkkeeksi, joka voidaan laskea.

Klastogeeni: Kemikaali tai prosessi, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solu- tai organismipopulaatioissa.

Sytotoksisuus: Tämän testimenetelmän mukaisissa testeissä sytotoksisuus määritellään hiiren lymfoomatestissä suhteellisen kokonaiskasvun vähenemisenä ja TK6-testissä suhteellisen eloonjääneisyyden vähenemisenä.

Forward-mutaatio: Geenin mutaatio parentaalisesta tyypistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama proteiini menettää entsymaattisen aktiivisuutensa tai tehtävänsä tai ne muuttuvat.

Lukukehyksensiirtomutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

Genotoksinen: Yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa DNA:n katkeamiselle, addukteille, uudelleenjärjestäytymiselle, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Mitoottinen rekombinaatio: Mitoosin aikana tapahtuva kahden homologisen kromatidin rekombinaatio, joka voi saada aikaan DNA:n kahden säikeen katkeamisen tai heterotsygoottisuuden häviämisen.

Mutageeninen: Aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa (-rakenteissa) tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Mutaationopeus: Todettu mutanttien solujen lukumäärä jaettuna elinkykyisten solujen määrällä.

Fenotyypin ilmentymisaika: Altistuksen jälkeinen aika, jona geneettinen muutos kiinnittyy genomiin ja mahdolliset aikaisemmat geenituotteet poistuvat siten, että fenotyyppinen ominaisuus muuttuu.

Suhteellinen eloonjääneisyys: TK6-testissä suhteellista eloonjääneisyyttä käytetään altistukseen liittyvän sytotoksisuuden mittarina. Se tarkoittaa heti solujen käsittelyn jälkeen maljattujen solujen suhteellista kloonaustehokkuutta mukautettuna mahdollisella soluhäviöllä käsittelyn aikana verrattuna negatiivisen kontrollin kloonaustehokkuuteen.

Suhteellinen suspensiokasvu (RSG): Hiiren lymfoomatestissä testiviljelmän suhteellinen kahden päivän kokonaissuspensiokasvu verrattuna negatiivisen/liuotinkontrollin kahden päivän kokonaissuspensiokasvuun (Clive ja Spector, 1975). Suhteellisen suspensiokasvun tulee sisältää testiviljelmän suhteellinen kasvu verrattuna negatiiviseen/liuotinkontrolliin käsittelyjakson aikana.

Suhteellinen kokonaiskasvu (RTG): Hiiren lymfoomatestissä suhteellista kokonaiskasvua käytetään altistukseen liittyvän sytotoksisuuden mittarina. Sillä mitataan testiviljelmien suhteellista kasvua (kantaja-ainekontrolliin verrattuna) käsittelyn aikana, kahden päivän ilmentymistä sekä testin mutanttien selektion kloonausvaiheita. Jokaisen testiviljelmän suhteellinen suspensiokasvu kerrotaan testiviljelmän suhteellisella kloonaustehokkuudella mutanttien selektion aikana, ja se ilmaistaan suhteessa negatiivisen/liuotinkontrollin kloonaustehokkuuteen (Clive ja Spector, 1975).

Maksasta eristetty S9-jae: Maksahomogenaatin supernatantti 9 000 g:n sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemätön maksanäyte.

S9-seos: Maksasta eristetyn S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Suspensiokasvu (SG): Solujen määrän kasvu hiiren lymfoomatestin käsittelyn aikana ja ilmentymisvaiheissa. Suspensiokasvu lasketaan kertomalla päivän 1 kasvu päivän 2 kasvulla lyhyen (3–4 tunnin) käsittelyn yhteydessä. Jos käytetään 24 tunnin käsittelyä, suspensiokasvu on 24 tunnin aikana tapahtunut kasvu kerrottuna ilmentymispäivinä 1 ja 2 tapahtuneella kasvulla.

Liuotinkontrolli: Yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Käsittelemättömät kontrollit: Käsittelemättömät kontrollit ovat soluviljelmiä, joita ei altisteta (eli joihin ei lisätä testikemikaalia eikä liuotinta) mutta jotka käsitellään samalla tavoin kuin testikemikaalille altistettavat viljelmät.

Lisäys 2

LASKENTAKAAVAT

Sytotoksisuus

Hiiren lymfoomatestin molemmat versiot (agar ja mikrokuoppalevy):

Sytotoksisuus määritellään suhteellisena kokonaiskasvuna (RTG), johon sisältyy suhteellinen suspensiokasvu (RSG) kahden päivän ilmentymisaikana ja suhteellinen kloonaustehokkuus (RCE) mutanttien selektion aikana. Kaikki nämä ilmoitetaan prosenttiosuuksina.

Suhteellinen suspensiokasvu (RSG) lasketaan seuraavasti: Suspensiokasvu 1 (SG_1) on kasvunopeus päivän 0 ja päivän 1 välillä (solupitoisuus päivänä 1 / solupitoisuus päivänä 0), ja suspensiokasvu 2 (SG_2) on kasvunopeus päivän 1 ja päivän 2 välillä (solupitoisuus päivänä 2 / solupitoisuus päivänä 1). Suhteellinen suspensiokasvu (RSG) on käsitellyn viljelmän kokonaissuspensiokasvu (SG_1 x SG_2) verrattuna käsittelemättömään kontrolliin / liuotinkontrolliin. Toisin sanoen: RSG = [$SG_{1(testi)}$ x $SG_{2(testi)}$] / [$SG_{1(kontrolli)}$ x $SG_{2(kontrolli)}$] SG_1 on laskettava solujen käsittelyn alussa käytetyn alkuperäisen solupitoisuuden perusteella. Tämä tarkoittaa mahdollista differentiaalista sytotoksisuutta, joka ilmenee testiviljelmässä (-viljelmissä) solujen käsittelyn aikana.

RCE on testiviljelmän suhteellinen kloonaustehokkuus verrattuna käsittelemättömän kontrollin / liuotinkontrollin suhteelliseen kloonaustehokkuuteen mutanttien selektion aikana.

Suhteellinen kokonaiskasvu (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Suhteellinen eloonjääneisyys (RS):

Sytotoksisuutta arvioidaan suhteellisella eloonjääneisyydellä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuudella (CE) heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna ja verrattuna negatiivisten kontrollien kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %). Käsittelyn aikaiseen solukatoon mukautus lasketaan näin:

$$\text{Mukautettu CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

Testikemikaalille altistetun viljelmän suhteellinen eloonjääneisyys lasketaan näin:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutaationopeus sekä hiiren lymfoomatestissä että TK-6-testissä

Mutaationopeus (MF) on selektiivisellä alustalla todettujen mutanttipesäkkeiden kloonaustehokkuus (CE_M) mukautettuna eiselektiivisen alustan kloonaustehokkuudella mutanttien selektion aikana (CE_V). Laskentakaava on siis $MF=CE_M/CE_V$. Näiden kahden kloonaustehokkuuden laskenta agar- ja mikrokuoppakloonausmenetelmiä käytettäessä kuvataan jäljempänä.

Hiiren lymfoomatestin agar-versio: Hiiren lymfoomatestin pehmeä agar -versiossa pesäkkeiden lukumäärä mutanttien selektiolevyllä (C_M) ja pesäkkeiden lukumäärä valikoimattomat- tai kloonaustehokkuus (elinkykyisten määrä) -levyllä (C_V) saadaan laskemalla kloonit suoraan. Kun 600 solua maljataan mutanttien selektiolevyille (CE_M) kloonaustehokkuutta varten (CE_V) ja valikoimattomat- tai kloonaustehokkuus (elinkykyisten määrä) -levyille ja mutanttien selektioon käytetään 3×10^6 solua, laskentakaavat ovat

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Hiiren lymfoomatestin ja TK6-testin mikrokuoppalevyversio Hiiren lymfoomatestin mikrokuoppalevyversiossa C_M ja C_V määritetään mikrokuoppien kokonaismäärän tuotteeksi (TW) ja todennäköiseksi pesäkemääräksi kuoppaa kohti (P) mikrokuoppalevyillä.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$CV = P_V \times TW_V$$

Poissonin jakauman nollaehdosta (Furth ja muut, 1981) P saadaan kaavalla

$$P = - \ln (EW / TW)$$

EW tarkoittaa tyhjiä kuoppia (empty wells) ja TW kaikkia kuoppia yhteensä (total wells). Näin ollen

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Hiiren lymfoomatestin mikrokuoppalevyversiossa pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeudet lasketaan samalla tavalla käyttämällä asianmukaista tyhjien kuoppien lukua pienistä ja suurista pesäkkeistä.

TK6-testissä pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeudet lasketaan aikaisin ja myöhään ilmaantuvien mutanttien perusteella.

B.68 LYHYTAIKAISEEN ALTISTUKSEEN PERUSTUVA IN VITRO -TESTIMENETELMÄ, JOLLA VOIDAAN MÄÄRITTÄÄ i) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA ii) KEMIKAALIT, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 491 (2017). Lyhytaikainen altistus (LA) -testimenetelmä on in vitro -menetelmä, jota voidaan käyttää tietyissä oloissa ja tietyin rajoituksin vakavia silmävaurioita aiheuttavien sekä sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten), jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, vaaraluokitukseen ja merkintöihin Yhdistyneiden kansakuntien (YK) maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa Euroopan unionin (EU) asetuksessa 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti.

2. Monien vuosien ajan kemikaalien silmävaarallisuuspotentiaalia on arvioitu ensisijaisesti käyttämällä *in vivo* -kaninsilmätestiä (TM B.5 (8), vastaa OECD:n testiohjetta 405). On yleisesti hyväksyttyä, ettei *in vivo* -kaninsilmätestiä voida korvata lähitulevaisuudessa yhdellä ainoalla vaihtoehtoisella *in vitro* -testillä, kun tavoitteena on ennustaa vakavaan silmävaurioon/silmä-ärsytykseen liittyvät vasteet kokonaisuudessaan eri kemikaaliluokissa. Kaninsilmätesti saatetaan kuitenkin voida korvata kokonaan (vaiheittaisessa) testausstrategiassa käytettävien vaihtoehtoisten testimenetelmien strategisilla yhdistelmillä (2). Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa on suunniteltu sellaisten kemikaalien testaamiseen, joilla nykyisten tietojen perusteella voidaan olettaa olevan suuri ärsyttävyyspotentiaali tai joiden voidaan odottaa aiheuttavan vakavia silmävaurioita. Alhaalta ylöspäin suuntautuvaa lähestymistapa on puolestaan suunniteltu sellaisten kemikaalien testaamiseen, joista nykyisten tietojen perusteella voidaan odottaa, etteivät ne aiheuta sellaista silmä-ärsytystä, joka vaatisi luokitusta. Vaikka lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän ei katsota korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä kokonaisuudessaan, sitä voidaan käyttää osana vaiheittaista testausstrategiaa sääntelyyn pohjautuvassa luokitus- ja merkintämenettelyssä (kuten ylhäältä alaspäin tai alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa), jotta voidaan tunnistaa ilman lisätestausta i) kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1), ja ii) kemikaalit (paitsi erittäin haihtuvat aineet ja kaikki muut kiinteät kemikaalit kuin pinta-aktiiviset aineet), jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”) (1) (2). Kemikaali, jonka ei lyhytaikaiseen altistukseen perustuvalla testimenetelmällä ennusteta aiheuttavan vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) eikä aiheuttavan vakavia silmävaurioita tai silmä-ärsytystä (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), vaatii kuitenkin lisätestausta, jotta lopullinen luokitus voidaan määrittää. Lisäksi asianmukaisilta sääntelyviranomaisilta tulisi pyytää ohjeita, ennen kuin lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa menetelmää käytetään alhaalta ylöspäin suuntautuvassa lähestymistavassa jonkin muun luokitusjärjestelmän kuin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisen järjestelmän mukaisesti. Sopivimman testimenetelmän valintaa ja kyseisen testimenetelmän käyttöä on tarkasteltava OECD:n vakavien silmävaurioiden ja silmä-ärsytyksen testausta ja arviointia koskevia yhdennettyjä lähestymistapoja käsittelevän ohjeasiakirjan yhteydessä (14).

3. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testikemikaalin silmävaarallisuuspotentiaali selvittämällä sen kyky aiheuttaa sytotoksisuutta lyhytaikaiseen altistukseen perustuvalla testimenetelmällä. Kemikaalien sytotoksinen vaikutus sarveiskalvon epiteelisoluihin on tärkeä vaikutustapa, joka johtaa sarveiskalvon epiteelin vaurioitumiseen ja silmä-ärsytykseen. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä solujen elinkykyä arvioidaan kvantitatiivisella mittauksella sen jälkeen, kun solut on uutettu sinisestä formatsaanisuolasta, jota elävät solut tuottavat muuntamalla väriaine MTT:tä (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi), joka tunnetaan myös nimellä tiatsolyylisininen (3), entsymaattisesti. Näiden solujen elinkykyä verrataan liuotinkontrolliin (suhteellinen elinkyky) ja käytetään testikemikaalin mahdollisen silmävaarallisuuden arvioimisessa. Testikemikaali luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan 1, kun sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuus johtaa solujen elinkykyyn, joka on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 70 prosenttia. Vastaavasti kemikaali luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan ”Ei luokitusta”, kun sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuus johtaa siihen, että solujen elinkyky on suurempi kuin (>) 70 prosenttia.

4. Tässä testimenetelmässä ilmauksella ’testikemikaali’ tarkoitetaan sitä, mitä testataan, eikä ilmaus liity lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän sovellettavuuteen aineiden ja/tai seosten testaamisessa. Määritelmät esitetään lisäyksessä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

5. Tämä testimenetelmä perustuu Kao Corporationin kehittämään protokollaan (4), jolle on tehty kaksi erilaista validointitutkimusta: yhden teki vaihtoehtoja eläinkokeille kehittävän Japanese Society for Alternative toAnimal

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

Experiments (JSAAE) -yhteisön validointikomitea (5) ja toisen vaihtoehtoisten menetelmien validoinnista vastaava keskus Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). Vertaisarvioinnin teki NICEATM/ICCVAM validointitutkimusraporttien ja testimenetelmän tausta-asiakirjojen perusteella (7).

6. Kun lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää käytettiin vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1 (1)), menetelmällä 125 kemikaalista (sekä aineista että seoksista) saatujen tietojen kokonaistarkkuus oli 83 prosenttia (104/125), väärien positiivisten tulosten osuus oli 1 prosentti (1/86) ja väärien negatiivisten tulosten osuus oli 51 prosenttia (20/39) verrattuna *in vivo* -kaninsilmätestiin (7). Mainittu väärien negatiivisten tulosten osuus ei ole tässä asiayhteydessä merkittävä, koska kaikki testikemikaalit, joiden aiheuttama solujen elinkyky on 5 prosentin pitoisuudella ≤ 70 prosenttia ja 0,05 prosentin pitoisuudella > 70 prosenttia, testattaisiin myös muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testimenetelmillä tai viimesijaisena vaihtoehtona *in vivo* -kaninsilmätestillä sen mukaan, mitkä ovat sääntelyvaatimukset, ja tällä hetkellä suositeltujen vaiheittaisen testausstrategian ja näyttöön perustuvien lähestymistapojen mukaisesti (1) (8). Testatut aineet olivat enimmäkseen yhdestä ainesosasta koostuvia, joskin saatavilla on myös jonkin verran tietoa seosten testaamisesta. Teknisesti testimenetelmää voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä ei havaittu erityisiä puutteita, kun sitä käytettiin testikemikaalien määrittämisessä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan 1. Tutkijoiden kannattaa siis harkita tämän testimenetelmän käyttämistä testikemikaaleihin, ja kun solujen elinkyky on sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuudella ≤ 70 prosenttia, tuloksen on katsottava viittaavan vakavia silmävaurioita aiheuttavaan vasteeseen, ja kemikaali on luokiteltava YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan 1 ilman lisätestausta.

7. Kun lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää käytettiin sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (ts. YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), menetelmällä 130 kemikaalista (sekä aineista että seoksista) saatujen tietojen kokonaistarkkuus oli 85 prosenttia (110/130), väärien negatiivisten tulosten osuus oli 12 prosenttia (9/73) ja väärien positiivisten tulosten osuus oli 19 prosenttia (11/57) verrattuna *in vivo* -kaninsilmätestiin (7). Kun aineistosta poistetaan erittäin haihtuvat aineet ja muut kiinteät aineet kuin pinta-aktiiviset aineet, kokonaistarkkuus on 90 prosenttia (92/102), väärien negatiivisten osuus 2 prosenttia (1/54) ja väärien positiivisten osuus 19 prosenttia (9/48) (7). Kun lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää käytetään sellaisten testikemikaalien tunnistamisessa, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), menetelmän puutteet ovat siis suuri väärien negatiivisten tulosten osuus i) sellaisten erittäin haihtuvien aineiden osalta, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa, ja ii) muiden kiinteiden kemikaalien (aineiden ja seosten) kuin pinta-aktiivisten aineiden ja vain niistä koostuvien seosten osalta. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää ei voida käyttää tällaisten kemikaalien testaamiseen (7).

8. Edellä 6 ja 7 kohdassa mainittujen kemikaalien lisäksi lyhytaikaiseen altistukseen perustuvalla testimenetelmällä saatu aineisto sisältää myös sisäisiä tietoja 40 seoksesta. Draizen *in vivo* -silmätestiin verrattuna tämän aineiston tarkkuus oli 88 prosenttia (35/40), väärien positiivisten tulosten osuus 50 prosenttia (5/10) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 0 prosenttia (0/30), kun tarkoituksena oli määrittää seoksia, jotka eivät vaadi luokitusta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen nojalla (9). Näin ollen lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää voidaan soveltaa sellaisten seosten määrittämiseen, jotka luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan ”Ei luokitusta” alhaalta ylöspäin suuntautuvalla lähestymistavalla, lukuun ottamatta muita kiinteitä seoksia kuin vain pinta-aktiivisista aineista koostuvia; näin siis laajennetaan sen kiinteitä aineita koskevaa rajoitusta. Lisäksi seokset, jotka sisältävät aineita, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa, on arvioitava huolellisesti, jotta vältetään mahdolliset aliennusteet, ja niille on esitettävä tapauskohtaiset perustelut.

9. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää ei voida käyttää määritettäessä sellaisia testikemikaaleja, jotka kuuluvat YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 2 tai YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 2A (silmä-ärsytys) taikka 2B (lievä silmä-ärsytys), koska huomattava määrä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1 kemikaaleista on aliennustettu luokkaan 2, 2A tai 2B ja luokan ”Ei luokitusta” kemikaaleja on yliennustettu luokkaan 2, 2A tai 2B (7). Tätä varten saattaa olla tarpeen tehdä lisää testejä muilla soveltuvilla menetelmillä.

10. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä sopii testikemikaaleille, jotka liukenevat tai suspendoituvat tasaisesti vähintään 5 minuutissa fysiologiseen suolaliuokseen, 5-prosenttiseen dimetyylisulfoksidiin (DMSO) suolaliuoksessa tai mineraaliöljyyn. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä ei sovi testikemikaaleille, jotka ovat liukenemattomia tai jotka eivät suspendoidu tasaisesti vähintään 5 minuutissa fysiologiseen suolaliuokseen, 5-prosenttiseen dimetyylisulfoksidiin (DMSO) suolaliuoksessa tai mineraaliöljyyn. Mineraaliöljyä voidaan käyttää tässä testimenetelmässä, koska altistus kestää lyhyen aikaa. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä sopii siis veteen liukenemattomien testikemikaalien (esimerkiksi pitkäketjuisten rasva-alkoholien tai ketonien) silmävaarallisuuspotentiaalin ennustamiseen, kunhan ne voidaan sekoittaa vähintään yhteen edellä ehdotetuista liuottimista (4).

11. Tässä testimenetelmässä ilmauksella 'testikemikaali' tarkoitetaan sitä, mitä testataan ([1]), eikä ilmaus liity lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän sovellettavuuteen aineiden ja/tai seosten testaamisessa.

TESTIN PERIAATE

12. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä on sytotoksisuuteen pohjautuva in vitro -testi. Se tehdään konfluenteilla yksikerroksisilla Statens Seruminstitutin kanin sarveiskalvosoluilla (SIRC-solut), joita viljellään 96-kuoppaisella polykarbonaattimikrolevyllä (4). Soluja altistetaan testikemikaalille viisi minuuttia, ja sen jälkeen sytotoksisuus mitataan kvantitatiivisesti SIRC-solujen suhteellisena elinkykynä MTT-määritystä käyttämällä (4). Solujen elinkyvyn heikentymisen perusteella ennustetaan mahdolliset haittavaikutukset, jotka aiheuttavat silmävaurion.

13. On todettu, että 80 prosenttia kanin silmään tiputetusta liuoksesta erittyy sidekalvopussin kautta 3–4 minuutin kuluessa, kun taas yli 80 prosenttia ihmisen silmään tiputetusta liuoksesta erittyy 1–2 minuutin kuluessa (10). Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän tavoitteena on arvioida nämä altistumisajat ja käyttää sytotoksisuutta päätetapahtumana, kun arvioidaan SIRC-soluihin syntyneen vaurion laajuutta viiden minuutin testikemikaalille altistuksen jälkeen.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

14. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tässä testimenetelmässä kuvattua lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla oikein taulukossa 1 suositellut 11 ainetta. Nämä aineet on valittu edustamaan kaikkia vakavan silmävaurion tai silmä-ärsytyksen vasteita *in vivo* -kaninsilmätestien (testiohje 405) tulosten ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän (1) perusteella. Muita valintaperusteita olivat esimerkiksi se, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että korkeatasoisia *in vivo* -vertailutietoja tulee olla saatavilla. Lisäksi lyhytaikaiseen altistukseen perustuvasta testimenetelmästä on oltava saatavilla korkeatasoisia *in vitro* -tietoja (3). Jos luettelossa olevaa ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaisia *in vivo*– ja *in vitro* -vertailutietoja, kunhan käytetään muuten samoja perusteita kuin tässä kuvatut.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* YK GHS/CLP-lk. ([2])	Liuotin LA-testissä	LA YK GHS/CLP-lk.
Bentsalkoniumkloridi (10 %, vesiliuos)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Luokka 1	Suolaliuos	Luokka 1

([1]) Kesäkuussa 2013 pidetyssä yhteisessä kokouksessa sovittiin, että, aina kun mahdollista, olisi ilmausta "testikemikaali" käytettävä aiempaa yhdenmukaisemmin kuvaamaan sitä, mitä testataan, uusissa ja päivitettävissä testimenetelmissä.

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* YK GHS/CLP-lk. ([2])	Liuotin LA-testissä	LA YK GHS/CLP-lk.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eetteri	Neste	Luokka 1	Suolaliuos	Luokka 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterosyklinen yhdiste; bromiyhdiste; klooriyhdiste	Kiinteä	Luokka 1	Suolaliuos	Luokka 1
Natriumhydroksidi	1310-73-2	Emäs; epäorgaaninen kemikaali	Kiinteä	Luokka 1 ([3])	Suolaliuos	Luokka 1
Butyrolaktoni	96-48-0	Laktoni; heterosyklinen yhdiste	Neste	Luokka 2A (CLP:ssä luokka 2)	Suolaliuos	Ei voida ennustaa
1-oktanoli	111-87-5	Alkoholi	Neste	Luokka 2A/B ([4]) (CLP:ssä luokka 2)	Mineraaliöljy	Ei voida ennustaa
Syklopentanoli	96-41-3	Alkoholi; hiilivety, syklinen	Neste	Luokka 2A/B ([5]) (CLP:ssä luokka 2)	Suolaliuos	Ei voida ennustaa
2-etoksietyyliasetaatti	111-15-9	Alkoholi; eetteri	Neste	Ei luokitusta	Suolaliuos	Ei luokitusta
Dodekaani	112-40-3	Hiilivety, asyklinen	Neste	Ei luokitusta	Mineraaliöljy	Ei luokitusta
Metyyli-isobutyyliketoni	108-10-1	Ketoni	Neste	Ei luokitusta	Mineraaliöljy	Ei luokitusta

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* YK GHS/CLP-lk. (2)	Liuotin LA-testissä	LA YK GHS/CLP-lk.
1,1-dimetyyliguanidiinisulfaatti	598-65-2	Amidiini; rikkiyhdiste	Kiinteä	Ei luokitusta	Suolaliuos	Ei luokitusta

(1) Kemialliset luokat määritettiin NICEATMin aikaisempien julkaisujen perusteella. Jos niitä ei ollut saatavilla, käytettiin National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) -järjestelmää (ChemIDplusin® kautta, [National Library of Medicine], saatavana osoitteessa http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) ja NICEATMin rakennemäärityksiä.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu *in vivo* -kaninsilmätestillä (OECD:n testiohje 405) ja soveltamalla YK:n GHS-järjestelmää / CLP-asetusta (1).

(3) Luokitus luokkaan 1 perustuu siihen, että natriumhydroksidin ihosyövyttävyyspotentiaali on 100 prosenttia (lueteltu pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuna kemikaalina, joka on mahdollisesti ihoa syövyttävä, OECD:n testiohjeessa 435), ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1 perusteisiin (1).

(4) Luokitus luokkaan 2A tai 2B määräytyy sen mukaan, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan. Päivänä 7 vaikutuksia on siis oltava 2 eläimellä kuudesta tai 4 eläimellä kuudesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. *In vivo* -aineistoon kuului kaksi tutkimusta, joissa kummassakin oli kolme eläintä. Ensimmäisessä tutkimuksessa kahdella eläimellä kolmesta näkyi vaikutuksia päivänä 7, minkä perusteella kemikaali luokiteltiin luokkaan 2A (11). Toisessa tutkimuksessa kaikki päätetapahtumat kaikilla kolmella eläimellä palautuivat nolla-arvoon päivään 7 mennessä. Näin ollen kemikaali luokiteltiin luokkaan 2B (12).

(5) Luokitus luokkaan 2A tai 2B määräytyy sen mukaan, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan. Päivänä 7 vaikutuksia on siis oltava 1 eläimellä kolmesta tai 2 eläimellä kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. *In vivo* -tutkimuksessa oli kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sarveiskalvon sameutta ja sidekalvon punaisuutta lukuun ottamatta kaikki päätetapahtumat palautuivat nolla-arvoon päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä täysin toipumattoman eläimen sarveiskalvon sameusarvo oli 1 ja sidekalvon punaisuusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 14 (11).

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero

MENETTELY

Yksikerroksisen soluviljelmän valmistelu

15. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä on käytettävä kanin sarveiskalvosta peräisin olevaa solulinjaa, SIRCiä. On suositeltavaa, että SIRC-solut hankitaan korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection CCL60.

16. SIRC-soluja viljellään 37 °C:n lämpötilassa 5-prosenttisessa hiilidioksidi-inkubaattorissa ja kosteutetussa ympäristössä soluviljelypullossa. Sen tulee sisältää kasvatusliuosta, jossa on Eaglen minimum essential medium (MEM) -liuosta, johon on lisätty 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS), 2 mM L-glutamiinia, 50–100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 50–100 µg/ml streptomysiiniä. Solut, jotka ovat kasvaneet soluviljelypullossa konfluenteiksi, on erotettava käyttämällä trypsiini-etyleenidiamiinitetraetikkahappoliuosta; soluraaputinta voidaan käyttää tai olla käyttämättä. Ennen solujen käyttämistä rutiinimaisessa testauksessa ne propagoidaan (esimerkiksi 2 tai 3 siirrostusta) soluviljelypullossa. Sulatuksen jälkeen saa kuitenkin tehdä enintään 25 siirrostusta.

17. Solut, jotka ovat valmiita käytettäväksi lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testissä, preparoidaan asianmukaiseen tiheyteen ja kylvetään 96-kuoppaisille levyille. Suositeltu solutiheys on $6{,}0 \times 10^3$ solua kuoppaa kohti, jos solut käytetään neljän päivän kuluttua kylvöstä, tai $3{,}0 \times 10^3$ solua kuoppaa kohti, jos solut käytetään viiden päivän kuluessa kylvöstä. Viljelytilavuus on 200 µl. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testissä käytettävät solut, jotka kylvetään kasvatusliuokseen asianmukaiseen tiheyteen, saavuttavat yli 80 prosentin konfluenssin testaushetkeen mennessä eli neljän tai viiden päivän kuluessa kylvöstä.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

18. Ensisijaisesti testikemikaalien liuottamisessa tai suspendoimisessa on käytettävä liuottimena fysiologista suolaliuosta. Jos testikemikaalin liukoisuus on huono tai jos se ei liukene tai suspendoidu tasaisesti suolaliuoksessa vähintään viiden minuutin kuluessa, toissijaisena liuotinvaihtoehtona käytetään 5-prosenttista DMSO:ta (CAS-nro 67-68-5) suolaliuoksessa. Testikemikaaleille, jotka eivät liukene tai suspendoidu tasaisesti suolaliuoksessa tai 5-prosenttisella DMSO:lla täydennetyssä suolaliuoksessa vähintään viiden minuutin kuluessa, käytetään kolmantena liuotinvaihtoehtona mineraaliöljyä (CAS-nro 8042-47-5).

19. Testikemikaalit liuotetaan tai suspendoidaan tasaisesti valittuun liuottimeen 5-prosenttisena pitoisuutena (v/v). Sen jälkeen niitä laimennetaan 10-kertaisena sarjalaimennoksena 0,5 prosentin ja 0,05 prosentin pitoisuuteen. Kukin testikemikaali on testattava sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuutena. Solut, joita viljellään 96-kuoppaisella levyllä, altistetaan (tilavuus 200 µl/kuoppa) joko 5-prosenttiselle tai 0,05-prosenttiselle pitoisuudelle testikemikaaliliuosta (tai -suspensiota) viiden minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Testikemikaaleja (yhdestä ainesosasta koostuva aineet tai useasta ainesosasta koostuvat aineet tai seokset) pidetään laimentamattomina aineina, ja ne laimennetaan tai suspendoidaan menetelmän mukaan niiden puhtaudesta riippumatta.

20. Edellä 16 kohdassa kuvattua kasvatusliuosta käytetään kasvatusliuoskontrollina jokaisella levyllä jokaisessa toistossa. Lisäksi solut altistetaan myös liuotinkontrollinäytteille jokaisella levyllä jokaisessa toistossa. Edellä 18 kohdassa luetelluista liuottimista on vahvistettu, etteivät ne vaikuta haitallisesti SIRC-solujen elinkykyyn.

21. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä on käytettävä 0,01-prosenttista natriumlauryylisulfaattia (SLS) suolaliuoksessa positiivisena kontrollina jokaisella levyllä jokaisessa toistossa. Jotta voidaan laskea positiivisen kontrollin solujen elinkyky, jokaisen toiston jokaisella levyllä on oltava myös suolaliuosliuotinkontrolli.

22. Nollanäyte on tarpeen optisen tiheyden kompensaation määrittämiseksi, ja se on tehtävä kuopille, jotka sisältävät pelkästään fosfaattipuskuroitua suolaliuosta mutta eivät kalsiumia ja magnesiumia (PBS) tai soluja.

23. Jokainen näyte (testikemikaali 5-prosenttisena ja 0,05-prosenttisena pitoisuutena, kasvatusliuoskontrolli, liuotinkontrolli sekä positiivinen kontrolli) on testattava kolmena rinnakkaisnäytteenä jokaisessa toistossa: solut on altistettava 200 µl:lle asianmukaista testi- tai kontrollikemikaalia viiden minuutin ajan huoneenlämpötilassa.

24. Vertailuaineet ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyspotentiaalia tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyspotentiaalia tietyllä ärsytysvastealueella.

Solujen elinkyvyn mittaus

25. Altistuksen jälkeen solut pestään kahdesti 200 µl:lla PBS:ää, ja siihen lisätään 200 µl MTT-liuosta (0,5 mg MTT:tä millilitrassa kasvatusliuosta). Liuoksen annetaan olla kaksi tuntia inkubaattorissa (37 °C, 5 % CO_2). Sen jälkeen MTT-liuos dekantoidaan ja MTT-formatsaani uutetaan lisäämällä 200 µl 0,04 N hydrokloorihappo-isopropanolia ja antamalla liuoksen olla 60 minuuttia pimeässä huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen MTT-formatsaaniliuoksen absorbanssi mitataan 570 nm:n alueella mikrolevylukijalla. Testikemikaalit häiritsevät MTT-määritystä (väriaineilla tai suorilla MTT:n pelkistimillä) vain, jos testausjärjestelmään jää huomattavia määriä testikemikaalia altistuksen jälkeisen huuhtelun jälkeen. Tämä koskee kolmiulotteisesti rekonstruoitua ihmisen sarveiskalvokudosta tai rekonstruoitua orvaskesikudosta, mutta tällä ei ole merkitystä lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä käytettävien kaksiulotteisten soluviljelmien yhteydessä.

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

26. Jokaisesta testikemikaalista saatuja optisen tiheyden arvoja käytetään solujen elinkyvyn laskemiseen suhteessa liuotinkontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 prosenttia. Solujen suhteellinen elinkyky ilmaistaan prosenttiosuutena, ja se saadaan jakamalla testikemikaalin optinen tiheys liuotinkontrollin optisella tiheydellä sen jälkeen, kun kummastakin arvosta on vähennetty nollanäytteen optinen tiheys.

$$Solun\ elinkyky(\%) = \frac{(OD_{570}\ testikemikaalin) - (OD_{570}\ nollanäytteen)}{(OD_{570}\ liuotinkontrollin) - (OD_{570}\ nollanäytteen)} \times 100$$

Myös kunkin liuotinkontrollin solujen suhteellinen elinkyky ilmaistaan prosenttiosuutena, ja se saadaan jakamalla kunkin liuotinkontrollin optinen tiheys kasvatusliuoskontrollin optisella tiheydellä sen jälkeen, kun kummastakin arvosta on vähennetty nollanäytteen optinen tiheys.

27. Kolme itsenäistä toistoa, joista kukin sisältää kolme rinnakkaisnäytekuoppaa (ts. n=9), on tehtävä. Solujen suhteellisen elinkyvyn aritmeettinen keskiarvo lasketaan käyttämällä jokaisen testikemikaalin ja liuotinkontrollin kolmen kuopan aritmeettista keskiarvoa jokaisesta itsenäisestä toistosta. Solujen elinkyvyn lopullinen aritmeettinen keskiarvo lasketaan kolmen itsenäisen toiston perusteella.

28. Seuraavassa on esitetty solujen elinkyvyn raja-arvot, joiden avulla voidaan tunnistaa sellaiset testikemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1), sekä testikemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka "Ei luokitusta").

Taulukko 2

LA-testimenetelmän ennustemalli

Solujen elinkyky		YK:n GHS-järj. / CLP-as. mukainen luokitus	Sovellettavuus
Pitoisuus 5 %	Pitoisuus 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Ei luokitusta	Aineet ja seokset, lukuun ottamatta näitä: i) erittäin haihtuvat aineet, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa [1], ja ii) muut kiinteät kemikaalit (aineet ja seokset) kuin pinta-aktiiviset aineet ja vain niistä koostuvat seokset
≤ 70 %	> 70 %	Ei voida ennustaa	Ei sovellettavissa
≤ 70 %	≤ 70 %	Luokka 1	Aineet ja seokset [2]

[1] Seokset, jotka sisältävät aineita, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa, on arvioitava huolellisesti, jotta vältetään mahdolliset aliennusteet, ja niille on esitettävä tapauskohtaiset perustelut.

[2] Pääasiassa yhdestä ainesosasta koostuvista aineista saatujen tulosten perusteella, joskin myös seosten testaamisesta on jonkin verran tietoa. Teknisesti testimenetelmää voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta muodostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

Hyväksymisperusteet

29. Testitulosten katsotaan olevan hyväksyttäviä, mikäli kaikki seuraavat perusteet täyttyvät:

a) Kasvatusliuoskontrollin (altistus kasvatusliuokselle) optisen tiheyden on oltava 0,3 tai enemmän nollanäytteen optisen tiheyden vähentämisen jälkeen.

b) Liuotinkontrollin solujen elinkyvyn on oltava 80 prosenttia tai enemmän kasvatusliuoskontrolliin nähden. Jos jokaisessa toistossa käytetään useita liuotinkontrolleja, solujen elinkyvyn on oltava jokaisessa niistä yli 80 prosenttia, jotta näillä liuottimilla testattujen testikemikaalien testaus voitaisiin hyväksyä.

c) Positiivisen kontrollin (0,01-prosenttinen SLS) solujen elinkyvyn pitäisi olla kahden keskihajonnan etäisyydellä historiallisesta keskiarvosta. Positiivisen kontrollin ylempi ja alempi hyväksymisraja on päivitettävä säännöllisesti, esimerkiksi kolmen kuukauden välein tai joka kerta, kun laboratorioissa, joissa näitä testejä tehdään epäsäännöllisesti (harvemmin kuin kerran kuussa), tehdään hyväksyttävä testi. Jos laboratorio ei tee riittävästi kokeita, jotta voitaisiin vahvistaa tilastollisesti luotettava positiivisen kontrollin jakauma, se voi käyttää menetelmän käyttäjän vahvistamaa ylempää ja alempaa hyväksymisrajaa (ts. 21,1 ja 62,3 prosentin välillä) laboratorion aikaisempien tietojen perusteella ja määrittää sisäisen jakauman ensimmäisten rutiinimaisten testien aikana.

d) Kolmen itsenäisen toiston perusteella johdetun solujen lopullisen elinkyvyn keskihajonnan on oltava alle 15 prosenttia testikemikaalin kummankin pitoisuuden (5 % ja 0,05 %) osalta.

Jos yksi tai useampi näistä perusteista ei täyty, tulokset on hylättävä ja on tehtävä toiset kolme itsenäistä toistoa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

30. Tiedot jokaisen toiston jokaisesta yksittäisestä kuopasta (esimerkiksi solujen elinkykyarvot) sekä kokonaiskeskiarvo, keskihajonta ja luokitus on ilmoitettava.

Testiraportti

31. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrolliaineet

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset: mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemialliset tunnistetiedot (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

— fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, pH, logP-arvo, molekyylipaino, kemiallinen luokka ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Testimenetelmän mukaiset olosuhteet ja menettelyt

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testimenetelmästä

— käytetty solulinja, sen lähde, siirrostusten lukumäärä ja testaukseen käytettyjen solujen konfluenssi

— käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti

— toistojen ja rinnakkaisnäytteiden määrä

— testikemikaalin käytetyt pitoisuudet (jos muut kuin suositellut)

— perustelut liuottimen valinnalle kunkin testikemikaalin osalta

— testikemikaalille altistuksen kesto (jos muu kuin suositeltu)

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— tiedot positiivisen kontrollin aikaisemmasta keskiarvosta ja keskihajonnasta:

— osoitus laboratorion pätevyydestä testimenetelmän käyttämisessä (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla testaus) tai osoitus testimenetelmän suorituskyvyn toistuvuudesta pidemmällä aikavälillä.

Tulokset

— Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolliaineesta sekä jokaisesta testipitoisuudesta on esitettävä seuraavat tiedot taulukossa: yksittäiset optisen tiheyden arvot rinnakkaisnäytekuoppaa kohti, optisen tiheyden arvojen aritmeettinen keskiarvo jokaisesta itsenäisestä toistosta, solujen prosentuaalinen elinkyky jokaisesta itsenäisestä toistosta sekä solujen prosentuaalisen elinkyvyn lopullinen aritmeettinen keskiarvo ja keskihajonta kolmesta toistosta.

— Kasvatusliuos- ja liuotinkontrollien sekä positiivisen kontrollin tulokset, jotka osoittavat, että tutkimuksen hyväksymisperusteet ovat asianmukaiset

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista

— Ennustemallin/päätöksentekoperusteiden pohjalta tehty luokitus.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (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. Saatavana osoitteesta 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, s. 1855–1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Saatavana osoitteesta [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Tässä liitteessä oleva B.5 luku, Akuutti silmän ärsyttävyys/syövyttävyys

(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.

Liite

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (13).

Vertailuaine: Testikemikaalin vertailustandardina käytettävä aine. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavien aineiden luokkaan kuuluvilla aineilla, iii) tunnetut fysikaaliset/kemialliset ominaisuudet, iv) tukevia tietoja tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellun vasteen vaihteluvälillä.

Alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään testikemikaalille, jonka ei oleteta vaativan luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta (negatiivinen tulos), ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai seos.

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle ja jotka korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautuvat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Kaikkien positiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Vaara: Aineen tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Kasvatusliuoskontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

MTT: 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi, tiatsolyylisininen.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka aineosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

OD: Optinen tiheys.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (10).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (13).

Herkkyys: Kaikkien positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (10).

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautumattomat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (13).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Pinta-aktiivinen aine: Kemikaali, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita. Tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen näyttöön perustuvaa prosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsyttävyys voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, lisätestausta ei tarvita. Jos testikemikaalin ärsyttävyyttä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määrittää aukottomasti.

Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että testikemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (positiivinen tulos), ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1: Ks. ”vakava silmävaurio”.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2: Ks. ”silmä-ärsytys”.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”: Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1 tai 2 (tai luokkiin 2A tai 2B).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

B.69 **REKONSTRUOITUUN IHMISEN SARVEISKALVON KALTAISEEN EPITEELIIN (RhCE) PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ SELLAISTEN KEMIKAALIEN MÄÄRITTÄMISEEN, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA JA MERKINTÖJÄ SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 492 (2017). *Vakava silmävaurio* tarkoittaa silmän kudosvauriota tai vakavaa fyysistä näön heikentymistä, joka syntyy, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta Yhdistyneiden kansakuntien (YK) maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (YK:n GHS-järjestelmä) (1) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa Euroopan unionin (EU) asetuksessa 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti. *Silmä-ärsytys* tarkoittaa YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaan silmän muutoksia, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, ja jotka korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vakavia silmävaurioita aiheuttavat testikemikaalit luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkaan 1, kun taas silmä-ärsytystä aiheuttavat kemikaalit luokitellaan GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkaan 2. Testikemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, on määritelty kemikaaleiksi, jotka eivät täytä vaatimuksia, jotta ne voisi luokitella YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) kemikaaleiksi, joten ne kuuluvat YK:n GHS-järjestelmän tai CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan ”Ei luokitusta”.

2. Vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen arviointi on yleensä edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (TM B.5, 2 kohta). Sopivimman testimenetelmän valintaa ja kyseisen testimenetelmän käyttöä on tarkasteltava OECD:n vakavien silmävaurioiden ja silmä-ärsytyksen testausta ja arviointia koskevia yhdennettyjä lähestymistapoja koskevan ohjeasiakirjan yhteydessä (39).

3. Tässä testimenetelmässä kuvataan *in vitro* -menetelmä, jolla voidaan määrittää sellaiset kemikaalit (aineet ja seokset), jotka eivät vaadi luokitusta ja merkintöjä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti. Siinä käytetään rekonstruoitua ihmisen sarveiskalvon kaltaista epiteeliä (RhCE:tä), joka jäljittelee tarkasti ihmisen sarveiskalvon epiteelin histologisia, morfologisia, biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Neljä muuta *in vitro* -testimenetelmää on validoitu, katsottu tieteellisesti valideiksi ja hyväksytty testimenetelmiksi B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) ja B.68 (6), joilla voidaan tarkastella vakavaa silmävauriota / silmä-ärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä päätetapahtumana.

4. Tähän testimenetelmään sisältyy kaksi validoitua testiä, joissa käytetään kaupallisesti saatavilla olevia RhCE-malleja. Silmä-ärsytyksen / vakavan silmävaurion arviointiin on tehty validointitutkimuksia (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13), joissa on käytetty EpiOcular™-silmä-ärsytystestiä ja SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) -silmä-ärsytystestiä. Kummassakin näissä testissä käytetään kaupallisesti saatavia RhCE-kudosmalleja testijärjestelmänä. Niistä käytetään jäljempänä nimitystä validoitu vertailumenetelmä, VVM 1 ja VVM 2. Näiden validointitutkimusten ja niiden riippumattoman vertaisarvioinnin (9) (12) perusteella todettiin, että EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesteillä voidaan määrittää oikein ne kemikaalit (sekä aineet että seokset), jotka eivät vaadi luokitusta ja merkintöjä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän mukaisesti, ja testejä pidettiin tieteellisesti valideina tähän tarkoitukseen (13).

5. Tällä hetkellä on yleisesti hyväksyttyä, ettei Draizen *in vivo* -silmätestiä (2) (14) voida täysin korvata lähitulevaisuudessa yhdellä ainoalla *in vitro* -testillä, kun tavoitteena on ennustaa vakavaan silmävaurioon/silmä-ärsytykseen liittyvät vasteet kokonaisuudessaan eri kemikaaliluokissa. Draizen silmätesti saatetaan kuitenkin voida korvata kokonaan yhdistelemällä strategisesti useita vaihtoehtoisia (vaiheittaisiin) testausstrategioihin kuuluvia testimenetelmiä, kuten alhaalta ylöspäin tai ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa (15). Alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa (15) on tarkoitettu käytettäväksi silloin, kun kemikaalin ei nykyisten tietojen perusteella oleteta aiheuttavan siinä määrin silmä-ärsytystä, että se vaatisi luokitusta. Ylhäältä alaspäin suuntautuvaa lähestymistapaa (15) on puolestaan määrä käyttää silloin, kun kemikaalin oletetaan nykyisten tietojen perusteella aiheuttavan vakavia silmävaurioita. EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestejä suositellaan käytettäväksi, kun tavoitteena on määrittääne

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti (”Ei luokitusta”) ilman lisätestausta, kun testausstrategiana on esimerkiksi Scottin ja muiden ehdottama alhaalta ylöspäin tai ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa (esimerkiksi ensimmäinen vaihe alhaalta ylöspäin suuntautuvassa lähestymistavassa tai yhtenä viimeisistä vaiheista ylhäältä alaspäin suuntautuvassa lähestymistavassa) (15). EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestejä ei ole kuitenkaan tarkoitettu tekemään eroa YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1 (vakava silmävaurio) ja luokan 2 (silmä-ärsytys) välille. Tämä ero pitää tehdä testausstrategian toisessa vaiheessa (15). Testikemikaali, josta EpiOcular™- tai SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti osoittaa, että tarvitaan luokitusta silmä-ärsytyksen / vakavan silmävaurion osalta, vaatii siis lisätestausta (*in vitro* ja/tai *in vivo*), jotta lopullinen luokituspäätös voidaan tehdä (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka Ei luokitusta, luokka 2 tai luokka 1), käyttäen esimerkiksi testimenetelmiä B.47, B.48, B.61 tai B.68.

6. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettely, jolla arvioidaan testikemikaalin silmävaarallisuuspotentiaali selvittämällä sen kyky aiheuttaa sytotoksisuutta RhCE-kudosmallissa MTT-määrityksellä mitattuna (16) (ks. 21 kohta). RhCE-kudoksen elinkyky testikemikaalille altistuksen jälkeen määritetään vertaamalla sitä kudoksiin, jotka on käsitelty negatiivisella kontrolliaineella (prosentuaalinen elinkyky), ja näin saadulla arvolla ennustetaan testikemikaalin silmävaarallisuuspotentiaali.

7. Saatavilla on suoritusvaatimukset (17), jotka helpottavat uusien tai muokattujen RhCE-pohjaisten *in vitro* -testien, jotka ovat samanlaisia kuin EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestit, validointia OECD:n ohjeasiakirjan nro 34 (18) periaatteiden mukaisesti. Niiden avulla myös OECD:n testiohjetta 492 voidaan muuttaa oikea-aikaisesti lisäämällä suorituskykyvaatimukset näihin ohjeisiin. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data, MAD) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten mukaisesti validoitujen testien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt ne vastaavaan testiohjeeseen.

MÄÄRITELMÄT

8. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

9. Tämä testimenetelmä perustuu kaupallisiin kolmiulotteisiin RhCE-kudosmalleihin, joita valmistetaan käyttämällä joko ihmisen orvaskeden keratinosyyttejä (ts. EpiOcular™ OCL-200) tai ihmisen immortalisoituja sarveiskalvon epiteelisoluja (ts. SkinEthic™ HCE/S). EpiOcular™ OCL-200- ja SkinEthic™ HCE/S -RhCE-kudosmallit ovat samankaltaisia kuin sarveiskalvon epiteelin kolmiulotteinen rakenne *in vivo*, ja ne valmistetaan käyttämällä kohdelajilta peräisin olevia soluja (19) (20). Lisäksi näillä testeillä mitataan suoraan sytotoksisuutta, joka johtuu siitä, että kemikaali läpäisee sarveiskalvon ja aiheuttaa näin solu- ja kudosvaurioita. Vakava silmävaurio / silmä-ärsytys *in vivo* määritetään kokonaisuudessaan sytotoksisen vasteen perusteella. Soluvauriot voivat johtua monenlaisista vaikutustavoista (ks. 20 kohta), mutta sytotoksisuudella on tärkeä, ellei jopa tärkein, mekanistinen rooli määritettäessä vakavaan silmävaurioon / silmä-ärsytykseen liittyvää kokonaisvastetta kemikaalille (se näkyy *in vivo* pääasiassa sarveiskalvon sameutena, värikalvotulehduksena, sidekalvon punoituksena ja/tai kemoosina) riippumatta kudosvaurion taustalla olevista fysikaalis-kemiallisista prosesseista.

10. Tämän testimenetelmän validointitutkimuksessa on testattu laaja joukko kemikaaleja, jotka kattavat hyvin monenlaisia kemikaalityyppejä, kemiallisia luokkia, molekyylipainoja, logP-arvoja, kemiallisia rakenteita jne. EpiOcular™-silmä-ärsytystestin validointitietokanta sisälsi yhteensä 113 kemikaalia, jotka kattavat 95 erilaista orgaanista funktionaalista ryhmää OECD:n QSAR-työkalupakilla tehdyn analyysin mukaisesti (8). Suurin osa näistä kemikaaleista oli yhdestä ainesosasta koostuvia aineita, mutta tutkimukseen sisältyi myös monta useasta ainesosasta koostuvaa ainetta (esimerkiksi kolme homopolymeeriä, viisi kopolymeeriä ja 10 kvasipolymeeriä). Fysikaalisen olomuodon ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkien osalta 113 testattua kemikaalia jakautuivat näin: 13 luokan 1 nestettä, 15 luokan 1 kiinteää ainetta, 6 luokan 2A nestettä, 10 luokan 2A kiinteää ainetta, 7 luokan 2B nestettä, 7 luokan 2B kiinteää ainetta, 27 luokan ”Ei luokitusta” nestettä ja 28 luokan ”Ei luokitusta” kiinteää ainetta (8). SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestin validointitietokanta sisälsi yhteensä 200 kemikaalia, jotka kattavat 165 erilaista orgaanista funktionaalista ryhmää (8) (10) (11). Suurin osa näistä kemikaaleista oli yhdestä ainesosasta koostuvia aineita, mutta tutkimukseen sisältyi myös monta useasta ainesosasta koostuvaa ainetta (esimerkiksi 10 polymeeriä). Fysikaalisen olomuodon ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkien osalta 200 testattua kemikaalia jakautuivat näin: 27 luokan 1 nestettä, 24 luokan 1 kiinteää ainetta, 19 luokan 2A nestettä, 10 luokan 2A kiinteää ainetta, 9 luokan 2B nestettä, 8 luokan 2B kiinteää ainetta, 50 luokan ”Ei luokitusta” nestettä ja 53 luokan ”Ei luokitusta” kiinteää ainetta (10) (11).

11. Tätä testimenetelmää voidaan käyttää aineisiin ja seoksiin sekä kiinteisiin aineisiin, nesteisiin, puolikiinteisiin aineisiin ja vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauheeksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Validointitutkimuksessa ei ole arvioitu kaasuja ja aerosoleja. Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata RhCE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei voida kuitenkaan testata.

12. Testikemikaalit, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituudella kuin MTT-formatsaani (luonnostaan tai käsittelyn jälkeen), ja testikemikaalit, jotka voivat suoraan pelkistää MTT-vitaaliväriä (MTT-formatsaaniksi), voivat häiritä kudoksen elinkykymittauksia, ja niiden yhteydessä on käytettävä mukautettuja kontrolleja korjauksiin. Mahdollisesti tarvittavien mukautettujen kontrollien tyyppi vaihtelee sen mukaan, millaista häiriötä testikemikaali tuottaa ja mitä menetelmää MTT-formatsaanin kvantifioinnissa käytetään (ks. 36–42 kohta).

13. Validointia edeltävistä (21) (22) ja täysimittaisista validointitutkimuksista (8) (10) (11) saadut tulokset ovat osoittaneet, että sekä EpiOcular™-silmä-ärsytystesti että SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti ovat siirrettävissä laboratorioihin, jotka eivät ole tehneet näitä testejä aikaisemmin, ja että ne ovat myös toistettavissa samoissa laboratorioissa ja eri laboratorioissa. Näiden tutkimusten perusteella toistettavuuden (EpiOcular™-silmä-ärsytystestillä odotuksenmukaisten ennusteiden vastaavuus) suuruusluokka on 113:a kemikaalia koskevien tietojen perusteella noin 95 prosenttia samassa laboratoriossa ja 93 prosenttia eri laboratorioissa. Toistettavuuden (SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestillä odotuksenmukaisten ennusteiden vastaavuus) suuruusluokka on 120:tä kemikaalia koskevien tietojen perusteella noin 92 prosenttia samassa laboratoriossa ja 95 prosenttia eri laboratorioissa.

14. EpiOcular™-silmä-ärsytystestiä voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta. Validointitutkimuksesta (8) saatujen tietojen perusteella EpiOcular™-silmä-ärsytystestin kokonaistarkkuus on 80 prosenttia (112 kemikaalin perusteella), herkkyys 96 prosenttia (57 kemikaalin perusteella), väärien negatiivisten tulosten osuus 4 prosenttia (57 kemikaalin perusteella), spesifisyys 63 prosenttia (55 kemikaalin perusteella) ja väärien positiivisten tulosten osuus on 37 prosenttia (55 kemikaalin perusteella) verrattuna *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä saatuihin tietoihin (TM B.5) (2) (14), jotka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti. Tutkimus, jossa EpiOcular™-silmä-ärsytystestillä testattiin 97 nestemäistä maatalouskemikaaleihin kuuluvaa valmistetta, osoitti, että testimenetelmä toimi samalla tavalla tämäntyyppisten seosten kanssa kuin validointitutkimuksessa (23). Nämä 97 valmistetta jakautuivat näin: 21 valmistetta luokkaan 1, 19 valmistetta luokkaan 2A, 14 valmistetta luokkaan 2B ja 43 valmistetta luokkaan ”Ei luokitusta”, kun ne luokiteltiin YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaan *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä saatujen tietojen perusteella (TM B.5) (2) (14). Testistä saatiin seuraavat arvot: kokonaistarkkuus 82 prosenttia (97 valmisteen perusteella), herkkyys 91 prosenttia (54 valmisteen perusteella), väärien negatiivisten tulosten osuus 9 prosenttia (54 valmisteen perusteella), spesifisyys 72 prosenttia (43 valmisteen perusteella) ja väärien positiivisten tulosten osuus 28 prosenttia (43 valmisteen perusteella) (23).

15. SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestiä voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta. Validointitutkimuksesta (10) (11) saatujen tietojen perusteella SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestin kokonaistarkkuus on 84 prosenttia (200 kemikaalin perusteella), herkkyys 95 prosenttia (97 kemikaalin perusteella), väärien negatiivisten tulosten osuus 5 prosenttia (97 kemikaalin perusteella), spesifisyys 72 prosenttia (103 kemikaalin perusteella) ja väärien positiivisten tulosten osuus on 28 prosenttia (103 kemikaalin perusteella) verrattuna *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä saatuihin tietoihin (TM B.5) (2) (14), jotka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti.

16. Kummallakin RhCE-testillä joko aineilla tai seoksilla saatujen väärien negatiivisten tulosten osuudet sijoittuvat 12 prosentin yleiseen todennäköisyyteen, jonka mukaan kemikaalit luokitellaan Draizen silmätestillä toistuvissa testeissä joko YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkaan 2 tai luokkaan ”Ei luokitusta”; tämä johtuu menetelmän luontaisesta testinsisäisestä vaihtelusta (24). Kummallakin RhCE-testimenetelmällä joko aineista tai seoksista saatujen väärien positiivisten tulosten osuus ei ole tämän testimenetelmän yhteydessä merkittävä, koska kaikki testikemikaalit, joiden aiheuttama kudoksen elinkyky on yhtä suuri tai pienempi kuin määritetyt raja-arvot (ks. 44 kohta), edellyttävät lisätestausta muilla *in vitro* -testimenetelmillä tai viimesijaisena vaihtoehtona kaneilla (sääntelyvaatimusten mukaan) käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja näyttöön perustuvaa lähestymistapaa. Näitä testimenetelmiä voidaankäyttää

kaikentyyppisille kemikaaleille, ja negatiivinen tulos tarkoittaa sitä, ettei kemikaalia tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”). Asianmukaisilta sääntelyviranomaisilta tulee pyytää ohjeita, ennen kuin EpiOcular™-silmä-ärsytystestiä tai SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestiä käytetään jonkin muun luokitusjärjestelmän kuin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisen järjestelmän mukaisesti.

17. Tämän testimenetelmän rajoitus on se, ettei sillä voida erotella silmä-ärsytystä / silmään kohdistuvia korjaantuvia vaikutuksia (luokka 2) ja vakavaa silmävaurioita / silmään kohdistuvia korjaantumattomia vaikutuksia (luokka 1) siten kuin ne on määritelty YK:n GHS-järjestelmässä ja CLP-asetuksessa, eikä silmiä ärsyttäviä aineita (valinnainen luokka 2A) ja lievästi silmiä ärsyttäviä aineita (valinnainen luokka 2B) siten kuin ne on määritelty YK:n GHS-järjestelmässä (1). Näiden erotteleminen edellyttää lisätestausta muilla *in vitro* -testimenetelmillä.

18. Tässä testimenetelmässä ilmauksella ’testikemikaali’ tarkoitetaan sitä, mitä testataan ([2]), eikä ilmaus liity RhCE-testimenetelmän sovellettavuuteen aineiden ja/tai seosten testaamisessa.

TESTIN PERIAATE

19. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti vähintään kahdelle kolmiulotteiselle RhCE-kudosmallille, ja kudoksen elinkyky mitataan altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubointijakson jälkeen. RhCE-kudokset rekonstruoidaan ihmisen orvaskeden keratinosyyteistä tai ihmisen immortalisoiduista sarveiskalvon epiteelisoluista, joita on viljelty useita päiviä, jotta ne muodostaisivat kerrostuneen ja pitkälle erilaistuneen levyepiteelin, joka on morfologisesti samanlainen kuin ihmisen sarveiskalvossa. EpiOcular™-RhCE-kudosmalli koostuu vähintään kolmesta elinkykyisestä solukerroksesta ja keratinisoitumattomasta pintakerroksesta, ja sen rakenne on samankaltainen kuin sarveiskalvossa *in vivo*. SkinEthic™ HCE -RhCE-kudosmalli taas koostuu vähintään neljästä elinkykyisestä solukerroksesta, joihin sisältyy lieriömäisiä tyvisoluja, välimuotoisia siipisoluja ja pinnallisia levyepiteelisoluja. Ne ovat samanlaisia kuin normaalissa ihmisen sarveiskalvon epiteelissä (20) (26).

20. Kemikaalin aiheuttama vakava silmävaurio / silmä-ärsytys, joka näkyy in vivo pääasiassa sarveiskalvon sameutena, värikalvotulehduksena, sidekalvon punoituksena ja/tai kemoosina, johtuu tapahtumasarjasta, joka alkaa siitä, että kemikaali läpäisee sarveiskalvon ja/tai sidekalvon ja vaurioittaa soluja. Soluvaurio voi aiheutua monella vaikutustavalla, joita ovat esimerkiksi nämä: solukalvon hajoaminen (aiheuttajina esimerkiksi pinta-aktiiviset aineet, orgaaniset liuottimet), makromolekyylien (varsinkin proteiinien) koagulaatio (aiheuttajina esimerkiksi pinta-aktiiviset aineet, orgaaniset liuottimet, emäkset ja hapot), lipidien saippuoituminen (aiheuttajina esimerkiksi emäkset) ja alkylointi tai muut kovalentit yhteisvaikutukset makromolekyylien kanssa (aiheuttajina esimerkiksi valkaisuaineet, peroksidit ja alkyloivat aineet) (15) (27) (28). On kuitenkin osoitettu, että sytotoksisuudella on tärkeä, ellei jopa tärkein, mekanistinen rooli määritettäessä vakavaan silmävaurioon / silmä-ärsytykseen liittyvää kokonaisvastetta kemikaalille riippumatta kudosvaurion taustalla olevista fysikaalis-kemiallisista prosesseista (29) (30). Kemikaalin vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen aiheuttamispotentiaali määritetään ensisijaisesti alkuvaurion laajuuden perusteella (31). Se korreloi solukuoleman laajuuden (29) ja myöhempien vasteiden ja mahdollisten seurausten kanssa (32). Hyvin lievästi ärsyttävät aineet vaikuttavat yleensä vain sarveiskalvon epiteelin pintakerrokseen, lievästi ja kohtalaisesti ärsyttävät aineet vaurioittavat pääasiassa epiteeliä ja pinnallista tukikerrosta, ja voimakkaasti ärsyttävät aineet vaurioittavat epiteeliä, syvemmällä olevaa tukikerrosta ja toisinaan myös sarveiskalvon endoteelia (30) (33). RhCE-kudosmallin elinkyvyn mittaaminen sen jälkeen, kun se on altistettu paikallisesti testikemikaalille sellaisten kemikaalien tunnistamiseksi, joita ei tarvitse luokitella vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen osalta (YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), perustuu oletukseen, että kaikki kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita tai silmä-ärsytystä, aiheuttavat sytotoksisuutta sarveiskalvon epiteelissä ja/tai sidekalvoilla.

([2]) Kesäkuussa 2013 pidetyssä OECD:n yhteisessä kokouksessa sovittiin, että, aina kun mahdollista, olisi ilmausta ”testikemikaali” käytettävä aiempaa yhdenmukaisemmin kuvaamaan sitä, mitä testataan, uusissa ja päivitettävissä testiohjeissa.

21. RhCE-kudoksen elinkykyä mitataan yleensä sillä, miten elinkykyiset solut muuttavat vitaaliväri MTT:n [3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi; tiatsolyylisininen; CAS-nro 298-93-1] entsymaattisella konversiolla siniseksi MTT-formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti kudoksista uuttamisen jälkeen (16). Sellaisia kemikaaleja, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen (ei luokitusta) mukaan, ovat ne, jotka eivät pienennä kudoksen elinkykyä määritettyä raja-arvoa pienemmäksi (ts. kudoksen elinkyky > 60 % EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE EITL -silmä-ärsytystestissä ([3]) tai > 50 % SkinEthic™ HCE EITS -silmä-ärsytystestissä ([4])) (ks. 44 kohta).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

22. Ennen kuin laboratoriot alkavat käyttää RhCE-testejä sääntelytarkoituksiin rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 1 luetellut 15 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta oikein. Nämä kemikaalit valittiin validoitujen vertailumenetelmien validointitutkimuksissa käytetyistä kemikaaleista (8) (10) (11). Valikoima sisältää mahdollisuuksien mukaan kemikaaleja, jotka i) edustavat eri fysikaalisia olomuotoja, ii) kattavat kaikki vakavaan silmävaurioon / silmä-ärsytykseen liittyvät *in vivo* -vasteet, jotka perustuvat *in vivo* -kanin-silmävertailutestistä (TM B.5) saatuihin korkeatasoisiin tuloksiin ja YK:n GHS-luokitusjärjestelmään (ts. luokat 1, 2A, 2B tai ei luokitusta) (1) ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmään (ts. luokat 1, 2 tai ei luokitusta), iii) täyttävät eri *in vivo* -luokitusperusteet (24) (25), iv) edustavat validointitutkimuksessa käytettyjä kemiallisia luokkia (8) (10) (11), v) edustavat hyvin ja laajalti orgaanisia funktionaalisia ryhmiä (8) (10) (11), vi) ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä (8) (10) (11), vii) ovat värillisiä ja/tai suoria MTT:n pelkistimiä, viii) tuottivat toistettavissa olevia tuloksia RhCE-testimenetelmillä niiden validoinnin aikana, ix) luokiteltiin asianmukaisesti RhCE-testimenetelmillä niiden validointitutkimuksissa, x) kattavat kaikki *in vitro* -vasteet, jotka perustuvat korkeatasoisiin RhCE-testimenetelmillä saatuihin tietoihin (elinkyky 0–100 prosenttia), xi) ovat kaupallisesti saatavilla ja xii) joiden hankinta- tai hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön. Jos luettelossa olevaa kemikaalia ei ole saatavilla tai jos sitä ei voida käyttää muista perustelluista syistä, voidaan käyttää muuta edellä olevat perusteet täyttävää kemikaalia, esimerkiksi sellaista, jota on käytetty validoidun vertailumenetelmän validoinnissa. Tällaiset poikkeukset on kuitenkin aina perusteltava.

Taulukko 1

Luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista kemikaaleista

Kemiallinen nimi	CAS-nro	Orgaaninen funktionaalinen ryhmä ([1])	Fysikaalinen olomuoto	VVM1/elinkyky (%) ([2])	VVM2/elinkyky (%) ([3])	VVM-ennuste	MTT:n pelkistin	Väri-interf.
***In vivo*: luokka 1** ([4])								
Metyylitioglykolaatti	2365-48-2	Karboksyylihappo, esteri; tioalkoholi	N	10,9±6,4	5,5±7,4	Ei voida ennustaa	K (voimakas)	E
Hydroksietyyliakrylaatti	818-61-1	Akrylaatti; alkoholi	N	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Ei voida ennustaa	E	E
2,5-dimetyyli-2,5-heksaanidioli	110-03-2	Alkoholi	K	2,3±0,2	0,2±0,1	Ei voida ennustaa	E	E
Natriumoksalaatti	62-76-0	Oksokarboksyylihappo	K	29,0±1,2	5,3±4,1	Ei voida ennustaa	E	E
In vivo: luokka 2A ([4])								
2,4,11,13-tetra-atsatetradekaani-diimidamidi, N,N″-bis(4-kloorifenyyli)-3,12-di-imino-, di-D-glukonaatti (20 %, vesiliuos) ([6])	18472-51-0	Aromaattinen heterosyklinen halidi; aryylihalidi; dihydroksyyliryhmä; guanidiini	N	4,0±1,1	1,3±0,6	Ei voida ennustaa	E	K (heikko)

([3]) EITL: Nesteillä tehty silmä-ärsytystesti SkinEthic™ HCE -testin yhteydessä.
([4]) EITS: Kiinteillä aineilla tehty silmä-ärsytystesti SkinEthic™ HCE -testin yhteydessä.

Kemiallinen nimi	CAS-nro	Orgaaninen funktionaalinen ryhmä (1)	Fysikaalinen olomuoto	VVM1/elinkyky (%) (2)	VVM2/elinkyky (%) (3)	VVM-ennuste	MTT:n pelkistin	Väri-interf.
Natriumbentsoaatti	532-32-1	Aryyli; karboksyylihappo	K	3,5±2,6	0,6±0,1	Ei voida ennustaa	E	E
***In vivo: luokka* 2B** (4)								
Dietyylitoluamidi	134-62-3	Bentsamidi	N	15,6±6,3	2,8±0,9	Ei voida ennustaa	E	E
2,2-dimetyyli-3-metyleenibisyklo[2.2.1]heptaani	79-92-5	Alkaani, haarautunut, tertäärinen hiili; alkeeni; bisykloheptaani; silloittuneet rengasrakenteiset karboksyylit; sykloalkaani	K	4,7±1,5	15,8±1,1	Ei voida ennustaa	E	E
In vivo: ei luokitusta (4)								
1-etyyli-3-metyyliimidatsolietyylisulfaatti	342573-75-5	Alkoksi; ammoniumsuola; aryyli; imidatsoli; sulfaatti	N	79,9±6,4	79,4±6,2	Ei luok.	E	E
Dikaprylyylieetteri	629-82-3	Alkoksi; eetteri	N	97,8±4,3	95,2±3,0	Ei luok.	E	E
Piperonyylibutoksidi	51-03-6	Alkoksi; bentsodioksoli; bentsyyli; eetteri	N	104,2±4,2	96,5±3,5	Ei luok.	E	E
Polyetyleeniglykoli (PEG-40) -hydrogenoitu risiiniöljy	61788-85-0	Asylaali; alkoholi; allyyli; eetteri	Viskoosinen	77,6±5,4	89,1±2,9	Ei luok.	E	E
1-(4-kloorifenyyli)-3-(3,4-dikloorifenyyli)urea	101-20-2	Aromaattinen heterosyklinen halidi; aryylihalidi; ureajohdannaiset	K	106,7±5,3	101,9±6,6	Ei luok.	E	E
2,2′-metyleenibis-(6-(2H-bentsotriatsoli-2-yyli)-4-(1,1,3,3-tetrametyylibutyyli)-fenoli)	103597-45-1	Alkaani, haarautunut, kvaternäärinen hiili; fuusioitunut karbosyklinen aromaattinen yhdiste; fuusioituneet saturoituneet heterosykliset yhdisteet; kinoidiyhdisteiden esiasteet; tert-butyyli	K	102,7±13,4	97,7±5,6	Ei luok.	E	E

Kemiallinen nimi	CAS-nro	Orgaaninen funktionaalinen ryhmä ([1])	Fysikaalinen olomuoto	VVM1/elinkyky (%) ([2])	VVM2/elinkyky (%) ([3])	VVM-ennuste	MTT:n pelkistin	Väri-interf.
Kaliumtetrafluoriboroaatti	14075-53-7	Epäorgaaninen suola	K	88,6±3,3	92,9±5,1	Ei luok.	E	E

Lyhenteet:

CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; YK:n GHS: YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (1); VVM1 = validoitu vertailumenetelmä, EpiOcular™-silmä-ärsytystesti; VVM2 = validoitu vertailumenetelmä, SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti; väri-interf. = väri-interferenssi MTT-formatsaanin vakioabsorbanssin (optisen tiheyden) mittauksessa.

([1]) OECD Toolbox 3.1:llä tehdyn sisäkkäisen analyysin mukaan määritetty orgaaninen funktionaalinen ryhmä (8).

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu EpiOcular™-silmä-ärsytystestillä EURL ECVAM/Cosmetics Europen silmä-ärsytystä koskevassa validointitutkimuksessa (EIVS) (8).

([3]) Perustuu SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestillä validointitutkimuksessa saatuihin tuloksiin (10) (11).

([4]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu *in vivo* -kaninsilmätestillä (TM B.5 / OECD:n testiohje 405) (2) (14) ja YK:n GHS-järjestelmää käyttämällä.

([5]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu Euroopan kemianteollisuuden järjestön CEFICin konsortion *in vitro* -silmä-ärsytyksen testausstrategiaa koskevassa tutkimuksessa (CON4EI).

([6]) Luokitus luokkaan 2A tai 2B määräytyy sen mukaan, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan. Päivänä 7 vaikutuksia on siis oltava 1 eläimellä kolmesta tai 2 eläimellä kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. *In vivo* -tutkimuksessa oli kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sarveiskalvon sameutta lukuun ottamatta kaikki päätetapahtumat palautuivat nolla-arvoon päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä täysin toipumattoman eläimen sarveiskalvon sameusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 9.

23. Osana pätevyyden osoittamista suositellaan, että kudosten vastaanoton jälkeen käyttäjät tarkastavat kudosten läpäisevyysominaisuudet RhCE-kudosmallin valmistajan määräysten mukaisesti (ks. 25, 27 ja 30 kohta). Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun testi on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys on osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos testiä käytetään säännöllisesti, läpäisevyysominaisuudet on kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

MENETTELY

24. Tähän testimenetelmään sisältyvät tieteellisesti validit testit ovat EpiOcular™-silmä-ärsytystesti ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (9) (12) (13), joista käytetään myös nimitystä validoitu vertailumenetelmä (VVM1 ja VVM2). RhCE-testimenetelmille on saatavana vakiotoimintamenettelyt (Standard Operating Procedures, SOP), ja niitä pitää noudattaa, kun laboratorio ottaa testimenetelmän käyttöön ja käyttää sitä (34) (35). RhCE-testien keskeiset osat ja menettelyt kuvataan jäljempänä olevissa kohdissa ja lisäyksessä 2.

RHCE-TESTIMENETELMÄN OSAT

Yleiset ehdot

25. Sarveiskalvon kaltaisen epiteelin kolmiulotteisen kudoksen rekonstruoinnissa on käytettävä asianmukaisia ihmiseltä peräisin olevia soluja. Kudoksen on koostuttava progressiivisesti kerrostuneista mutta ei sarveistuneista soluista. RhCE-kudosmalli valmistetaan inserteissä, joissa on huokoinen synteettinen kalvo, jonka läpi ravintoaineet pääsevät kulkeutumaan soluihin. Rekonstruoidussa sarveiskalvon kaltaisessa epiteelissä tulee olla useita kerroksia elinkykyisiä keratinisoitumattomia epiteelisoluja. RhCE-kudosmallin epiteelin pinnan on oltava suorassa kosketuksessa ilmaan, jotta suora paikallinen altistuminen testikemikaaleille on mahdollista samalla tavalla kuin sarveiskalvon epiteeli altistuu *in vivo*. RhCE-kudosmallin on toimittava riittävän lujana ja funktionaalisena esteenä sytotoksisten vertailuaineiden, kuten Triton X-100:n tai natriumdodekyylisulfaatin (SDS:n), nopealle kulkeutumiselle sen läpi. Läpäisynesto on osoitettava ja sitä voidaan arvioida määrittämällä joko altistuksen kesto, jota kudoksen elinkyvyn väheneminen 50 prosentilla edellyttää (ET_{50}), kun vertailuainetta applikoidaan tietty kiinteä pitoisuus (esimerkiksi 100 µl 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa) tai pitoisuus, jolla vertailuaine vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) kiinteän altistusajan jälkeen (esimerkiksi 30 minuutin käsittely 50 µl:lla SDS:ää) (ks. 30 kohta). RhCE-kudosmallin on oltava sellainen, ettei testikemikaali pääse kulkeutumaan reunan alta elinkykyiseen kudokseen, koska se heikentäisi kudoksen kykyä mallintaa sarveiskalvon altistusta. RhCE-kudosmallin valmistamisessa käytetyissä ihmiseltä peräisin olevissa soluissa ei saa olla bakteeri-, virus-, mykoplasma- tai sienikontaminaatiota. Kudosmallin toimittajan on tarkastettava mallin steriiliys, jotta varmistetaan, ettei siinä ole sieni- tai bakteerikontaminaatiota.

Toimintaolosuhteet

Elinkyky

26. Kudoksen elinkyvyn kvantifioinnissa käytettävä testi on MTT-määritys (16). RhCE-kudosmallin elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n saostuneeksi siniseksi MTT-formatsaaniksi, joka uutetaan kudoksestaisopropanolilla

(tai samankaltaisella liuottimella). Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida käyttämällä joko vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys, OD) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä (36). Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. RhCE-kudosmallin käyttäjien on varmistettava, että kukin RhCE-kudosmallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut perusteet. Validoitujen vertailumenetelmien negatiivisen kontrollin optisen tiheyden arvojen (OD-arvojen) hyväksyttävyysalueet on esitetty taulukossa 2. HPLC-/UPLC-spektrofotometrian käyttäjän on käytettävä taulukossa 2 esitettyjä negatiivisen kontrollin OD-vaihteluvälejä negatiivisen kontrollin hyväksymisperusteena. Negatiivisella kontrolliaineella käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset elinkykytulokset) testin altistusjakson ajan on dokumentoitava testiraportissa. Kudoksen valmistajan on noudatettava samanlaista menettelynä osana kudoserän vapauttamisen laadunvalvontaa, mutta tällöin voidaan soveltaa toisia hyväksymisperusteita kuin niitä, jotka on esitetty taulukossa 2. RhCE-kudosmallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo) (laadunvalvotaan sovellettavissa testimenetelmän olosuhteissa).

Taulukko 2

Negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (testin käyttäjille)

Testi	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (OCL-200) – VVM1 (sekä nestemäisten että kiinteiden aineiden tutkimusprotokollat)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (HCE/S) – VVM2 (sekä nestemäisten että kiinteiden aineiden tutkimusprotokollat)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Tässä hyväksyttävyysrajassa otetaan huomioon tavallista pidempi kuljetus-/säilytysaika (esim. > 4 päivää), jonka ei ole osoitettu vaikuttavan testimenetelmän suorituskykyyn (37).

Läpäisyn esto

27. RhCE-kudosmallin on oltava tarpeeksi paksu ja luja, jotta se voi toimia esteenä sytotoksisten vertailuaineiden nopealle kulkeutumiselle sen läpi, kuten on arvioitu esimerkiksi ET_{50}-arvolla (Triton X-100) tai IC_{50}-arvolla (SDS) (taulukko 3). RhCE-kudosmallin kehittäjän/myyjän on osoitettava jokaisen erän läpäisynestokyky, kun se toimittaa kudokset loppukäyttäjälle (ks. 30 kohta).

Morfologia

28. RhCE-kudosmallin histologisen tutkimuksen on osoitettava, että sen rakenne on ihmisen sarveiskalvon kaltainen (ts. että siinä on vähintään kolme kerrosta elinkykyisiä epiteelisoluja ja keratinisoitumaton pinta). Validoitujen vertailumenetelmien osalta kehittäjä/toimittaja on vahvistanut asianmukaisen morfologian, joten testimenetelmän käyttäjän ei tarvitse osoittaa sitä uudestaan jokaisen käytettävän kudoserän osalta.

Toistettavuus

29. Testimenetelmän positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatujen tulosten on osoitettava tulosten toistettavuus pidemmällä aikavälillä.

Laadunvalvonta

30. RhCE-kudosmallia saa käyttää vain, jos sen kehittäjä/toimittaja osoittaa, että kukin RhCE-mallin erä täyttää määritellyt tuotantokriteerit, joiden joukosta elinkykyä (26 kohta) ja läpäisyn estoa (ks. 27 kohta) koskevat perusteet ovat tärkeimmät. RhCE-kudosmallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä läpäisyn eston hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo) ET_{50}- tai IC_{50}-arvolla mitattuna (ks. 25 ja 26 kohta). ET_{50}- ja IC_{50}-arvoihin perustuva hyväksyttävyysalue, jota RhCE-kudosmallien kehittäjä/toimittaja on käyttänyt laadunvalvonnassa erän vapauttamisperusteena, esitetään taulukossa 3. RhCE-kudosmallin kehittäjän/toimittajan on annettava testimenetelmän käyttäjille tiedot, jotka osoittavat, että kaikki tuotantokriteerit täyttyvät, jotta käyttäjät voivat ilmoittaa nämä tiedot testiraportissa. Ainoastaan nämä tuotantokriteerit täyttävillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi kemikaaleista, joita ei tarvitse luokitella ja merkitä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti.

Taulukko 3

Laadunvalvonnan perusteet erän vapauttamiseksi tehtaalta myyntiin

Testi	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (OCL-200) – VVM1 (100 µl 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (HCE/S) – VVM2 (30 minuutin käsittely 50 µl:lla SDS:ää)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Testikemikaalin ja kontrolliaineiden applikointi

31. Kutakin testikemikaalia ja kutakin kontrolliainetta kohti on käytettävä vähintään kaksi kudosnäytettä jokaisessa testiajossa. Testissä käytetään kahta erilaista käsittelyprotokollaa, yhtä nestemäisille testikemikaaleille ja toista kiinteille testikemikaaleille (34) (35). Kummassakin menetelmässä ja protokollassa kudosmallin pinta on ennen testikemikaalien applikointia kostutettava Dulbeccon fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, jossa ei ole kalsiumia eikä magnesiumia (Ca^{2+}/Mg^{2+}-free DPBS), ihmisen silmän kosteiden olosuhteiden jäljittelemiseksi. Kudosten käsittely aloitetaan altistamalla ne testikemikaalille (-kemikaaleille) ja kontrolliaineille. Kummassakin käsittelyprotokollassa ja kummassakin VVM:ssä epiteelin pinnalle on annosteltava testikemikaalia tai kontrolliainetta tasaisesti riittävä määrä kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta (ks. 32 ja 33 kohta) (lisäys 2).

32. Testikemikaaleja, jotka voidaan pipetoida 37 °C:ssa tai sitä alhaisemmassa lämpötilassa (käyttämällä tarvittaessa mäntäpipettiä), pidetään VVM:issä nesteinä; muussa tapauksessa niitä on pidettävä kiinteinä aineina (ks. 33 kohta). VVM:issä nestemäinen testikemikaali levitetään tasaisesti kudoksen pinnalle (ts. applikointi vähintään 60 µl/cm^2) (ks. lisäys 2 (33) (34)). Kapillaari-ilmiötä (pintajännityksen vaikutuksia), jota voi esiintyä inserttiin (kudoksen pinnalle) levitettävien pienten määrien vuoksi, on mahdollisuuksien mukaan vältettävä, jotta voidaan taata, että testikemikaalia annostellaan kudokselle oikea määrä. Nestemäisillä testikemikaaleilla käsiteltyjä kudoksia inkuboidaan tavanomaisissa viljelyoloissa (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ilmankosteus ≥ 95 %) 30 minuuttia. Altistusajan päätyttyä nestemäinen testikemikaali ja kontrolliaineet on poistettava kudoksen pinnalta huolellisesti huuhtelemalla ne kunnolla kalsiumittomalla ja magnesiumittomalla DPBS:llä huoneenlämpötilassa. Tämän huuhteluvaiheen jälkeen seuraa altistuksen jälkeinen upotus tuoreeseen liuokseen huoneenlämpötilassa (kudokseen mahdollisesti absorboituneen testikemikaalin poistamiseksi) määrätyksi ajaksi, joka vaihtelee käytettävän VVM:n mukaan. Vain VVM1:tä noudatettaessa tehdään altistuksen jälkeinen inkubointi tuoreessa liuoksessa tavanomaisissa viljelyoloissa ennen MTT-määrityksen tekemistä (ks. lisäys 2, (34) (35)).

33. Testikemikaaleja, joita ei voida pipetoida enintään 37 °C:n lämpötilassa, pidetään VVM:issä kiinteinä aineina. Testikemikaalia on applikoitava riittävä määrä, jotta se peittää kudoksen koko pinnan; määrän on oltava vähintään 60 mg/cm^2 (lisäys 2). Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Kiinteillä testikemikaaleilla käsiteltyjä kudoksia inkuboidaan määrätty aika (käytettävän VVM:n mukaan) tavanomaisissa viljelyoloissa (ks. lisäys 2, (34) (35)). Altistusajan päätyttyä kiinteä testikemikaali ja kontrolliaineet on poistettava kudoksen pinnalta huolellisesti huuhtelemalla ne kunnolla kalsiumittomalla ja magnesiumittomalla DPBS:llä huoneenlämpötilassa. Tämän huuhteluvaiheen jälkeen seuraa altistuksen jälkeinen upotus tuoreeseen liuokseen huoneenlämpötilassa (kudokseen mahdollisesti absorboituneen testikemikaalin poistamiseksi) määrätyksi ajaksi, joka vaihtelee käytettävän VVM:n mukaan, ja altistuksen jälkeinen inkubointi tuoreessa liuoksessa tavanomaisissa viljelyoloissa ennen MTT-määrityksen tekemistä (ks. lisäys 2, (34) (35)).

34. Kussakin testiajossa on käytettävä samanaikaisia negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla määritettynä) ja kudosten herkistyminen (positiivisella kontrollilla määritettynä) ovat aikaisempien tietojen perusteella määritettyjen hyväksyttävyysalueen mukaisia. Samanaikainen negatiivinen kontrolli muodostaa myös perustason (kudoksen elinkykyisyys 100 prosenttia) testikemikaalilla käsiteltyjen kudosten suhteellisen prosentuaalisen elinkykyisyyden laskemista varten (%$Viability_{test}$). VVM:ien yhteydessä käytettäväksi suositeltu positiivinen kontrolliaine on laimentamaton metyyliasetaatti (CAS-nro 79-20-9, kaupallisesti saatavana esimerkiksi Sigma-Aldrichilta, luettelonro 45997; neste). VVM1:n yhteydessä käytettäväksi suositeltu negatiivinen kontrolliaine on ultrapuhdas H_2O; VVM2:n yhteydessä se on kalsiumiton ja magnesiumiton DPBS. Näitä aineita käytettiin kontrolliaineina validoitujen vertailumenetelmien validointitutkimuksissa, ja niistä on eniten tietoa saatavilla. Sopivien vaihtoehtoisten positiivisten tai negatiivisten kontrolliaineiden käytölle on esitettävä tieteelliset ja asianmukaiset perustelut. Negatiiviset ja positiiviset kontrollit on testattava samalla protokollalla (samoilla protokollilla), jota (joita) käytettiin testiajoon sisältyneiden testikemikaalien yhteydessä (ts. nestemäiset ja/tai kiinteät aineet). Tämän applikoinnin jälkeen seuraa varsinainen käsittelyaltistus, huuhtelu, altistuksen jälkeinen immersio ja inkubointi tarvittaessa, kuten on kuvattu nestemäisten testikemikaalien kanssa samanaikaisten kontrolliajojen osalta (ks. 32 kohta) tai kiinteiden testikemikaalien kanssa samanaikaisten kontrolliajojen osalta (ks. 33 kohta), ennen MTT-määrityksen tekemistä (ks. 35 kohta) (34) (35). Yksi sarja negatiivisia ja positiivisia kontrolleja riittää kaikille samaan testiajoon sisältyville testikemikaaleille, joiden fysikaalinen olomuoto on sama (neste tai kiinteä aine).

Kudoksen elinkykymittaukset

35. MTT-määritysmenetelmä on standardoitu kvantitatiivinen menetelmä (16), jota on käytettävä kudoksen elinkyvyn mittaamiseen tässä testimenetelmässä. MTT-menetelmä sopii käytettäväksi kolmiulotteisen kudosmallin kanssa. MTT-määritys tehdään heti altistuksen jälkeisen inkubointivaiheen jälkeen. VVM:issä RhCE-kudosmallinäyte laitetaan 0,3 ml:aan MTT-liuosta (1 mg/ml) 180±15 minuutiksi tavanomaisiin viljelyoloihin. RhCE-kudosmallin elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n siniseksi saostuneeksi MTT-formatsaaniksi. Sen jälkeen saostunut sininen MTT-formatsaanituote uutetaan kudoksesta käyttämällä riittävää määrää isopropanolia (tai muuta vastaavaa liuotinta) (34) (35). Nestemäisillä testikemikaaleilla testatut kudokset on uutettava niiden ylä- ja alaosasta, kun taas kiinteillä testikemikaaleilla ja värillisillä nesteillä testatut kudokset on uutettava vain kudoksen alaosasta (jotta minimoidaan isopropanoliuuton mahdollinen kontaminoituminen testikemikaalilla, jota kudokseen on voinut jäädä). Myös kudokset, jotka on testattu nestemäisillä testikemikaaleilla, joita ei ole vielä huuhdeltu pois, on uutettava vain kudoksen alaosasta. Samanaikaisesti testattuja negatiivisia ja positiivisia kontrolliaineita on käsiteltävä samalla tavoin kuin testattua kemikaalia. Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida joko vakioabsorbanssin (optisen tiheyden) mittauksella 570 nm:n aallonpituudella käyttämällä ±30 nm:n kaistanpäästösuodatinta tai käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä (ks. 42 kohta) (11) (36).

36. Testikemikaalin optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen vaikutus MTT:hen voivat häiritä MTT-formatsaanin mittausta ja johtaa virheelliseen arvioon kudoksen elinkyvystä. Testikemikaalit voivat häiritä MTT-määritystä joko pelkistämällä MTT:n suoraan siniseksi MTT-formatsaaniksi ja/tai väri-interferenssillä, jos testikemikaali absorboi valoa luonnostaan tai käsittelymenettelyjen takia samalla optisella tiheydellä kuin MTT-formatsaani (noin 570 nm). Ennen testausta on tehtävä esitarkistuksia, jotta voidaan tunnistaa mahdolliset suorat MTT:n pelkistimet ja/tai väri-interferenssiä aiheuttavat kemikaalit, ja käytettävä lisäkontrolleja, jotta näistä testikemikaaleista johtuva mahdollinen häiriö voidaan havaita ja korjata (ks. 37–41 kohta). Tämä on tärkeää etenkin silloin, jos tiettyä testikemikaalia ei saada kokonaan pois RhCE-kudosmallista huuhtelussa tai jos se tunkeutuu sarveiskalvon kaltaisen epiteelin läpi, jolloin sitä on RhCE-kudosmallissa, kun MTT-määritys tehdään. Sellaisten testikemikaalien yhteydessä, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituusalueella kuin MTT-formatsaani (luonnostaan tai käsittelyn jälkeen) ja jotka eivät sovellu MTT-formatsaanin vakioabsorbanssimittaukseen (optinen tiheys) liian voimakkaan interferenssin takia (voimakas absorptio alueella 570±30 nm), voidaan käyttää HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä MTT-formatsaanin mittaamiseen (ks. 41 ja 42 kohta) (11) (36). MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti validoituja vertailumenetelmiä koskevissa vakiotoimintamenettelyissä (34) (35). Havainnolliset vuokaaviot, joissa opastetaan, miten tunnistetaan suorat MTT:n pelkistimet ja/tai väri-interferenssiä aiheuttavat kemikaalit ja käsitellään niitä, ovat VVM:n 1 osalta lisäyksessä III ja VVM:n 2 osalta lisäyksessä IV.

37. Jotta saadaan selville, aiheuttavatko MTT-formatsaanin kanssa samalla aallonpituudella valoa (luonnostaan tai käsittelyn jälkeen) absorboivat testikemikaalit häiriötä ja tarvitaanko lisäkontrolleja, testikemikaalia lisätään veteen ja/tai isopropanoliin ja sitä inkuboidaan asianmukainen aika huoneenlämpötilassa (ks. lisäys 2, (34) (35)). Jos vedessä ja/tai isopropanolissa oleva testikemikaali absorboi riittävästi valoa aallonpituusalueella 570±20 nm (VVM1) (ks. lisäys 3) tai jos testikemikaalin ja veden sekoittamisen tuloksena on värillinen liuos (VVM2) (ks. lisäys 4), testikemikaalin oletetaan häiritsevän MTT-formatsaanin vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) ja on käytettävä useampia väriainekontrolleja tai vaihtoehtoisesti on käytettävä HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä, jolloin näitä kontrolleja ei tarvita (ks. 41 ja 42 kohta sekä lisäys III ja IV) (34) (35). Vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä kutakin häiritsevää testikemikaalia on laitettava vähintään kahdelle elinkykyiselle rinnakkaiskudosnäytteelle, joita käytetään koko testimenettelyn ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta väliaineessa MTT-inkubointivaiheen aikana, jotta saadaan aikaan epäspesifi värikontrolli elävillä kudoksilla (NSC_{living}) (34) (35). NSC_{living}-kontrolli on tehtävä samanaikaisesti värillisellä testikemikaalilla tehtävän testin kanssa, ja jos testejä tehdään useita, jokaisen testin aikana (jokaisessa testiajossa) on tehtävä itsenäinen NSC_{living}-kontrolli elävien kudosten luontaisen biologisen vaihtelun vuoksi. Kudoksen todellinen elinkyky lasketaan näin: häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT-liuoksessa inkuboitujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkyky (%$Viability_{test}$) miinus häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen elävien kudosten epäspesifisen ja samanaikaisesti korjattavan testin kanssa testatun värikontrollin prosenttiosuudella (%NSC_{living}); kudoksen todellinen elinkyky = [%$Viability_{test}$] - [%NSC_{living}].

38. Jotta suorat MTT:n pelkistimet voidaan tunnistaa, kukin testikemikaali tulee lisätä tuoreeseen MTT-liuokseen. Asianmukainen määrä testikemikaalia lisätään MTT-liuokseen, ja seosta inkuboidaan noin kolme tuntia tavanomaisissa viljelyoloissa (ks. lisäys III ja IV) (34) (35). Jos testikemikaalia sisältävä MTT-seos (tai suspensio liukenemattomien testikemikaalien osalta) muuttuu siniseksi tai violetiksi, testikemikaalin oletetaan olevan suora MTT:n pelkistin, jolloin on tehtävä toiminnallinen tarkastus kuolleilla RhCE-kudosmalleilla riippumatta siitä, käytetäänkö vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä. Tässä toiminnallisessa lisätarkastuksessa käytetään kuolleita kudoksia, joiden metabolinen toiminta on vähäistä mutta jotka absorboivat ja sitovat testikemikaalia itseensä yhtä paljon kuin elinkykyiset kudokset. VVM1:ssä kuolleet kudokset valmistetaan altistamalla ne alhaiselle lämpötilalle (”freeze-killed”). VVM2:ssa kuolleet kudokset valmistetaan inkuboimalla niitä tavallista pidempään (vähintään 24±1 h) vedessä, minkä jälkeen ne säilötään alhaisessa lämpötilassa (”water-killed”) Kutakin MTT:tä pelkistävää testikemikaalia laitetaan vähintään kahdelle sellaiselle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testimenettelyn ajan. Näin saadaan aikaan epäspesifinen MTT:n pelkistin (NSMTT) -kontrolli (34) (35). Yksi NSMTT-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta. Kudoksen todellinen elinkyky lasketaan näin: MTT:n pelkistimelle altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkyky (%$Viability_{test}$) miinus samalle MTT:n pelkistimelle altistettujen kuolleiden kudosten epäspesifisen MTT-pelkistyksen prosenttiosuus laskettuna suhteessa negatiiviseen kontrolliin, joka testattiin samanaikaisesti korjattavan testin kanssa (%NSMTT); kudoksen todellinen elinkyky = [%$Viability_{test}$] - [%NSMTT].

39. Niille testikemikaaleille, joiden todetaan tuottavan sekä väri-interferenssiä (ks. 37 kohta) että suoraa MTT:n pelkistystä (ks. 38 kohta), tarvitaan vielä kolmas kontrollisarja edellisissä kohdissa kuvattujen NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollien lisäksi vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä. Näin on yleensä sellaisten tummien testikemikaalien yhteydessä, jotka absorboivat valoa aallonpituudella 570±30 nm (esimerkiksi sininen, violetti, musta), koska niiden luontainen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten ne pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan 38 kohdassa kuvatun mukaisesti. Tämän vuoksi on oletusarvoisesti käytettävä NSMTT-kontrolleja NSC_{living}-kontrollien kanssa. Niin elävät kuin kuolleet kudokset voivat absorboida ja sitoa itseensä testikemikaaleja, joille tehdään NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollit. Näin ollen NSMTT-kontrolli saattaa tässä tapauksessa korjata paitsi testikemikaalin mahdollisesti aiheuttaman suoran MTT:n pelkistyksen myös väri-interferenssin, joka johtuu siitä, että kuolleet kudoksetabsorboivat

ja sitovat itseensä testikemikaalia. Tämä taas voi johtaa väri-interferenssin kaksinkertaiseen korjaamiseen, koska NSC_{living}-kontrollilla korjataan jo väri-interferenssi, joka johtuu siitä, että elävät kudokset absorboivat ja sitovat itseensä testikemikaalia. Jotta vältetään väri-interferenssin mahdollinen kaksinkertainen korjaaminen, on tehtävä kolmas, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa -kontrolli (NSC_{killed}) (ks. lisäykset III ja IV) (34) (35). Tässä lisäkontrollissa testikemikaalia laitetaan vähintään kahdelle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testimenettelyn ajan mutta jotka inkuboidaan väliaineessa MTT-liuoksen sijasta MTT-inkubointivaiheessa. Yksi NSC_{killed}-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta, mutta se on tehtävä samaan aikaan kuin NSMTT-kontrolli ja samalla kudoserällä. Kudoksen todellinen elinkyky lasketaan näin: testikemikaalille altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkyky ($\%Viability_{test}$) miinus %NSMTT miinus $\%NSC_{living}$plus häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen kuolleiden kudosten epäspesifinen väri laskettuna suhteessa korjattavan testin kanssa samanaikaisesti tehtyyn negatiiviseen kontrolliin ($\%NSC_{killed}$); kudoksen todellinen elinkyky = [$\%Viability_{test}$] - [%NSMTT] - [$\%NSC_{living}$] + [$\%NSC_{killed}$].

40. On tärkeää muistaa, että epäspesifinen MTT:n pelkistys ja epäspesifiset väri-interferenssit voivat lisätä kudosnäytteen optista tiheyttä (kun tehdään vakioabsorbanssimittauksia) spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi ja että epäspesifinen MTT:n pelkistys voi myös kasvattaa kudosnäytteen MTT-formatsaanin huippualuetta (kun tehdään HPLC-/UPLC-spektrofotometriamittauksia) spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi. Tämän vuoksi jokaisen laboratorion on määritettävä spektrofotometrinsä lineaarinen asteikko optisen tiheyden / huippualueen osalta esimerkiksi MTT-formatsaanilla (CAS-nro 57360-69-7), jota on kaupallisesti saatavilla esimerkiksi Sigma-Aldrichilta (luettelonro M2003) ennen sääntelytarkoituksiin liittyvien testikemikaalien testaamisen aloittamista.

41. Vakioabsorbanssimittaus (optinen tiheys) on asianmukainen suorien MTT:n pelkistimien ja väri-interferenssiä aiheuttavien testikemikaalien määrittämisessä spektrofotometrillä, jos MTT-formatsaanin mittaukseen liittyvä havaittu interferenssi ei ole liian voimakas (ts. kudosnäytteistä testikemikaalilla saadut optiset tiheydet ilman suoran MTT:n pelkistyksen ja/tai väri-interferenssin korjausta ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon sisällä). Sellaisiin testikemikaaleihin, joiden tuottama %NSMTT ja/tai $\%NSC_{living}$ on ≥ 60 prosenttia (VVM1, ja VVM2 nesteprotokollan osalta) tai 50 prosenttia (VVM2 kiinteiden aineiden protokollan osalta) negatiivisesta kontrollista, on suhtauduttava varauksellisesti, koska tämä on VVM:issä vahvistettu raja-arvo, jolla erotellaan luokitellut kemikaalit luokittelemattomista (ks. 44 kohta). Vakioabsorbanssia (optinen tiheys) ei kuitenkaan voida mitata, jos MTT-formatsaanin mittaukseen kohdistuva interferenssi on liian voimakas (ts. jos se johtaa siihen, että testikudosnäytteiden korjaamattomat optisen tiheyden arvot ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella). Värillisiä testikemikaaleja tai testikemikaaleja, jotka värjäytyvät kosketuksessa veden tai isopropanolin kanssa ja jotka häiritsevät MTT-formatsaanin vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) liian voimakkaasti, voidaan silti arvioida käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa (ks. lisäys III ja IV). Tämä johtuu siitä, että HPLC-/UPLC-järjestelmällä MTT-formatsaani voidaan erottaa kemikaalista ennen sen kvantifiointia (36). Tästä syystä NSC_{living}- tai NSC_{killed}-kontrolleja ei tarvita koskaan HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä siitä riippumatta, mikä testattava kemikaali on. NSMTT-kontrolleja on kuitenkin käytettävä, jos testikemikaalin epäillään olevan suora MTT:n pelkistin (38 kohdassa kuvattua menettelyä noudattaen). NSMTT-kontrolleja on käytettävä myös, jos testikemikaalilla on väri (luontaisesti tai jos se värjäytyy vedessä), joka vaikeuttaa sen arviointia, miten se pystyy pelkistämään MTT:tä suoraan, 38 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa, kudoksen prosentuaalinen elinkyky lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin huippualueen prosenttiosuutena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Niiden testikemikaalien osalta, jotka pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan, kudoksen todellinen elinkyky lasketaan tällä kaavalla: $\%Viability_{test}$miinus %NSMTT, kuten 38 kohdan viimeisessä virkkeessä on kuvattu. On myös syytä muistuttaa siitä, että suoria MTT:n pelkistimiä, myös sellaisia, jotka voivat aiheuttaa myös väri-interferenssiä ja jotka pysyvät kudoksissa käsittelyn jälkeen ja pelkistävät MTT:tä niin voimakkaasti, että testattujen kudosnäytteiden optiset tiheydet (vakiotiheysmittausta käyttäen) tai huippualueet (UPLC-/HPLC-spektrofotometriaa käyttäen) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella, ei voida arvioida RhCE-testimenetelmillä, vaikka tällaista oletetaan tapahtuvan vain hyvin harvoin.

42. HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa voidaan käyttää kaikentyyppisten testikemikaalien (värillisten, värittömien, MTT:n pelkistimien ja muiden kuin MTT:n pelkistimien) kanssa MTT-formatsaanin mittaamiseen (11) (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmien moninaisuuden vuoksi ei ole mahdollista, että jokainen käyttäjä määrittäisi täsmälleen samat järjestelmäolosuhteet. Tämän vuoksi HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmien asianmukaisuus on osoitettava, ennen kuin niitä käytetään kudosnäytteiden MTT-formatsaanin kvantifioimisessa. Järjestelmien on täytettävä hyväksymiskriteerit tavanomaisten laatuparametrien osalta Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston bioanalyyttisten menetelmien validointia koskevissa ohjeissa kuvatun mukaisesti (36) (38). Nämä keskeiset parametrit ja niihin liittyvät hyväksymiskriteerit esitetään lisäyksessä 5. Kun lisäyksessä 5 määritetyt hyväksymiskriteerit täyttyvät, kyseistä HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmää pidetään asianmukaisena ja sillä voidaan mitata MTT-formatsaania tässä testimenetelmässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Hyväksymisperusteet

43. Jokaisessa testiajossa, jossa käytetään laadunvalvontakriteerit (ks. 30 kohta) täyttäviä RhCE-kudoseriä, negatiivisella kontrolliaineella käsiteltyjen kudosten optisen tiheyden on kuvastettava kudosten laatua kuljetus- ja vastaanottovaiheiden sekä kaikkien protokollan mukaisten menettelyjen jälkeen, eikä tämä arvo saa olla aikaisemmin määritettyjä, taulukossa 2 kuvattuja raja-arvoja pienempi tai suurempi (ks. 26 kohta). Vastaavasti positiivisella kontrolliaineella, kuten metyyliasetaatilla, käsiteltyjen kudosten keskimääräinen elinkyky on oltava < 50 prosenttia suhteessa VVM1:n negatiiviseen kontrolliin joko nestemäisiä tai kiinteitä aineita koskevan protokollan mukaisesti, ja ≤ 30 prosenttia (nesteprotokolla) tai ≤ 20 prosenttia (kiinteiden aineiden protokolla) suhteessa VVM2:n negatiiviseen kontrolliin. Arvojen on siis kuvastettava kudosten kykyä reagoida ärsyttävään testikemikaaliin testimenetelmän yhteydessä käytetyissä olosuhteissa (34) (35). Testikemikaaleilla ja kontrolliaineilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden vaihtelun on oltava hyväksytyissä rajoissa (esimerkiksi kahden rinnakkaiskudosnäytteen välisen elinkykyisyyden erotuksen pitää olla alle 20 prosenttia tai kolmen rinnakkaiskudosnäytteen välinen keskihajonta saa olla enintään 18 prosenttia). Jos testiajossa käytetyn negatiivisen kontrollin tai positiivisen kontrollin tulos on hyväksyttävyysalueen ulkopuolella, testiajoa ei pidetä hyväksyttävänä ja se on toistettava. Jos testikemikaalin rinnakkaiskudosnäytteiden vaihtelu on hyväksyttävyysalueen ulkopuolella, testiajoa ei pidetä hyväksyttävänä ja testikemikaali on testattava uudelleen.

Tulosten tulkinta ja ennustemalli

44. Kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky (rinnakkaiskudosnäytteiden keskiarvo) normalisoituna negatiiviseen kontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 prosenttia, on laskettava käyttämällä jokaisesta testikemikaalin rinnakkaiskudosnäytteestä saatuja OD-arvoja/huippualuearvoja. Kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo, jonka perusteella määritetään ne testikemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), esitetään taulukossa 4. Tuloksia on siis tulkittava näin:

— Testikemikaalia ei tarvitse luokitella ja merkitä YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen (ei luokitusta) mukaisesti, jos kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky altistuksen ja sen jälkeisen inkuboinnin jälkeen on suurempi kuin (>) määritetty kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo (taulukko 4). Tässä tapauksessa lisätestaus muilla testimenetelmillä ei ole tarpeen.

— Jos kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky altistuksen ja sen jälkeisen inkuboinnin jälkeen on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) määritetty kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo, ennustetta ei voida tehdä (taulukko 4). Tässä tapauksessa testausta on jatkettava muilla testimenetelmillä, koska RhCE-testimenetelmillä saatiin tietty määrä vääriä positiivisia tuloksia (ks. 14 ja 15 kohta) eikä luokituspäätöstä YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkien 1 ja 2 välillä voida tehdä (ks. 17 kohta).

Taulukko 4

Ennustemallit YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokituksen mukaan

VVM	Ei luokitusta	Ei voida ennustaa
VVM1 – EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (kumpikin protokolla)	Kudoksen keskimääräinen elinkyky > 60 %	Kudoksen keskimääräinen elinkyky ≤ 60 %
VVM2 - SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (nesteprotokolla)	Kudoksen keskimääräinen elinkyky > 60 %	Kudoksen keskimääräinen elinkyky ≤ 60 %
VVM2 - SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (kiinteiden aineiden protokolla)	Kudoksen keskimääräinen elinkyky > 50 %	Kudoksen keskimääräinen elinkyky ≤ 50 %

45. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä vähintään kaksi rinnakkaiskudosnäytettä käsittävässä testissä. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos kudoksen keskimääräinen elinkyky on 60 ± 5 prosenttia (VVM1 ja VVM2 nesteprotokollan osalta) tai 50±5 prosenttia (VVM2 kiinteiden aineiden protokollan osalta), on harkittava toista testiä ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

46. Tietyntyyppisille seoksille voidaan harkita erilaisia kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvoja, joilla erotellaan luokitellut testikemikaalit luokittelemattomista, jos se on tarkoituksenmukaista ja perusteltua. Näin voidaan parantaa testimenetelmän kokonaistehokkuutta kyseisen tyyppisten seosten osalta (ks. 14 kohta). Vertailukemikaalien käyttö voi olla hyödyllistä arvioitaessa tuntemattomien testikemikaalien tai tuoteluokan vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen aiheuttamispotentiaalia tai luokitellun kemikaalin suhteellista silmätoksisuuspotentiaalia tietyllä positiivisten vasteiden alueella.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

47. Jokaisesta testikemikaalista on esitettävä taulukossa testiajon yksittäisiä rinnakkaiskudosnäytteitä koskevat tiedot (esimerkiksi kunkin testikemikaalin ja kontrollin OD-arvot / MTT-formatsaanin huippualuearvot sekä laskettu kudoksen prosentuaalinen elinkyky sekä tiedot lopullisesta RhCE-testimenetelmällä saadusta ennusteesta) ja tarvittaessa myös tiedot toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky sekä kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välinen ero (jos n=2 rinnakkaiskudosnäytettä) tai keskihajonta (jos n≥ 3 rinnakkaiskudosnäytettä) jokaisesta yksittäisestä testikemikaalista ja kontrollista. Jokaisen testatun kemikaalin osalta on ilmoitettava myös MTT-formatsaanin mittauksessa mahdollisesti havaittu testikemikaalin interferenssi, joka johtuu MTT:n suorasta pelkistyksestä ja/tai väri-interferenssistä.

Testiraportti

48. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, pH, logP-arvo, molekyylipaino, kemiallinen luokka ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemiaaliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fysikaalinen olomuoto ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemiaaliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Positiiviset ja negatiiviset kontrolliaineet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, molekyylipaino, kemiallinen luokka ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemiaaliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa perustelut, jos on käytetty muuta negatiivista kontrolliainetta kuin ultrapuhdasta vettä tai kalsiumitonta ja magnesiumitonta DPBS:ää

— tarvittaessa perustelut, jos on käytetty muuta positiivista kontrolliainetta kuin laimentamatonta metyyliasetaattia

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisiin ja negatiivisiin kontrollituloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksyntäkriteereistä.

Tutkimuksen teettäjää ja testauslaitosta koskevat tiedot:

— Tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja.

— *Käytetty RhCE-kudosmalli ja protokolla (sekä tarvittaessa perustelut valinnoille)*

Testimenetelmän olosuhteet

— käytetty RhCe-kudosmalli ja eränumero

— MTT-formatsaanin kvantifioinnissa käytetty aallonpituus ja kaistanpäästöarvo (tarvittaessa) sekä mittauslaitteen (esimerkiksi spektrofotometrin) lineaarinen asteikko

— kuvaus MTT-formatsaanin kvantifioinnissa käytetystä menetelmästä

— kuvaus käytetystä HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmästä tarvittaessa

— täydelliset RhCE-kudosmallin käyttöä tukevat tiedot (myös sen suoritusarvot). Näitä voivat olla esimerkiksi

  i) elinkykyisyyden laatukontrolli (toimittaja)

  ii) elinkykyisyys testimenetelmän olosuhteissa (käyttäjä)

  iii) läpäisyneston laatukontrolli

  iv) morfologia, jos saatavilla

  v) toistettavuus ja ennustamiskyky

  vi) muut RhCE-kudosmallin laatukontrollit, jos saatavilla

— viittaukset RhCE-kudosmallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi laatukontrollitietojen hyväksyttävyys; viitattava aikaisempia eriä koskeviin tietoihin

— maininta siitä, että testauslaitos on osoittanut pätevyytensä tämän testimenetelmän käytössä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien testaamisella ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Testiajon ja testin hyväksymisperusteet

— positiivisen ja negatiivisen kontrollin keskiarvot ja hyväksyttävyysalueet aikaisempien tietojen perusteella

— hyväksyttävä vaihtelu rinnakkaiskudosnäytteiden välillä positiivisten ja negatiivisten kontrollien osalta

— hyväksyttävä vaihtelu rinnakkaiskudosnäytteiden välillä testikemikaalin osalta.

Testimenettely

— tiedot käytetystä testimenettelystä

— testikemikaalin ja käytettyjen kontrolliaineiden annokset

— altistuksen sekä sen jälkeisen immersion ja inkuboinnin kesto ja lämpötila (tarvittaessa)

— kuvaus testimenettelyn mahdollisista muutoksista

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille, jos tarpeen

— testikemikaalia ja kontrolleja kohti käytettyjen rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä (positiivinen/negatiivinen kontrolli, NSMTT, NSCliving ja NSCkilled tarvittaessa).

Tulokset

— Taulukkomuotoiset tiedot yksittäisistä testikemikaaleista ja kontrolliaineista jokaisesta testiajosta (myös toistokokeista tarvittaessa) ja jokaisesta rinnakkaismittauksesta sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, kudosten prosentuaalinen elinkyky, kudosten keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky, rinnakkaiskudosnäytteiden välinen ero tai keskihajonta sekä lopullinen ennuste.

— Tarvittaessa tulokset kontrolleista, joita käytettiin suorien MTT:n pelkistimien ja/tai värjäävien testikemikaalien yhteydessä, sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, rinnakkaiskudosnäytteiden välinen ero tai keskihajonta, lopullinen oikea kudosten prosentuaalinen elinkyky ja lopullinen ennuste.

— Testikemikaalista (-kemikaaleista) ja kontrolliaineista saadut tulokset tietyssä testiajossa ja testin hyväksymisperusteisiin nähden.

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista, kuten värillisen testikemikaalin aiheuttamasta kudosten värjäytymisestä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) YK (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. Saatavana osoitteesta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Tässä liitteessä oleva B.5 luku, Akuutti silmän ärsyttävyys/syövyttävyys.

(3) Tässä liitteessä oleva B.47 luku, Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta.

(4) Tässä liitteessä oleva B.48 luku, Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä, jolla tunnistetaan i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta.

(5) Tässä liitteessä oleva B.61 luku, Fluoreseiinivuototestimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi.

(6) Tässä liitteessä oleva B.68 luku, Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva *in vitro* -testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta.

(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 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Saatavana osoitteessa hhttp://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 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Saatavana osoitteessa 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 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Saatavana osoitteessa 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. (Tekeillä oleva käsikirjoitus).

(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. Teoksessa: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, s. 147–159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 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. Julkaisussa *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, s. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. Teoksessa Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, s. 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. Saatavana osoitteessa [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. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (18).

Vertailukemikaali: Testikemikaalin vertailustandardina käytettävä kemikaali. Vertailukemikaalilla on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, sen tunnistamista ja luonnehtimista varten; ii) rakenteellinen ja/tai funktionaalinen vastaavuus tai sama kemiallinen tai tuoteluokka kuin testattavalla kemikaalilla (testattavilla kemikaaleilla), iii) tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vastealueella.

Alhaalta ylös suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään testikemikaalille, jonka ei oleteta vaativan luokitusta ja merkintöjä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta ja merkintöjä (negatiivinen tulos), ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Ks. ”tarkkuus”.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

CV: Coefficient of variation, variaatiokerroin.

Dev: Deviation, poikkeama.

EIT: Eye Irritation Test, silmä-ärsytystesti.

EURL ECVAM: Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorio.

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle ja jotka korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautuvat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2.

ET_{50}: Altistusaika, joka tarvitaan, jotta kudoksen elinkyky vähenee 50 prosenttia applikoitaessa vertailukemikaalia tiettynä kiinteänä pitoisuutena.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Kaikkien positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Vaara: Aineen tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

HPLC: Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IC_{50}: Pitoisuus, jossa vertailukemikaali alentaa kudoksen elinkykyä 50 prosentilla kiinteän altistusajan jälkeen (esimerkiksi 30 minuutin käsittely SDS:llä).

Rajoittamaton annos: RhCE-kudosmalliin applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan epiteelin pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Silmiin kohdistuvat korjautumattomat vaikutukset: Ks. ”vakava silmävaurio”.

LLOQ: Alempi määritysraja.

LogP: Oktanoli/vesi-jakaantumiskertoimen logaritmi.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Positiivinen kontrolli Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

MTT: 3–(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi, tiatsolyylisininen.

Negatiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, josta tiedetään, ettei se aiheuta positiivista vastetta testijärjestelmässä. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää kudoksen 100-prosenttinen elinkyky.

Ei luokiteltu: Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmiä ärsyttäviksi (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2, YK:n GHS-järjestelmän luokka 2A tai 2B) tai vakavia silmävaurioita aiheuttaviksi (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1). Sama kuin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”.

NSC_{killed}: Non-Specific Colour in killed tissues, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa.

NSC_{living}: Non-Specific Colour in living tissues, epäspesifinen väri elävissä kudoksissa.

NSMTT: Non-Specific MTT reduction, epäspesifinen MTT:n pelkistys

OD: Optical Density, optinen tiheys

Suoritusvaatimukset: Tieteellisesti validiksi katsottuun validoituun vertailumenetelmään perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (18).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen testijärjestelmässä. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (18).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Luotettavuutta arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (18).

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä (18).

Toistettavuus: Samalla kemikaalilla ja saman testiprotokollan mukaisesti toistetuilla testeillä saatujen tulosten keskinäinen vastaavuus (ks. luotettavuus) (18).

Silmiin kohdistuvat korjautuvat vaikutukset: Ks. ”silmä-ärsytys.

RhCE: Reconstructed human Cornea-like Epithelium, rekonstruoitu ihmisen sarveiskalvon kaltainen epiteeli.

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti negatiivisen ja positiivisen kontrollin kanssa.

SD: Standard Deviation, keskihajonta.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (18).

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön heikentyminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautumattomat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1.

Vakiotoimintamenettelyt: Muodolliset kirjalliset menettelyt, joissa kuvataan yksityiskohtaisesti, miten tietyt rutiinimaiset ja testikohtaiset laboratoriotoimet on tehtävä. Hyvä laboratoriokäytäntö edellyttää niitä.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (18).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testi: Yksittäinen testikemikaali, joka testataan samanaikaisesti vähintään kahdella rinnakkaiskudosnäytteellä asiaan kuuluvissa vakiotoimintamenettelyissä määritetyn mukaisesti.

Kudoksen elinkyky: Parametri, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta rekonstruoidussa kudoksessa (esim. niiden kyky pelkistää vitaaliväri MTT:tä), joka mittaussuureen ja testimenetelmän mukaan korreloi elävien solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (positiivinen tulos), ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa testimenetelmiä käytetään peräkkäin. Kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen näyttöön perustuvaa prosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään strategian seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin vaarapotentiaali/voimakkuus voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, lisätestausta ei tarvita (18).

ULOQ: Ylempi määritysraja.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (YK:n GHS-järjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1: Ks. ”vakava silmävaurio”.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2: Ks. ”silmä-ärsytys.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”: Kemikaalit, jotka eivät täytä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1 tai 2 (tai YK:n GHS-järjestelmän luokkiin 2A tai 2B) luokittelun vaatimuksia. Sama kuin ”ei luokiteltu”.

UPLC: Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Validi testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testimenetelmää ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (18).

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, josta on tehty validointitutkimuksia sen merkityksellisyyden (ja tarkkuuden) sekä luotettavuuden määrittämiseksi tiettyyn tarkoitukseen. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (18).

VVM: Validoitu vertailumenetelmä.

VVM1: Tässä testimenetelmässä EpiOcular™-silmä-ärsytystesti on validoitu vertailumenetelmä 1.

VVM2: Tässä testimenetelmässä SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti on validoitu vertailumenetelmä 2.

Näyttöön perustuva lähestymistapa: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus tehdä päätelmä testiaineen vaarapotentiaalista tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Lisäys 2

SELLAISTEN KEMIKAALIEN MÄÄRITTÄMISEEN, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA JA MERKINTÖJÄ SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA, VALIDOITUJEN RHCE-TESTIEN KESKEISET OSAT

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
Protokollat	Nesteet (pipetoitavissa 37±1 °C:ssa tai alhaisemmassa lämpötilassa 15 minuutin ajan)	Kiinteät (eivät pipetoitavissa)	Nesteet ja viskoosiset aineet (pipetoitavissa)	Kiinteät (eivät pipetoitavissa)
Mallin pinta-ala	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä	Vähintään 2	Vähintään 2	Vähintään 2	Vähintään 2
Väri-interferenssin esitarkastus	50 µl + 1 ml H_2O / 60 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (värittömät kemikaalit), tai 50 µl + 2 ml isopropanolia, sekoitus 2–3 h HLT:ssä (värilliset testikemikaalit) → Jos testikemikaalin optinen tiheys on 570±20 nm:n aallonpituudella isopropanolin tai veden optisen tiheyden vähentämisen jälkeen > 0,08 (joka vastaa noin viittä prosenttia negatiivisen kontrollin keskimääräisestä optisesta tiheydestä), on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.	50 mg + 1 ml H_2O / 60 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (värittömät testikemikaalit) ja/tai 50 µl + 2 ml isopropanolia, sekoitus 2–3 h HLT:ssä (värilliset ja värittömät testikemikaalit) → Jos testikemikaalin optinen tiheys on 570±20 nm:n aallonpituudella isopropanolin tai veden optisen tiheyden vähentämisen jälkeen > 0,08 (joka vastaa noin viittä prosenttia negatiivisen kontrollin keskimääräisestä optisesta tiheydestä), on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.	10 µl + 90 µl H_2O, sekoitus 30±2 min huoneenlämpötilassa (HLT, 18–28°C) → Jos testikemikaali on värillinen, on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.	10 µl + 90 µl H_2O, sekoitus 30±2 min huoneenlämpötilassa → Jos testikemikaali on värillinen, on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
MTT:n suoran pelkistyksen esitarkastus	Liuos 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml / 180±15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit jäädyttämällä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 50 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa).	Liuos 50 mg + 1 ml MTT (1 mg/ml) / 180±15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit jäädyttämällä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 50 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa)	Liuos 30 µl + 300 µl MTT (1 mg/ml) / 180± 15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit vedellä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 30 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa).	30 mg + 300 µl MTT (1 mg/ml) / 180± 15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit vedellä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 30 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa).
Esikäsittely	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, 30 ± 2 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, valolta suojattuna.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, 30±2 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, valolta suojattuna.	—	—
Altistusannokset ja niiden applikointi	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) käyttämällä kalibroitua työkalua (esim. täysi lusikallinen, joka on kalibroitu 50 mg:lle natriumkloridia).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Käytä viskoosisille aineille nailonverkkoa.	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Altistus- aika ja -lämpötila	30 min (± 2 min) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	6 tuntia (± 0,25 h) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	30 min (± 2 min) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	4 tuntia (± 0,1 h) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH

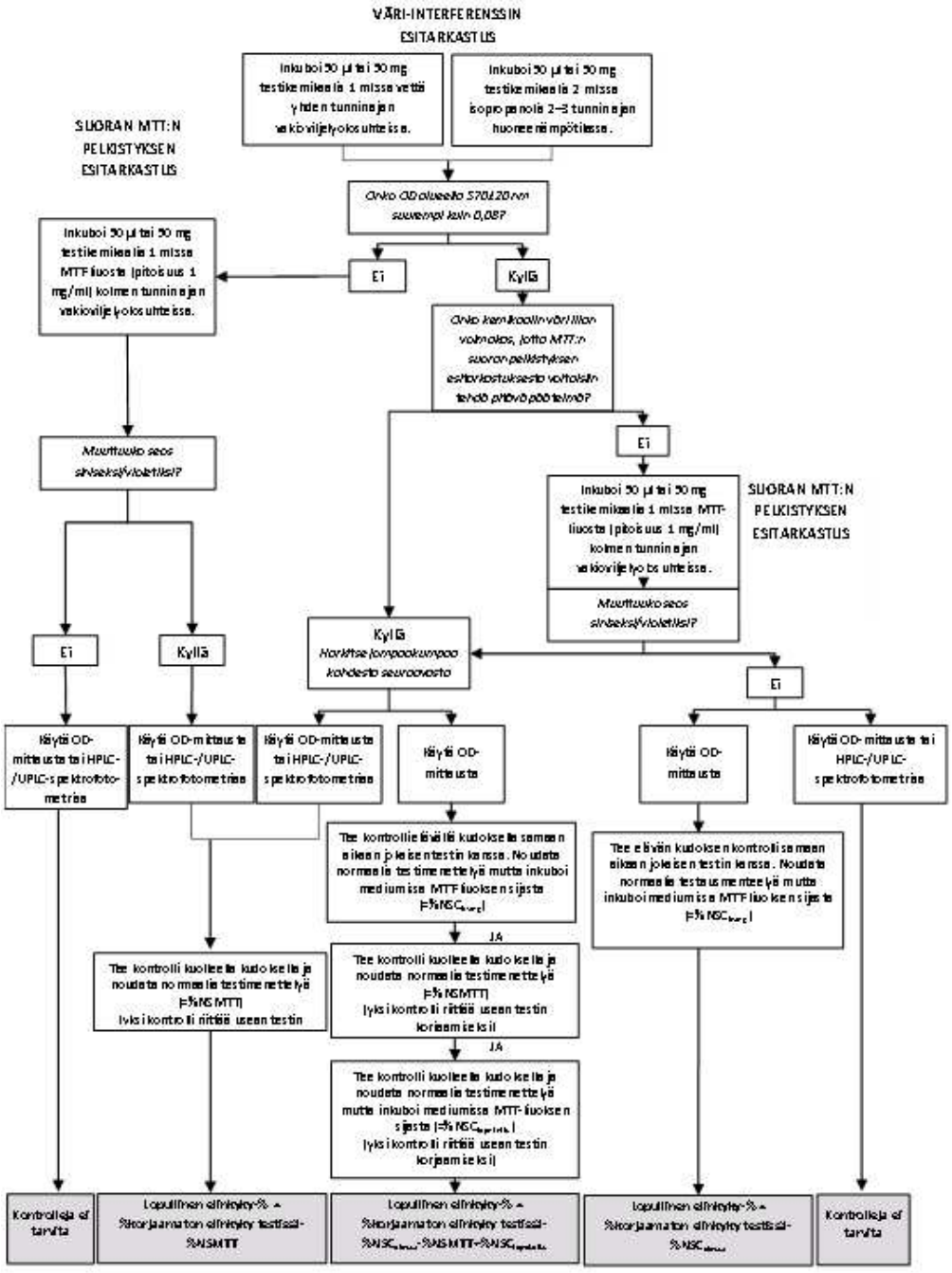
Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
Huuhtelu huoneenlämpötilassa	3 kertaa 100 ml:ssa Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää	3 kertaa 100 ml:ssa Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää
Immersio altistuksen jälkeen	12 min (± 2 min) HLT:ssä kasvatusliuoksessa	25 min (± 2 min) HLT:ssä kasvatusliuoksessa	30 min (± 2 min), 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH, kasvatusliuoksessa	30 min (± 2 min) HLT:ssä kasvatusliuoksessa
Inkubointi altistuksen jälkeen	120 min (± 15 min) kasvatusliuoksessa, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	18 h (± 0,25 h) kasvatusliuoksessa, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	Ei mitään	18 h (± 0,5 h) kasvatusliuoksessa, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Negatiivinen kontrolli	50 µl H_2O Testaus samanaikaisesti	50 µl H_2O Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää Testaus samanaikaisesti
Positiivinen kontrolli	50 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti	50 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
MTT-liuos	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT:n inkubointi- aika ja -lämpötila	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Uuttoliuotin	2 ml isopropanolia (uutto insertin pinta- ja pohjakudoksesta puhkaisemalla kudos)	2 ml isopropanolia (uutto insertin pohjakudoksesta puhkaisemalla kudos)	1,5 ml isopropanolia (uutto insertin pinta- ja pohjakudoksesta)	1,5 ml isopropanolia (uutto insertin pohjakudoksesta)
Uuttoaika ja -lämpötila	2–3 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT, yön yli, 4–10 °C	2–3 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT, yön yli, 4–10 °C	4 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT, tai vähintään yön yli ilman ravistelua, 4–10 °C	Vähintään 2 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT
Optisen tiheyden lukemat	570 nm (550–590 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (550–590 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (540–600 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (540–600 nm) ilman vertailusuodatinta
Kudoksen laadunvalvonta	Käsittely 100 µl:lla 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Käsittely 100 µl:lla 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 minuutin käsittely SDS:llä (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 minuutin käsittely SDS:llä (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
Hyväksymisperusteet	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 0,8 ja < 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 30 minuutiksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla < 50 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 0,8 ja < 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 6 tunniksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla < 50 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 1,0 ja ≤ 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 30 minuutiksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla ≤ 30 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 1,0 ja ≤ 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 4 tunniksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla ≤ 20 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.

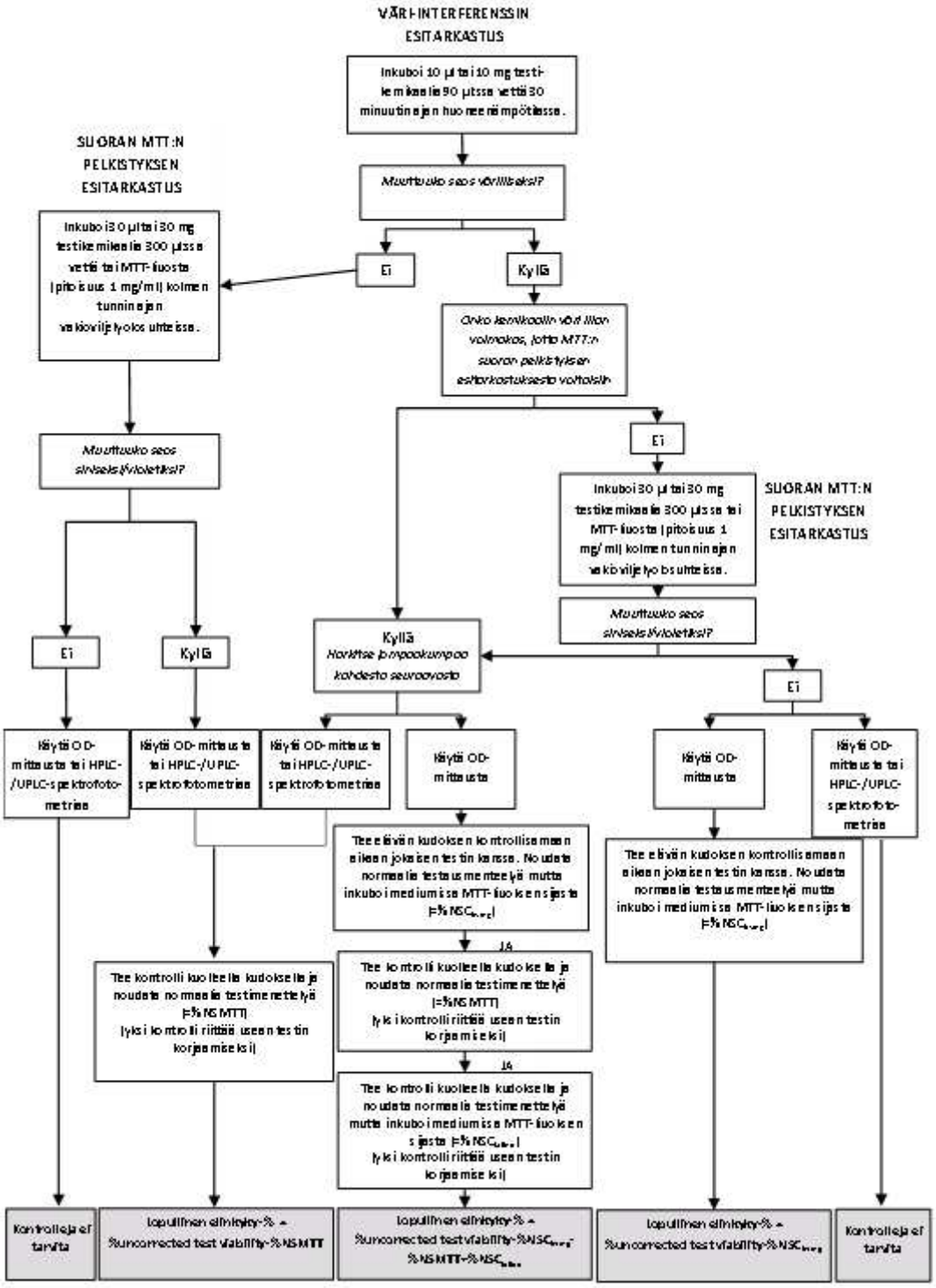
Lisäys 3

HAVAINNOLLISTAVA VUOKAAVIO: OHJEET SUORIEN MTT:N PELKISTIMIEN JA/TAI VÄRI-INTERFERENSSIÄ AIHEUTTAVIEN KEMIKAALIEN TUNNISTAMISESTA JA KÄSITTELEMISESTÄ VVM1:N VAKIOTOIMINTAMENETTELYJEN PERUSTEELLA



Lisäys 4

HAVAINNOLLISTAVA VUOKAAVIO: OHJEET SUORIEN MTT:N PELKISTIMIEN JA/TAI VÄRI-INTERFERENSSIÄ AIHEUTTAVIEN KEMIKAALIEN TUNNISTAMISESTA JA KÄSITTELEMISESTÄ VVM2:N VAKIOTOIMINTAMENETTELYJEN PERUSTEELLA



Lisäys 5

KESKEISET PARAMETRIT JA HYVÄKSYMISPERUSTEET, JOIDEN MUKAAN HPLC-/UPLC-SPEKTROFOTOMETRIAJÄRJESTELMÄ VOIDAAN HYVÄKSYÄ RHCE-KUDOSMALLISTA UUTETUN MTT-FORMATSAANIN MITTAAMISEEN

Parametri	Protokolla peräisin FDA:n ohjeista (36) (38)	Hyväksymisperusteet
Valikoivuus	Analyysi: isopropanoli, eläviä soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute elävistä RhCE-kudosmalleista ilman käsittelyä), kuolleita soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute kuolleista RhCE-kudosmalleista ilman käsittelyä) ja väri (esimerkiksi metyleenisininen)	$Area_{interference} \leq 20\ \%$ of $Area_{LLOQ}$ [1]
Täsmäävyys	Laatukontrollit (MTT-formatsaani pitoisuuksina 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanolilla (n=5)	CV ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Tarkkuus	Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	%Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Matriisivaikutus	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=5)	85 % ≤ % matriisivaikutus ≤ 115 %
Kulkeutuminen	Isopropanolin analyysi ULOQ [2]-standardin mukaan	$Area_{interference} \leq 20\ \%$ of $Area_{LLOQ}$
Toistettavuus (päivänsisäinen)	3 riippumatonta kalibrointikäyrää (perustuen 6 peräkkäiselle 1/3-laimennokselle MTT-formatsaanista isopropanolissa ULOQ-arvosta alkaen, ts. 200 µg/ml); laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	Kalibrointikäyrät: %Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta Laatukontrollit: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Toistettavuus (päivien välinen)	Päivä 1: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 2: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 3: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)	
MTT-formatsaanin lyhytaikainen stabiilius RhCE-kudosuutteessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja 24 tunnin kuluttua huoneenlämmössä säilytyksestä.	%Dev ≤ 15 %
MTT-formatsaanin pitkäaikainen stabiilius RhCE-kudosuutteessa tarvittaessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja muutaman päivän kuluttua -20 °C:ssa säilytyksestä.	%Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: Alempi määritysraja, määritetty kattamaan kudoksen elinkyky, kun se on 1–2 prosenttia, esim. 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: Ylempi määritysraja, määritetty olemaan vähintään kaksi kertaa suurempi kuin suurin odotettu MTT-formatsaanipitoisuus negatiivisten kontrollien isopropanoliuutteissa (~70 µg/ml VVM:ssä), esim. 200 µg/ml.

B.70 **IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN (hrER) PERUSTUVAT *IN VITRO* -TESTIT, JOILLA HAVAITAAN KEMIKAALIT, JOILLA ON SITOUTUMISAFFINITEETTI ESTROGEENIRESEPTORIIN**

YLEISJOHDANTO

OECD:n tulosperusteinen testiohje

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 493 (2015). Testiohje 493 on tulosperusteinen testiohje, jossa kuvataan sellaisten aineiden havaitsemiseen tarkoitettu ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin perustuva *in vitro* -testimenetelmä, joilla on sitoutumisaffiniteetti estrogeenireseptoriin (hrER:iin sitoutumistestit). Se koostuu kahdesta mekanistisesti ja toiminnallisesti samanlaisesta testistä, jotka on tarkoitettu estrogeenireseptoriin (ERα) sitoutuvien aineiden tunnistamiseen, ja sen tavoitteena on osaltaan edistää uusien samanlaisten tai muunneltujen testimenetelmien kehittämistä OECD:n vaaran arvioinnissa käytettävien uusien tai päivitettyjen testimenetelmien validointia ja kansainvälistä hyväksyntää koskevassa ohjeasiakirjassa esitettyjen validointiperiaatteiden mukaisesti (1). Kokonaisuudessaan validoidut vertailutestimenetelmät (lisäys 2 ja lisäys 3), joihin tämä tulosperusteinen testiohje pohjautuu, ovat seuraavat:

— estrogeenireseptoriin sitoutumista käsittelevä Freybergerin ja Wilsonin (FW) *in vitro* -testi, jossa käytetään kokopitkää ihmisen rekombinanttia estrogeenireseptori alfaa (2), ja

— estrogeenireseptoriin sitoutumista käsittelevä Chemical Evaluation and Research Instituten (CERI) *in vitro* -testi, jossa käytetään ihmisen rekombinanttia ligandia sitovaa domeeniproteiinia (2).

Saatavilla on suoritusvaatimukset (3), jotka helpottavat samaa vaaran kohdetta koskevien samanlaisten testimenetelmien kehittämistä ja validointia. Niiden avulla myös OECD:n testiohjetta 493 voidaan muuttaa oikea-aikaisesti, jotta päivitettyyn PBTG-ohjeeseen voidaan lisätä uusia samanlaisia testejä. Samanlaisia testejä lisätään ohjeeseen kuitenkin vasta sitten, kun OECD on tarkistanut ne ja vahvistanut, että suoritusvaatimukset täyttyvät. Testiohjeeseen 493 sisältyviä testejä voidaan käyttää OECD:n jäsenvaltioiden estrogeenireseptoriin sitoutumista koskeviin testituloksiin liittyvien vaatimusten yhteydessä samalla OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää hyödyntäen.

Taustaa ja tähän testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

2. OECD aloitti vuonna 1998 tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten. Mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli tarkistettiin vuonna 2012. Alkuperäinen ja tarkistettu toimintamalli sisältyvät liitteinä OECD:n ohjeasiakirjaan Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4). Toimintamallissa on viisi tasoa, joista kukin vastaa biologisen monimutkaisuuden eri tasoa. Tässä testimenetelmässä kuvatut estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevat testit kuuluvat tasolle 2, joka sisältää "*in vitro -testit, jotka tuottavat tietoa tietyistä endokriinisistä mekanismeista/reiteistä*". Tämä testimenetelmä sisältää reseptoriin sitoutumista tarkastelevia *in vitro* -testejä, jotka on kehitetty tunnistamaan ihmisen estrogeenireseptori alfan (ERα) ligandeja.

3. Estrogeenireseptoriin sitoutumista tarkastelevan *in vitro* -testin merkityksellisyys biologisten tehtävien kannalta on osoitettu selvästi. Estrogeenireseptoriin sitoutumista tarkastelevat testit on suunniteltu tunnistamaan kemikaalit, jotka voivat vaikuttaa haitallisesti estrogeenihormonin vaikutusreitteihin, ja kahden viime vuosikymmenen aikana niitä on käytetty laajalti estrogeenireseptorien kudoksiin jakautumisen luonnehtimisessa ja estrogeenireseptorin agonistien/antagonistien määrittämisessä. Näillä testeillä tutkitaan ligandin ja reseptorin yhteisvaikutusta, joka on estrogeenin signaalireitin ensimmäinen vaihe ja hyvin tärkeä kaikkien selkärankaisten lisääntymistoiminnoille.

4. Estrogeenien ja estrogeenireseptoreiden yhteisvaikutus voi vaikuttaa estrogeenin säätelemien geenien transkriptioon ja aiheuttaa ei-genomisia vaikutuksia, mikä voi käynnistää tai estää solujen prosesseja, myös niitä, joita tarvitaan solujen proliferaatiossa, sikiön normaalissa kehityksessä ja lisääntymistoiminnoissa (5) (6) (7). Normaalien estrogeenin säätelemien järjestelmien häiritseminen saattaa aiheuttaa haittavaikutuksia, jotka kohdistuvat normaaliin kehitykseen (ontogeneesiin), lisääntymisterveyteen ja lisääntymisjärjestelmän eheyteen. Epäasianmukainen estrogeenireseptorin signalointi voi johtaa esimerkiksi hormoniriippuvaisen syövän riskin kasvamiseen, hedelmällisyyden heikentymiseen sekä sikiön kasvun ja kehityksen muutoksiin (8).

5. *In vitro* -sitoutumistestit perustuvat aineen ja tietyn reseptorin ligandin sitoutumiskohdan, joka säätelee geenin transkriptiota, suoraan vuorovaikutukseen. Keskeinen osa ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptori alfaan (hrERα) sitoutumistestissä on mitata radioleimatun ligandin ([^{3}H]17β-estradioli) kykyä sitoutua estrogeenireseptoriin testikemikaalin (eli kilpailijan) suurenevien pitoisuuksien yhteydessä. Testikemikaalit, joilla on voimakas affiniteetti estrogeenireseptoriin, kilpailevat radioleimatun ligandin kanssa pienemmällä pitoisuudella kuin ne kemikaalit, joiden affiniteetti reseptoriin on heikompi. Tässä testissä on kaksi keskeistä osaa: saturaatiositoutumiskoe, jolla luonnehditaan reseptorin ja ligandin vuorovaikutuksen parametreja ja dokumentoidaan estrogeenireseptorin spesifisyyttä, ja kilpaileva sitoutumiskoe, jolla luonnehditaan testikemikaalin ja radioleimatun ligandin kilpailua estrogeenireseptoriin sitoutumisessa.

6. CERI- ja FW-sitoutumistestien validointitutkimukset ovat osoittaneet, että ne ovat merkityksellisiä ja luotettavia käyttötarkoitukseensa (2).

7. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet määritellään lisäyksessä 1.

Reseptoriin sitoutumistestien soveltamisala ja rajoitukset

8. Näitä testejä ehdotetaan käytettäväksi seulonnassa ja priorisoinnissa, mutta niistä voidaan saada tietoa myös haittavaikutusreitin käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta, jota voidaan käyttää näyttöön perustuvassa lähestymistavassa. Niissä tutkitaan kemikaalin sitoutumista ERα:n ligandin sitoutumisalueella *in vitro* -järjestelmässä. Tuloksia ei siis tule suoraan ekstrapoloida intaktin endokriinisen järjestelmän monimutkaiseen signalointiin ja säätelyyn *in vivo*.

9. Luonnollisen ligandin, 17β-estradiolin, sitoutuminen on ensimmäinen vaihe molekyylitason tapahtumasarjassa, joka aktivoi kohdegeenien transkription ja kulminoituu fysiologiseen muutokseen (9). Sitoutumista ERα:n ligandin sitoutumisalueelle pidetään yhtenä keskeisistä mekanismeista, jotka aiheuttavat estrogeenireseptorivälitteisiä hormonaalisia häiriöitä, vaikka on myös muita mekanismeja, joiden välityksellä niitä voi aiheutua. Niitä ovat esimerkiksi i) yhteisvaikutukset ERα:n muiden kuin ligandin sitoutumistaskun kohtien kanssa, ii) yhteisvaikutukset muiden estrogeenin signaloinnin kannalta oleellisten reseptoreiden, ERβ:n ja G-proteiinikytkentäisen estrogeenireseptorin sekä muiden endokriinisen järjestelmän reseptorien ja entsymaattisten järjestelmien kanssa, iii) hormonisynteesi, iv) hormonien metabolinen aktivaatio ja/tai inaktivaatio, v) hormonien jakautuminen kohdekudoksiin ja vi) hormonien poistuminen elimistöstä. Kummassakaan tähän testimenetelmään kuuluvista testeistä ei käsitellä näitä vaikutustapoja.

10. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan aineiden kykyä sitoutua ihmisen estrogeenireseptori alfaan, eikä siinä erotella sen agonisteja tai antagonisteja. Näissä testeissä ei käsitellä myöskään myöhempiä tapahtumia, kuten geenien transkriptiota tai fysiologisia muutoksia. Koska validoinnissa käytettiin vain yksittäisiä yhdestä ainesosasta koostuvia aineita, testimenetelmän soveltuvuutta seosten testaamiseen ei ole arvioitu. Teoriassa testejä voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

11. Soluvapailla reseptorijärjestelmillä ei ole luontaista metabolointikykyä, eikä niitä ole validoitu metabolisten entsyymijärjestelmien yhteydessä. Metabolinen aktivaatio saattaisi kuitenkin olla mahdollista sisällyttää tutkimuksen rakenteeseen, mutta se edellyttäisi uusia validointitutkimuksia.

12. Kemikaaleja, jotka voivat denaturoida proteiinia (esimerkiksi reseptoriproteiinia), kuten pinta-aktiiviset aineet, tai kemikaaleja, jotka voivat muuttaa testin puskuriaineen pH:ta, ei voida testata, tai niitä voidaan testata vain sellaisina pitoisuuksina, jotka eivät aiheuta tällaisia yhteisvaikutuksia. Muutoin pitoisuusalue, joka voidaan testata näillä testeillä, rajoittuu siihen, miten testikemikaali liukenee puskuriaineeseen.

13. Taulukossa 1 esitetään tiedoksi testin tulokset 24 aineesta, jotka testattiin kummallakin tässä testimenetelmässä kuvatulla kokonaisuudessaan validoidulla testillä. Julkaistujen raporttien perusteella näistä aineista 17 on luokiteltu estrogeenireseptoriin sitoutuviksi aineiksi ja 8 sitoutumattomiksi aineiksi. Tutkimuksissa on käytetty estrogeenireseptorin transkriptionaalista aktivaatiota koskevia *in vitro* -testejä ja/tai kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaa testiä (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Taulukossa 1 esitettyjen tietojen osalta kahdella testillä saadut luokitukset kaikista aineista 10^{-4}M:een saakka olivat miltei täysin yhtäpitävät, ja jokainen aine luokiteltiin oikein joko estrogeenireseptoriin sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi. Täydentäviä tietoja tämän ryhmän aineista ja muista aineista, jotka testattiin estrogeenireseptoriin sitoutumista tarkastelevissa testeissä validointitutkimuksissa, on hrER-sitoutumistestin suoritusvaatimuksissa (3) lisäyksessä 2 (taulukot 1, 2 ja 3).

Taulukko 1

Ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevissa FW- ja CERI-testeissä testattujen aineiden luokittelu estrogeenireseptoriin sitoutuviksi tai sitoutumattomiksi aineiksi verrattuna odotuksenmukaiseen vasteeseen

	Aineen nimi	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste	FW-testi		CERI-testi		MeSHin kemiallinen luokka	Tuoteluokka
				Pitoisuus- alue (M)	Luokittelu	Pitoisuus- luokka (M)	Luokittelu		
1	17β-estradioli	50-28-2	*Sitoutuva*	$1\times10^{-11} – 1\times10^{-6}$	Sitoutuva	$1\times10^{-11} – 1\times10^{-6}$	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
2	Noretinodreli	68-23-5	*Sitoutuva*	$3\times10^{-9} – 30\times10^{-4}$	Sitoutuva	$3\times10^{-9} – 30\times10^{-4}$	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
3	Noretindroni	68-22-4	*Sitoutuva*	$3\times10^{-9} – 30\times10^{-4}$	Sitoutuva	$3\times10^{-9} – 30\times10^{-4}$	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
4	Di-*n*-butyyliftalaatti	84-74-2	*Sitoutumaton* (*)	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	Sitoutumaton (**) ()	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	Sitoutumaton (**) ()	Hiilivety (syklinen), esteri	Pehmitin, kemiallinen välituote
5	DES	56-53-1	*Sitoutuva*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
6	17α-etinyyliestradioli	57-63-6	*Sitoutuva*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
7	Mesoheksestroli	84-16-2	*Sitoutuva*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
8	Genisteiini	446-72-0	*Sitoutuva*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	Hiilivety (heterosyklinen), flavonoidi	Luonnontuote
9	Ekuoli	531-95-3	*Sitoutuva*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	Fytoestrogeenin metaboliitti	Luonnontuote
10	Butyyliparabeeni (*n* butyyli-4-hydroksibentsoaatti)	94-26-8	*Sitoutuva*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	Sitoutuva	Parabeeni	Säilöntäaine

	Aineen nimi	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste	FW-testi		CERI-testi		MeSHin kemiallinen luokka	Tuoteluokka
				Pitoisuus- alue (M)	Luokittelu	Pitoisuus- luokka (M)	Luokittelu		
11	Nonyylifenoli (seos)	84852-15-3	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Alkyylifenoli	Välituote
12	*o,p′*-DDT	789-02-6	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Orgaaninen klooriyhdiste	Hyönteisten torjunta-aine
13	Kortikosteroni	50-22-6	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	Steroidi	Luonnontuote
14	Tsearalenoni	17924-92-4	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (heterosyklinen), laktoni	Luonnontuote
15	Tamoksifeeni	10540-29-1	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet, eläinlääke
16	5α-dihydrotestosteroni	521-18-6	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Steroidi, ei-fenolinen	Luonnontuote
17	Bisfenoli A	80-05-7	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Fenoli	Kemiallinen välituote
18	4-*n*-heptyylifenoli	1987-50-4	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Epäselvä [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Alkyylifenoli	Välituote
19	Keponi (klordekoni)	143-50-0	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (halogenoitu)	Torjunta-aine
20	Bents(a)antraseeni	56-55-3	*Sitoutumaton*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton [b]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton [b]	Aromaattinen hiilivety	Välituote
21	Enterolaktoni	78473-71-9	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Fytoestrogeeni	Luonnontuote
22	Progesteroni	57-83-0	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	Steroidi	Luonnontuote

	Aineen nimi	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste	FW-testi		CERI-testi		MeSHin kemiallinen luokka	Tuoteluokka
				Pitoisuus- alue (M)	Luokittelu	Pitoisuus- luokka (M)	Luokittelu		
23	Oktyylitrietoksisilaani	2943-75-1	*Sitoutumaton*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton	Silaani	Pintakäsittelyaine
24	Atratsiini	1912-24-9	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine

(*) Liukoisuusraja < 1×10^{-4}M.

(**) Di-n-butyyliftalaatin (DBP:n) käyttö ja luokittelu sitoutumattomaksi aineeksi perustui enintään 10^{-4} M:n testaamiseen, koska aineen oli todettu olevan liukenematon, kun konsentraatio oli 10^{-3}M (ts. sameus) joissakin laboratorioissa esivalidointitutkimusten aikana.

(+) Validointitutkimuksessa di-*n*-butyyliftalaatti (DBP) testattiin koodattuna testiaineena, ja konsentraatiot olivat enintään 10^{-3} M. Näissä olosuhteissa joissakin laboratorioissa todettiin, että radioligandin sitoutuminen väheni suurimman konsentraation (10^{-3} M) yhteydessä ja/tai että käyrän sovitus oli epäselvä. Näissä testiajoissa DBP luokiteltiin luokkaan ”epäselvä” tai ”sitoutuva” kolmessa viidestä laboratoriosta, joissa käytettiin CERI-testiä, ja viidessä kuudesta laboratoriosta, joissa käytettiin FW-testiä (ks. lähdeviite (2), kohdat IV.B.3a, b ja VI.A).

(a) Luokitus ei ollut yhdenmukainen odotuksenmukaisen luokituksen kanssa. Sen perusteella, että kolme viidestä laboratoriosta luokitteli 4-*n*-heptyylifenolin luokkaan ”epäselvä” tai ”sitoutumaton”, keskimääräinen luokitus oli epäselvä. Tarkempi tutkimus osoitti, että tämä johtui kemikaalin liukoisuuden rajoituksista, jotka estivät täyden sitoutumiskäyrän muodostumisen.

(b) Validointitutkimuksen aikana bents(a)antraseeni luokiteltiin uudelleen sitoutumattomaksi aineeksi (ts. negatiiviseksi), sillä julkaistu kirjallisuus osoitti, että tästä aineesta ilmoitettu estrogeeninen vaikutus *in vitro* (16) johtuu pääasiassa sen metabolisesta aktivaatiosta (17)(18). Aineen entsymaattinen metabolinen aktivaatio ei ole odotuksenmukainen soluvapaissa hrER-sitoutumistesteissä, siten kuin niitä on käytetty tässä laboratorioiden välisessä validointitutkimuksessa. Näin ollen tämän aineen oikea luokitus on ”sitoutumaton”, kun sitä käytetään FW- ja CERI-testien kokeellisissa olosuhteissa.

hrER-SITOUTUMISTESTIN OSAT

Testin keskeiset osat

14. Tätä testimenetelmää sovelletaan testeihin, joissa käytetään estrogeenireseptoria ja sopivan voimakasta ligandia, jota voidaan käyttää testin merkkiaineena ja joka voi syrjäytyä testikemikaalin pitoisuuksien kasvaessa. Sitoutumistesteissä on seuraava kaksi keskeistä osaa: 1) saturaatiositoutuminen ja 2) kilpaileva sitoutuminen. Saturaatiositoutumistestiä käytetään vahvistamaan reseptorivalmisteiden spesifisyys ja aktiivisuus, kun taas kilpailevalla sitoutumistestillä arvioidaan testikemikaalin kykyä sitoutua ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin (hrER).

Kontrollit

15. Perustelut ehdotetulle samanaikaiselle vertailuestrogeenille ja kontrolleille on esitettävä. Samanaikaiset kontrollit (liuotin, kantaja-aine), positiiviset kontrollit (estrogeenireseptoriin sitoutuva aine, voimakas ja heikko affiniteetti), negatiivinen kontrolli (sitoutumaton aine) (tarpeen mukaan) osoittavat, että testi toimii testiolosuhteissa ja on perusteena kokeiden välisille vertailuille; ne ovat yleensä osa tietyn kokeen hyväksymisperusteita (1). Vertailuestrogeenin ja kontrollien (ts. heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) täydellisiä pitoisuuskäyriä on käytettävä yhdellä levyllä jokaisessa testiajossa. Kaikkien muiden levyjen tulee sisältää 1) suuri (likimain radioleimatun ligandin syrjäytyminen kokonaan) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus kutakin E2:ta ja heikosti sitoutuva aine kolmena rinnakkaisnäytteenä, 2) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine kolmena rinnakkaisnäytteenä.

Laadunvalvonnan vakiomenettelyt

16. Kuvatut laadunvalvonnan vakiomenettelyt on toteutettava jokaisen testin yhteydessä, jotta varmistetaan, että aktiiviset reseptorit, kemikaalien asianmukaiset pitoisuudet ja toleranssirajat pysyvät vakaina useissa rinnakkaisnäytteissä ja että kyky tuottaa odotuksenmukainen estrogeenireseptoriin sitoutumisen vaste myös pidemmällä aikavälillä säilyy.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

17. Ennen tuntemattomien kemikaalien testaamista jollakin tähän testimenetelmään kuuluvalla testillä jokaisen laboratorion on osoitettava pätevyytensä testin käyttämisessä tekemällä saturaatiotestejä, joilla varmistetaan estrogeenireseptorivalmisteen spesifisyys ja aktiivisuus, ja kilpailevia sitoutumistestejä vertailuestrogeenilla ja kontrolleilla (heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine). Laboratorion on luotava aikaisemmat tiedot sisältävä tietokanta, jossa on 3–5 itsenäisestä ja eri päivinä tehdystä kokeesta saadut tulokset vertailuestrogeenista ja kontrolleista. Laboratorion vertailuestrogeenikontrolli ja aikaisemmat kontrollit perustuvat näihin kokeisiin, ja niitä käytetään osittain arvioitaessa testin hyväksyttävyyttä myöhempiin testiajoihin.

18. Testijärjestelmän responsiivisuus vahvistetaan myös testaamalla taulukossa 2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista koostuu joukosta estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevien testien suoritusvaatimuksissa esitettyjä vertailuaineita (3). Nämä aineet ovat kaupallisesti saatavilla, ja ne edustavat sellaisten kemikaalien luokkia, jotka yleensä liitetään estrogeenireseptoriin sitoutumiseen. Lisäksi niiden vaikutuksen voimakkuuden vaihteluväli on estrogeenireseptorien sitojien kannalta sopiva (ts. voimakkaasta heikkoon), ja niiden joukossa on myös tähän reseptoriin sitoutumattomia aineita (ts. negatiivisia aineita). Jokaisen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen osalta testattavien pitoisuuksien tulee kattaa taulukossa 2 esitetty vaihteluväli. Jokaisesta aineesta on tehtävä vähintään kolme koetta, ja tulosten on oltava odotuksenmukaisen kemiallisen aktiivisuuden mukaiset. Jokainen koe on tehtävä itsenäisesti (ts. tuoreilla reseptorin, kemikaalien ja reagenssien laimennoksilla), ja jokaisesta pitoisuudesta on testattava kolme rinnakkaisnäytettä. Pätevyys osoitetaan sillä, että jokainen pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu aine luokitellaan oikein (positiiviseksi/negatiiviseksi). Jokaisen laboratorioteknikon on tehtävä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu testi testimenetelmän mukaisia testejä opetellessaan.

Taulukko 2

Luettelo kontrolleista ja pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista kilpailevissa hrER-sitoutumistesteissä [1]

Nro	Aineen nimi	CAS-nro [2]	Odotuksenmuk. vaste [3] [4]	Testipitoisuuden vaihteluväli (M)	MeSH:n kemiallinen luokka [5]	Tuoteluokka [6]
Kontrollit (vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine, sitoutumaton aine)						
1	17−εστραδιολι	50-28-2	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
2	Noretinodreli (tai) noretindroni	68-23-5 (tai) 68-22-4	Sitoutuva	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
3	Oktyylitrietoksisilaani	2943-75-1	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silaani	Pintakäsittelyaine
Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet [6]						
4	Dietyylistilbestroli	56-53-1	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
5	17α-etinyyliestradioli	57-63-6	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
6	Mesoheksestroli	84-16-2	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
7	Tamoksifeeni	10540-29-1	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet, eläinlääke
8	Genisteiini	446-72-0	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterosyklinen yhdiste, flavonoidi	Luonnontuote

Nro	Aineen nimi	CAS-nro (2)	Odotuksenmuk. vaste (3) (4)	Testipitoisuuden vaihteluväli (M)	MeSH:n kemiallinen luokka (5)	Tuoteluokka (6)
9	Bisfenoli A	80-05-7	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenoli	Kemiallinen välituote
10	Tsearalenoni	17924-92-4	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterosyklinen yhdiste, laktoni	Luonnontuote
11	Butyyliparabeeni	94-26-8	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karboksyylihappo, fenoli	Säilöntäaine
12	Atratsiini	1912-24-9	Sitoutumaton	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine
13	Di-n-butyyliftalaatti (DBP) (6)	84-74-2	Sitoutumaton (6)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hiilivety (syklinen), esteri	Pehmitin, kemiallinen välituote
14	Kortikosteroni	50-22-6	Sitoutumaton	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroidi	Luonnontuote

(1) Jos pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta ei ole enää kaupallisesti saatavilla, voidaan käyttää ainetta, jolla on sama luokitus estrogeenireseptoriin sitoutumisen osalta sekä verrattavissa oleva voimakkuus ja kemiallinen luokka.
(2) Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.
(3) Luokitus ERα:aan sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevien CERI- ja FW-testien validointitutkimuksessa (2).
(4) Estrogeenireseptoriin sitoutumisaktiviteetti perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testejä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (9) sekä julkaistuista ja arvioiduista vertailututkimuksista saatuihin empiirisiin ja muihin tietoihin (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) DBP:tä voidaan käyttää vaihtoehtoisena kontrollina sitoutumattomasta aineesta; enimmäispitoisuus saa olla 10^{-4} M.
(8) Tämän aineen liukoisuusraja on 10^{-4} M. Di-n-butyyliftalaatin (DBP:n) käyttö ja luokittelu sitoutumattomaksi aineeksi perustui enintään 10^{-4} M:n testaamiseen, koska aineen oli todettu olevan liukenematon, kun konsentraatio oli 10^{-3}M (ts. sameus) joissakin laboratorioissa esivalidointitutkimusten aikana.

Testikemikaalien liukoisuuden testaus ja pitoisuusalueen määritys

19. Ensin on tehtävä alustava testi, jossa määritetään jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja ja testiä tehtäessä käytettävä asianmukainen pitoisuusalue. Jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja on määritettävä alustavasti liuottimessa ja vahvistettava myöhemmin testiolosuhteissa. Testissä testattava lopullinen pitoisuus saa olla enintään 1 mM. Pitoisuusalueen määritystesti koostuu liuotinkontrollista ja kahdeksasta logaritmiseen asteikkoon perustuvasta sarjalaimennoksesta, jotka aloitetaan suurimmasta hyväksyttävästä pitoisuudesta (esim. 1 mM tai vähemmän liukoisuusrajan mukaan) ja todetun sameuden tai sakan määrän mukaan. Toisen ja kolmannen kokeen pitoisuuksia on mukautettava tarpeen mukaan, jotta pitoisuus-vastekäyrää voidaan luonnehtia paremmin.

Testiajon hyväksymisperusteet

20. Testiajon hyväksyminen tai hylkääminen perustuu jokaisessa kokeessa käytetyistä vertailuestrogeenista ja kontrolleista saatujen tulosten arviointiin. Ensinnäkin levyn 1 osalta kunkin kokeen vertailukontrollien täysien pitoisuuskäyrien on täytettävä suoritusvaatimukset ja käyrän sovituksen parametrit (esim. IC_{50} ja Hillslope), jotka perustuvat CERI- ja FW-testien protokollista (lisäys 2 ja 3) ilmoitettuihin tuloksiin sekä testin tekevän laboratorion aiempiin vertailutietoihin. Kaikki kontrollit (vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) on luokiteltava oikein jokaisessa kokeessa. Toiseksi on arvioitava, ovatko kaikki seuraavilla levyillä olevat kontrollit yhdenmukaisia levyn 1 kanssa. Testikemikaalista on käytettävä riittävän monta pitoisuutta, jotta kilpailevan sitoutumiskäyrän huippu voidaan määrittää selvästi. Rinnakkaisnäytteiden vaihtelun on oltava kohtuullista ja tieteellisesti perusteltavissa testikemikaalin jokaisen pitoisuuden ja kolmen itsenäisen testiajon osalta. Laboratorion kyky tehdä testi johdonmukaisesti on osoitettava luomalla tietokanta vertailuestrogeenin ja kontrollien aiemmista tiedoista ja ylläpitämällä sitä. Keskihajontalukuja tai variaatiokertoimia voidaan käyttää vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvaa ainetta sisältävän kontrollin käyrän sovitusparametrien keskiarvoina useista kokeista laboratorionsisäisen toistettavuuden mittarina. Kontrollilevyjen tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita jokaisen testiajon ja jokaisen testikemikaalin osalta.

Lisäksi on noudatettava seuraavia hyväksymisperusteisiin liittyviä periaatteita:

— Tietojen on oltava riittävät, jotta estrogeenireseptoriin sitoutuminen voidaan arvioida kvantitatiivisesti.

— Testattujen pitoisuuksien on pysyttävä testikemikaalin liukoisuusalueen rajoissa.

Aineiston analysointi

21. Saturaatiositoutumista ja kilpailevaa sitoutumista koskevien tietojen analysoinnille määritetyssä menettelyssä on noudatettava reseptorin ja ligandin yhteisvaikutusten luonnehtimisen keskeisiä periaatteita. Saturaatiositoutumista koskevat tiedot analysoidaan yleensä käyttämällä epälineaarista regressiomallia, jolla tarkastellaan kokonaissitoutumista ja epäspesifistä sitoutumista. Ligandin depleetiota koskevaa korjausta (esim. Swillens, 1995 (19)) voidaan tarvita määritettäessä Bmax- ja Kd-arvoja. Kilpailevaa sitoutumista koskevien testien tiedot yleensä muunnetaan (esimerkiksi testikemikaalin prosentuaalinen spesifi sitoutuminen ja pitoisuus (log M)). Jokaisen testikemikaalin log (IC_{50}) -estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin. Alustavan analyysin jälkeen on tarkistettava käyrän sovituksen parametreilla ja silmämääräisesti, miten hyvin sitoutumistiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään. Joissakin tapauksissa lisäanalyysi voi olla tarpeen, jotta käyrän sovitus olisi paras mahdollinen (esimerkiksi rajoittamalla käyrän ylä- ja/tai alapäätä käyttämällä 10 prosentin sääntöä, ks. lisäys 4 ja lähdeviite 2 (kohta III.A.2).

22. Hyväksymisperusteiden (20 kohta) täyttyminen tarkoittaa, että testijärjestelmä toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että tietty testi tuottaisi tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testin tulosten toistuminen on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa.

Yleiset aineiston tulkintaperusteet

23. Tällä hetkellä estrogeeniin sitoutumista koskevan aineiston tulkintaan ei ole yleisesti hyväksyttyä menetelmää. hrER-välitteisten vaikutusten laadullisten (ts. sitoutuva/sitoutumaton aine) ja/tai määrällisten (ts. log IC_{50}, suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) jne.) arviointien on perustuttava empiiriseen aineistoon ja vankkaan tieteelliseen näkemykseen.

Testiraportti

24. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi:

— käytetty testi

Kontrolli-/vertailu-/testikemikaali

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus siinä kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin,

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi,

— rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin/kantaja-aine:

— luonnehdinta (luonne, toimittaja ja erä)

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Reseptorit:

— reseptorien lähde (toimittaja, luettelonro, erä, reseptorin laji, toimittajalta saatu aktiivisen reseptorin pitoisuus, todistus toimittajalta)

— reseptorien luonnehdinta (myös tulokset saturaatiositoutumisesta): Kd, Bmax

— reseptorien säilytys

— radioleimattu ligandi:

— toimittaja, luettelonro, erä, spesifi aktiivisuus.

Testiolosuhteet:

— liukoisuusrajoitukset testiolosuhteissa

— sitoutumispuskurin koostumus

— reseptorin pitoisuus

— merkkiaineen (esim. radioleimatun ligandin) pitoisuus

— testikemikaalin pitoisuudet

— kantaja-aineen prosentuaalinen osuus lopullisessa testissä

— inkubaatiolämpötila ja -aika

— sitoutuneen/vapaan ligandin erottelumenetelmä

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit / vertailuaineet

— kriteerit, joiden perusteella testit määritellään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Hyväksyttävyyden tarkastus:

— samanaikaisten positiivisten kontrollien/vertailuaineiden IC_{50}- ja Hillslope-arvot

Tulokset:

— raakatiedot ja sitoutunutta/vapaata ligandia koskevat tiedot

— denaturoinnin vahvistustarkastus tarvittaessa

— jos se on saatavana, pienin vaikuttava pitoisuus (LEC)

— RBA- ja/tai IC_{50}-arvot sen mukaan, mikä on tarpeen

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— mahdolliset tilastoanalyysit sekä virhe- ja luottamusvälitiedot (ts. SEM, SD, CV tai 95 %:n luottamusväli) ja kuvaus siitä, miten nämä arvot saatiin.

Tulosten tarkastelu:

— 10 prosentin säännön soveltaminen

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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: s. 20–6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): s. 1073–89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): s. 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. s. 1–188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT JA LYHENTEET

10 prosentin sääntö: Mahdollisuus sulkea analyysista pois datapisteet, joissa rinnakkaisnäytteiden [^{3}H]17β-estradiolin spesifisen prosentuaalisen sitoutumisen keskiarvo on vähintään 10 prosenttia suurempi kuin pienemmällä pitoisuudella saatu keskiarvo (ks. lisäys 4).

Hyväksymisperusteet: Kontrollikokeiden suorittamista ja vertailustandardeja koskevat vähimmäisvaatimukset. Kaikkien hyväksymisperusteiden on täytyttävä, jotta koe olisi validi.

Tarkkuus (vastaavuus): Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testin suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testin oikeiden tulosten osuutta (1).

TM: Hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli.

Kemikaali: Aine tai seos.

CV: Variaatiokerroin

E2: 17β-estradioli

HH: hormonitoiminnan häiriöt

hERα: Ihmisen estrogeenireseptori alfa

ER: Estrogeenireseptori

Estrogeeninen vaikutus: Kemikaalin kyky jäljitellä 17β-estradiolin kykyä sitoutua estrogeenireseptoreihin. Tällä testimenetelmällä voidaan havaita hERα-reseptoriin sitoutuminen.

IC50: Puolet estävän testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea).

Laboratorioidenvälinen toistettavuus: Se, missä määrin eri pätevät laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samaa tutkimusprotokollaa ja testaamalla samoja aineita. Laboratorioidenvälinen toistettavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (1).

Laboratorionsisäinen toistettavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimusprotokollaa eri ajankohtina. (1).

LEC: Lowest effective concentration eli testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla saadaan vaste (ts. testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla induktiokerroin eroaa tilastollisesti samanaikaisesta kantaja-ainekontrollista).

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tarkoittaa samaa kuin samanlainen testimenetelmä.

TPTO: Tulosperusteinen testiohje

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testin vertailtavuutta. Vaatimuksiin sisältyy 1) testin oleelliset osat; 2) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun testimenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja 3) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (1).

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet: Joukko suoritusvaatimuksiin sisältyviä vertailuaineita, joita laboratoriot voivat käyttää vakiotestiin liittyvän teknisen osaamisensa osoittamisessa. Näiden aineiden valintaperusteisiin kuuluu yleensä se, että niiden on edustettava erilaisia vasteita ja oltava kaupallisesti saatavilla. Lisäksi niistä on oltava käytettävissä laadukkaita vertailutietoja.

Pätevyys: Osoitettu kyky tehdä testi asianmukaisesti ennen tuntemattomien aineiden testaamista.

Vertailuestrogeeni: 17ß-estradioli (E2, CAS 50-28-2).

Vertailutestimenetelmät: Testit, joihin TPTO 493 perustuu.

RBA: Relative Binding Affinity, suhteellinen sitoutumisaffiniteetti. Aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti lasketaan prosenttiosuutena aineen log (IC_{50}) -arvosta (IC_{50}) suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (1).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa.

SD: Keskihajonta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Validoitu testimenetelmä: Testi, josta on tehty validointitutkimuksia sen merkityksellisyyden (ja tarkkuuden) sekä luotettavuuden määrittämiseksi tiettyyn tarkoitukseen. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (1).

Validointi: Prosessi, jossa tietyn lähestymistavan, menetelmän, testin, prosessin tai arvioinnin luotettavuus ja merkityksellisyys vahvistetaan määrättyyn tarkoitukseen (1).

Lisäys 2

FREYBERGER-WILSONIN SATURAATIOSITOUTUMISTA JA KILPAILEVAA SITOUTUMISTA ESTROGEENIRESEPTORIIN (ERα) KOSKEVAT IN VITRO -TESTIT, JOISSA KÄYTETÄÄN KOKOPITKÄÄ REKOMBINANTTIA ERα:ÄÄ.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä saturaatiositoutumista ja kilpailevaa sitoutumista estrogeenireseptoriin (ERα) tarkastelevassa *in vitro* -testissä käytetään kokopitkää ihmisen reseptoria ERα(hrERα), joka on tuotettu bakuloviruksella infektoiduissa hyönteissoluissa ja eristetty niistä. Freybergerin ja Wilsonin kehittämälle tutkimusprotokollalle tehtiin kansainvälinen monen laboratorion suorittama validointitutkimus (2), joka osoitti, että se on merkityksellinen ja luotettava testin käyttötarkoituksen kannalta.

2. Tämä testi on sellaisten aineiden tunnistamiseen tarkoitettu seulontamenettely, jotka voivat sitoutua kokopitkään hrERα:aan. Sillä määritetään testikemikaalin kyky kilpailla 17β-estradiolin kanssa hrERα:aan sitoutumisesta. Kvantitatiivisia testituloksia voivat olla esimerkiksi IC_{50} (testikemikaalin se pitoisuus, joka tarvitaan siihen, että puolet [^{3}H]-17β-estradiolista syrjäytetään hrERα:sta) ja testikemikaalin suhteelliset sitoutumisaffiniteetit hrERα:aan 17β-estradioliin verrattuna. Kemikaalien seulonnassa hyväksyttäviä laadullisia tuloksia voivat olla testikemikaalien luokittelut joko hrERα:aan sitoutuviksi tai sitoutumattomiksi aineiksi tai epäselviksi sitoutumiskäyriä koskevien kriteerien perusteella.

3. Testissä käytetään radioaktiivista ligandia, mikä edellyttää laboratoriolta radioaktiivisten materiaalien käyttölupaa. Kaikissa menettelyissä, joissa käytetään radioisotooppeja ja vaarallisia kemikaaleja, on noudatettava kansallisen lainsäädännön määräyksiä ja menettelyjä.

4. Kohdat "**YLEISJOHDANTO**" ja "**IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN SITOUTUMISTA TARKASTELEVAN TESTIN OSAT**" on luettava ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testiohjeessa käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATTEET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptori alfaan (hrERα) sitoutumista tarkastelevassa testissä mitataan radioleimatun ligandin ([3H]17β-estradioli) kykyä sitoutua estrogeenireseptoriin testikemikaalin (eli kilpailijan) suurenevien pitoisuuksien yhteydessä. Testikemikaalit, joilla on voimakas affiniteetti estrogeenireseptoriin, kilpailevat radioleimatun ligandin kanssa pienemmällä pitoisuudella kuin ne kemikaalit, joiden affiniteetti reseptoriin on heikompi.

6. Tässä testissä on kaksi keskeistä osaa: saturaatiositoutumiskoe, jolla luonnehditaan reseptorin ja ligandin yhteisvaikutuksen parametreja, ja kilpaileva sitoutumiskoe, jolla luonnehditaan testikemikaalin ja radioleimatun ligandin kilpailua estrogeenireseptoriin sitoutumisessa.

7. Saturaatiositoutumiskokeen tarkoituksena on luonnehtia tietyn reseptorien erän sitoutumisaffiniteettia ja määrää kilpailevaa sitoutumista tarkastelevan kokeen valmistelussa. Saturaatiositoutumiskokeessa mitataan tasapaino-olosuhteissa kiinteän estrogeenireseptoripitoisuuden affiniteettia sen luonnolliseen ligandiin nähden (esitettynä dissosiaatiovakiolla, Kd) ja aktiivisten reseptorikohtien määrää (Bmax).

8. Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan aineen affiniteettia kilpailla [3H]17β-estradiolin kanssa estrogeenireseptoriin sitoutumisessa. Affiniteetti kvantifioidaan sellaisella testikemikaalin pitoisuudella, joka tasapaino-olosuhteissa estää 50 prosenttia [3H]17β-estradiolin spesifisestä sitoutumisesta ("50 prosenttia estävä pitoisuus" tai IC50). Tätä voidaan arvioida käyttämällä myös suhteellista sitoutumisaffiniteettia (RBA, suhteessa estradiolin IC50-arvoon, joka on mitattu erikseen samassa ajossa). Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan [3H]17β-estradiolin sitoutumista kiinteänä pitoisuutena samalla, kun läsnä on laaja kirjo (kahdeksan suuruusluokkaa) testikemikaalipitoisuuksia. Sen jälkeen tiedot sovitetaan, mikäli mahdollista, jotta voidaan muodostaa Hillin yhtälö (Hill, 1910), jolla kuvataan sitä, miten yhdessä paikassa oleva kilpaileva sitoutuva aine syrjäyttää radioligandin. Sen perusteella, missä määrin radioleimattua estradiolia syrjäytetään, luonnehditaan testikemikaalia sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi tai epäselvän vasteen tuottavaksi.

MENETTELY

hrERα-proteiinin hyväksyttävän suorituskyvyn osoittaminen

9. Ennen kuin saturaatiositoutumistestiä ja kilpailevan sitoutumisen testiä aletaan käyttää rutiininomaisesti, on osoitettava, että jokainen uusi hrERα-erä toimii asianmukaisesti siinä laboratoriossa, jossa sitä käytetään. Suorituskyky osoitetaan kaksivaiheisella menettelyllä. Nämä vaiheet ovat seuraavat:

— Tehdään [^{3}H]-17β-estradiolin saturaatiositoutumistesti, jolla osoitetaan hrERα-spesifisyys ja saturaatio. Näiden tietojen epälineaarisella regressioanalyysilla (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja sen jälkeen tehtävällä Scatchardin kuvaajalla osoitetaan [^{3}H]-17β-estradiolin sitoutumisaffiniteetti hrERα:aan (Kd) ja reseptorien määrä (Bmax) jokaisessa hrERα-erässä.

— Tehdään kilpailevaa sitoutumista tarkasteleva testi käyttämällä kontrolliaineita (vertailuestrogeeni (17β-estradioli)), heikosti sitoutuva aine (esimerkiksi noretinodreli tai noretindroni) ja sitoutumatonta ainetta (oktyylitrietoksisilaani, OTES). Jokaisen laboratorion on luotava aiemmista tiedoista koostuva tietokanta, jolla dokumentoidaan IC_{50} -arvojen ja muiden oleellisten arvojen yhdenmukaisuus vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen osalta eri kokeissa ja eri hrERα-erissä. Kontrolliaineiden kilpailevan sitoutumisen käyrien parametrien on oltava 95 prosentin luottamusvälin rajoissa (ks. taulukko 1). Nämä raja-arvot on laadittu tämän testin validointitutkimukseen osallistuneista laboratorioista saatujen tietojen perusteella (2).

Taulukko 1

Vertailuestrogeenille ja heikosti sitoutuvalle aineelle kehitetyt suorituskykyvaatimukset (FW hrER -sitoutumistesti)

Aine	Parametri	Keskiarvo [a]	Keskihajonta (n)	95 %:n luottamusvälit [b]	
				Alaraja	Yläraja
17β-estradioli	Ylin (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Alin (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillslope	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodreli	Ylin (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Alin (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillslope	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindroni[c]	Ylin (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Alin (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillslope	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Keskiarvo (n) ± keskihajonta (SD) laskettiin käyttämällä käyrän sovituksen parametriestimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin neljässä laboratoriossa validointitutkimuksen aikana (ks. lähdeviitteen 2 liite N).

[b] 95 prosentin luottamusvälit on tarkoitettu ohjeeksi hyväksymisperusteiden soveltamiseen.

[c] Noretindronin testaus oli valinnaista validointitutkimuksen alatehtävä 4:ssä (ks. lähdeviite 2, alatehtävä 4). Keskiarvo ± SD (n) laskettiin siis käyttämällä käyrän sovituksen estimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin kahdessa laboratoriossa.

IC_{50}-arvon vaihteluväliin vaikuttaa kussakin laboratoriossa käytetyn reseptorivalmisteen Kd ja radioleimatun ligandin pitoisuus. IC_{50}-arvon vaihteluvälin asianmukainen mukautus testin tekemisessä käytettyjen olosuhteiden perusteella on hyväksyttävää.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

10. Ks. 17 ja 18 kohta ja taulukko 2 kappaleesta ”h**rER-SITOUTUMISTESTIN OSAT**” tämän testimenetelmän osalta. Kummassakin testissä (saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen testissä) pitää olla kolme itsenäistä testiajoa (ts. tuoreilla reseptori-, kemikaali- ja reagenssilaimennoksilla), jotka tehdään eri päivinä, ja jokaisessa testiajossa on oltava kolme rinnakkaisnäytettä.

Reseptorin (hrERα) pitoisuuden määrittäminen

11. Aktiivisen reseptorin pitoisuus vaihtelee jonkin verran erän ja säilytysolosuhteiden mukaan. Tämän vuoksi toimittajalta saadun aktiivisen reseptorin pitoisuus on määritettävä. Näin varmistetaan, että aktiivisen reseptorin pitoisuus on testiajossa asianmukainen.

12. Kilpailevaa sitoutumista vastaavissa olosuhteissa (ts. 1 nM [^{3}H]-estradiolia) reseptorista on inkuboitava 0,25, 0,5, 0,75 ja 1 nM:n nimellispitoisuudet ilman (kokonaissitoutuminen) 1 μM:n pitoisuutta leimaamatonta estradiolia ja sen kanssa (epäspesifi sitoutuminen). Spesifinen sitoutuminen, joka lasketaan kokonais- ja epäspesifin sitoutumisen erotuksena, esitetään suhteessa reseptorin nimellispitoisuuteen. Reseptorin pitoisuus, josta saatavat spesifiset sitoutumisarvot ovat 20 prosenttia lisätystä radioleimatusta aineesta, suhteutetaan vastaavaan reseptorin nimellispitoisuuteen, joka on se reseptorin pitoisuus, jota pitää käyttää saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen kokeissa. Tämän ehdon täyttää usein hrER:n loppupitoisuus 0,5 nM.

13. Jos 20 prosentin ehtoa ei voida täyttää toistuvasti, koejärjestely on tarkistettava mahdollisten virheiden varalta. Jos 20 prosentin ehtoa ei voida täyttää, se voi olla merkki siitä, että rekombinanttierässä on hyvin vähän aktiivista reseptoria. Tällöin on syytä harkita toisen reseptorierän käyttämistä.

Saturaatiotesti

14. Tässä testissä on arvioitava kahdeksan suurenevaa pitoisuutta [^{3}H]17β-estradiolista kolmena rinnakkaisnäytteenä seuraavan kolmen ehdon mukaisesti (ks. taulukko 2):

— Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja estrogeenireseptorin kanssa. Tässä määritetään kokonaissitoutuminen määrittämällä radioaktiivisuus niissä kuopissa, joissa on vain [3H]17β-estradiolia.

— Leimattuun 17β-estradioliin nähden 1 000 kertaa suuremman leimaamattoman 17β-estradiolipitoisuuden ja estrogeenireseptorin kanssa. Tämän ehdon tarkoituksena on saturoida aktiiviset sitoutumiskohdat leimaamattomalla 17β-estradiolilla ja määrittää epäspesifinen sitoutuminen mittaamalla kuoppien radioaktiivisuus. Mahdollisen jäljellä olevan radioaktiivisen estradiolin, joka voi sitoutua reseptoriin, katsotaan sitoutuvan epäspesifiseen kohtaan, koska ei-radioaktiivista estradiolia pitäisi olla niin suuri pitoisuus, että se sitoutuu kaikkiin saatavilla oleviin spesifisiin kohtiin reseptorissa.

— Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja ilman estrogeenireseptoria (kokonaisradioaktiivisuuden määrittäminen).

[^{3}H]-17β-estradiolia ja leimaamatonta 17β-estradiolia sisältävien liuosten valmistaminen

15. [^{3}H]-17β-estradiolin laimennokset on valmistettava lisäämällä testipuskuria 12 nM:n varastoliuokseen [^{3}H]-17β-estradiolia, jotta saadaan pitoisuudet, jotka vaihtelevat välillä 0,12 nM ja 12 nM. Lisäämällä 40 μl näitä liuoksia 96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen testikuoppiin (lopullinen tilavuus 160 μl) saadaan lopulliset testipitoisuudet, jotka vaihtelevat välillä 0,03–3,0 nM. Testipuskurin, [^{3}H]-17β-estradiolia sisältävän varastoliuoksen ja laimennosten valmistaminen sekä pitoisuuksien määrittäminen on selostettu perusteellisesti FW-testin protokollassa (2).

16. Etanolia sisältävien 17β-estradioliliuosten laimennokset on valmistettava lisäämällä testipuskuria siten, että saadaan kahdeksan suurenevaa pitoisuutta välillä 0,06 μM ja 6 μM. Lisäämällä 80 μl näitä liuoksia 96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen testikuoppiin (lopullinen tilavuus 160 μl) saadaan lopulliset testipitoisuudet, jotka vaihtelevat välillä 0,03 μM ja 3 μM. Leimaamattoman 17β-estradiolin lopullinen pitoisuus yksittäisissä epäspesifisissä sitoutumistestin kuopissa pitää olla 1 000 kertaa suurempi kuin leimatun [^{3}H]-17β- estradiolin pitoisuuden. Leimaamattomien 17β-estradiolilaimennosten valmistaminen on selostettu FW-testin protokollassa (2).

17. Testissä on käytettävä sellaista reseptorin nimellispitoisuutta, jolla spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 20±5 prosenttia (ks. 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

18. 96-kuoppaiset mikrotiitterilevyt valmistellaan taulukossa 2 kuvatun mukaisesti kolmella rinnakkaisnäytteellä pitoisuutta kohti. Lisäyksessä 2.2 on esimerkkejä siitä, miten [^{3}H]-17β-estradiolin, leimaamattoman 17β-estradiolin, puskurin ja reseptorin pitoisuus ja määrä levyillä jaotellaan.

Taulukko 2

Mikrotiitterilevyn järjestys saturaatiositoutumistestissä

	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			Kokonaissitoutuminen (liuotin)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 µM E_2			Epäspesifinen sitoutuminen
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER+ 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [3H]-17β-estradioli
ER: Estrogeenireseptori
E_2: Leimaamaton 17β-estradioli

19. Testin mikrotiitterilevyjä on inkuboitava 2–8 °C:n lämpötilassa 16–20 tuntia, ja ne on asetettava sekoittajaan inkuboinnin ajaksi.

hrERα:aan sitoutuneen [3H]-17β-estradiolin mittaaminen

20. [^{3}H]-17β-estradioli, joka on sitoutunut hrERα:aan, on erotettava vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä jokaiseen kuoppaan 80 µl kylmää DCC-suspensiota ja ravistelemalla mikrotiitterilevyjä 10 minuuttia ja sentrifugoimalla niitä sen jälkeen 10 minuuttia kierrosluvulla 2 500 rpm. Jotta voidaan minimoida sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin dissosioituminen hrERα:sta tässä prosessissa, on erittäin tärkeää, että puskurit ja testilevyt pidetään 2–8 °C:ssa ja että jokainen vaihe tehdään nopeasti. Mikrotiitterilevyjen ravistelija on tarpeen, jotta levyt voidaan käsitellä tehokkaasti ja nopeasti.

21. Kuopista on otettava 50 µl supernatanttia, joka sisältää hrERα:aan sitoutunutta [^{3}H]-17β-estradiolia, erittäin varovasti, jotta kuopat eivät kontaminoidu joutumalla kosketuksiin DCC:n kanssa. Tämä määrä supernatanttia on laitettava toiselle mikrotiitterilevylle.

22. Jokaiseen kuoppaan (A1–B12 ja D1–E12) on lisättävä 200 µl tuikenestettä, joka pystyy muuntamaan ydinsäteilyn liike-energian valoenergiaksi. Kuopat G1–H12 (yksilöity kokonais-dpm:n mittaamiseen) edustavat [^{3}H]-17β-estradiolin sarjalaimennoksia (40 µl), jotka on laitettava suoraan mittauslevyn kuopissa olevaan tuikenesteeseen, kuten taulukossa 3 on näytetty. Nämä kuopat sisältävät siis vain 200 µl tuikenestettä ja asianmukaisen laimennoksen [3H]-17β-estradiolia. Näillä mittauksilla osoitetaan, paljonko [^{3}H]-17β-estradiolia dpm:issä lisättiin kaikkiin kokonaissitoutumista ja epäspesifiä sitoutumista mittaaviin kuoppiin.

Taulukko 3

Mikrotiitterilevyn järjestys saturaatiositoutumistestissä, radioaktiivisuuden mittaus

	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			Kokonaissitoutuminen (liuotin)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 µM E_2			Epäspesifinen sitoutuminen
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER+ 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E_2 (kokonais-dpm:t)			0,06 nM [^{3}H] E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2			Kokonais-dpm:t (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[3H] E2: [3H]-17β-estradioli
ER: Estrogeenireseptori
E2: Leimaamaton 17β-estradioli
dpm:t: disintegrations per minute, hajoamista minuutissa
(*) Radioaktiiviset sarjalaimennokset [^{3}H]-leimattua estradiolia on lisättävä suoraan 200 µl:aan tuikenestettä kuopissa G1–H12.

23. Mittaukset on aloitettava vähintään kahden tunnin viipeellä, ja laskenta-ajan tulee olla 40 minuuttia kuoppaa kohti. Kuoppakohtaisen dpm-arvon määrittämisessä on käytettävä mikrotiitterilevyn tuikelaskuria ja vaimennuskorjausta. Vaihtoehtoisesti näytteet voidaan mitata tavanomaisella laskurilla, jos mikrotiitterilevyjen tuikelaskuria ei ole saatavilla. Tällöin voidaan lyhentää laskenta-aikaa.

Kilpailevan sitoutumisen testi

24. Kilpailevan sitoutumisen testissä mitataan yhden [^{3}H]-17β-estradiolipitoisuuden sitoutumista samaan aikaan suurenevien testikemikaalipitoisuuksien kanssa. Jokaisesta pitoisuudesta on oltava kolme rinnakkaisnäytettä yhdessä testiajossa. Lisäksi on tehtävä kolme eriaikaista testiajoa jokaisesta testikemikaalista. Testi on tehtävä yhdellä tai useammalla 96-kuoppaisella mikrotiitterilevyllä.

Kontrollit

25. Testiä tehtäessä jokaiseen kokeeseen tulee sisältyä samanaikainen liuotinkontrolli ja muut kontrollit (ts. vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine). Vertailuestrogeenin ja kontrollien (ts. heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) täydellisiä pitoisuuskäyriä on käytettävä yhdellä levyllä jokaisessa testiajossa. Kaikilla muilla levyillä on oltava i) suuri (suurin syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus E2:sta ja heikosti sitoutuvasta aineesta kolmena rinnakkaisnäytteenä, ii) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine, kukin vähintään kolmena rinnakkaisnäytteenä. Testipuskurin, kontrollien, [^{3}H]-17β-estradioli-, hrERα- ja testikemikaaliliuosten valmistamismenettelyt on selostettu lähdeviitteessä 2 (ks. FW-testin protokollan liite K).

Liuotinkontrolli:

26. Liuotinkontrolli osoittaa, ettei liuotin vaikuta testijärjestelmään. Sillä mitataan myös kokonaissitoutumista. Suositeltu liuotin on etanoli. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää DMSO:ta, jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene etanoliin. Etanolin tai DMSO:n pitoisuus lopullisissa testikuopissa on 1,5 prosenttia, eikä se saa ylittää kahta prosenttia.

Puskurikontrolli:

27. Puskurikontrolli ei saa sisältää liuotinta eikä testikemikaalia mutta kaikkia muita testin aineita. Puskurikontrollin tuloksia verrataan liuotinkontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään.

Voimakkaasti sitoutuva aine (vertailuestrogeeni)

28. 17β-estradioli (CAS 50-28-2) on endogeeninen ligandi, ja se sitoutuu suurella affiniteetilla estrogeenireseptorin alatyyppi alfaan. Jokaisesta kilpailevaa sitoutumista tarkastelevasta hrERα-testistä on laadittava vakiokäyrä käyttämällä leimaamatonta 17β-estradiolia, jotta voidaan arvioida vaihtelua, kun testi tehdään samassa laboratoriossa myöhemmin uudestaan. Leimaamattomasta 17β-estradiolista on valmistettava kahdeksan liuosta etanoliin, ja testikuoppien pitoisuudet saavat vaihdella välillä 100 nM–10 pM (-7[logM] ja -11[logM]) niin, että niiden pitoisuudet ovat seuraavat: -7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]. Suurin pitoisuus leimaamatonta 17β-estradiolia (1 μM) toimii myös epäspesifisen sitoutumisen indikaattorina. Taulukossa 4 tämä pitoisuus on yksilöity tunnisteella "NSB", vaikka se on myös osa vakiokäyrää.

Heikosti sitoutuva aine

29. Testiin on sisällytettävä myös heikosti sitoutuva aine (noretinodreli (CAS 68-23-5) tai noretindroni (CAS 68-22-4)), jotta voidaan osoittaa jokaisen kokeen herkkyys ja arvioida vaihtelua, kun testi tehdään myöhemmin uudestaan. Heikosti sitoutuvasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta etanoliin, ja testikuoppien pitoisuudet saavat vaihdella välillä 3 nM–30 pM (-8,5[logM] ja -4,5[logM]) niin, että niiden pitoisuudet ovat seuraavat: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Sitoutumaton aine

30. Negatiivisena kontrollina (sitoutumattomana aineena) on käytettävä oktyylitrietoksisilaania (OTES, CAS 2 943-75-1). Sen avulla voidaan varmistaa, että ajetun mukaisella testillä havaitaan, kun testikemikaalit eivät sitoudu hrERα:aan. Sitoutumattomasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta etanoliin, ja testikuoppien pitoisuudet saavat vaihdella välillä 0,1nM–1 000 pM (-10[logM] ja -3[logM]) logaritmisin lisäyksin. Vaihtoehtoisena sitoutumattomana kontrolliaineena voidaan käyttää di-*n*-butyyliftalaattia (DBP:tä). Sen suurimmaksi liukoisuudeksi on osoitettu -4[logM].

hrERα:n pitoisuus

31. Testissä on käytettävä sellaista reseptoripitoisuutta, jolla 1 nM:n radioligandin spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 20±5 prosenttia (ks. lisäys 2:n 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

[3H]-17β-estradioli

32. [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuus testikuopissa on oltava 1,0 nM.

Testikemikaalit

33. Ensin on tehtävä liukoisuustesti, jossa määritetään jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja ja testiä tehtäessä käytettävä asianmukainen pitoisuusalue. Jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja on määritettävä alustavasti liuottimessa ja vahvistettava myöhemmin testiolosuhteissa. Testissä testattava lopullinen pitoisuus saa olla enintään 1 mM. Pitoisuusalueen määritystesti koostuu liuotinkontrollista ja kahdeksasta logaritmiseen asteikkoon perustuvasta sarjalaimennoksesta, jotka aloitetaan suurimmasta hyväksyttävästä pitoisuudesta (esim. 1 mM tai vähemmän liukoisuusrajan mukaan) ja todetun sameuden tai sakan määrän mukaan (ks. myös 35 kohta). Testikemikaali on testattava käyttämällä kahdeksaa logaritmisella pitoisuudella porrastettua käyrää testiä edeltäneessä pitoisuusalueen määrittämistestissä todetun mukaisesti. Toisen ja kolmannen kokeen pitoisuuksia on mukautettava tarpeen mukaan, jotta pitoisuus-vastekäyrää voidaan luonnehtia paremmin.

34. Testikemikaalin laimennokset on tehtävä asianmukaiseen liuottimeen (ks. lisäys 2:n 26 kohta). Jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene sen paremmin etanoliin kuin DMSO:hon ja jos liuottimen määrän lisääminen johtaisi siihen, että liuottimen pitoisuus lopullisessa testiputkessa olisi hyväksyttävää määrää suurempi, suurinta pitoisuutta voidaan pienentää seuraavaan pienempään pitoisuuteen. Tällöin pitoisuussarjan alapäähän voidaan lisätä ylimääräinen pitoisuus. Sarjan muita pitoisuuksia ei tule muuttaa.

35. Testikemikaaliliuoksia on tarkkailtava huolellisesti, kun niitä lisätään testikuoppiin, koska testikemikaali voi sakkautua testikuoppaan lisättäessä. Tiedot kaikista kuopista, joissa on sakkaa, on jätettävä pois käyrän sovituksesta, ja tietojen poisjättämisen syy on ilmoitettava.

36. Jos muista lähteistä on saatavilla aiempia tietoja, joissa on määritetty testikemikaalin log(IC_{50})-arvo, voi olla tarpeen porrastaa laimennokset geometrisesti (esimerkiksi noin 0,5 logaritmiyksikköä odotuksenmukaisesta log(IC_{50})-arvosta). Lopullisen tuloksen on kuvastettava pitoisuuksien riittävää jakautumista log(IC_{50})-arvon kummallakin puolella, ylin ja alin arvo mukaan luettuina, jotta sitoutumiskäyrää voidaan luonnehtia asianmukaisesti.

Testilevyn järjestäminen

37. Testiä varten on tehtävä merkityt mikrotiitterilevyt käyttämällä kuusinkertaista inkubaatiota, jossa on oltava koodit liuotinkontrollille, vertailuestrogeenin suurimmalle pitoisuudelle, joka toimii myös epäspesifisen sitoutumisen (NSB:n) indikaattorina, ja puskurikontrollille. Lisäksi on käytettävä kolminkertaista inkubaatiota, jossa on koodit jokaiselle sitoutumattoman kontrolliaineen (oktyylitrietoksilaanin) kahdeksalle pitoisuudelle, vertailuestrogeenin seitsemälle pienemmälle pitoisuudelle, heikosti sitoutuvan aineen kahdeksalle pitoisuudelle ja jokaisen testikemikaalin (TC) kahdeksalle pitoisuudelle. Esimerkki levyn järjestyksestä vertailuestrogeenin ja kontrollin täysiä pitoisuuskäyriä varten on jäljempänä olevassa taulukossa 4. Testikemikaaleille tehdään omat mikrotiitterilevynsä, ja niillä on oltava levyn kontrollit eli 1) suurin (eniten syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus sekä E2:ta että heikosti sitoutuvaa ainetta kolmena rinnakkaisnäytteenä, 2) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine, kumpikin kuutena rinnakkaisnäytteenä (taulukko 5). Esimerkki kilpailevan testin mikrotiitterilevyn järjestystä koskevasta taulukosta, jossa käytetään kolmea tuntematonta testikemikaalia, on lisäyksessä 2.3. Taulukoissa 4 ja 5 esitetyt pitoisuudet ovat testin lopullisia pitoisuuksia. E2:n suurimman pitoisuuden on oltava 1×10^{-7} M. Heikosti sitoutuvan aineen osalta on käytettävä suurinta pitoisuutta, jota siitä käytetään levyllä 1. Laboratorion on määritettävä IC_{50}-pitoisuus sen aiempiin tietoihin pohjautuvan tietokannan perusteella. Tämän arvon oletetaan olevan sama kuin validointitutkimuksissa todettu arvo (ks. taulukko 1).

Taulukko 4

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys sekä vertailuestrogeenin ja kontrollien täydet pitoisuuskäyrät (levy 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (vain liuotin)			TB (vain liuotin)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Tyhjä (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Tyhjä (radioakt. aineelle) (**)			Tyhjä (radioakt. aineelle) (**)			Puskurikontrolli			Puskurikontrolli		

Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).
(*) Oikeasti tyhjä, kuoppa ei käytössä.
(**) Tyhjä inkuboinnin aikana mutta käytetään lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden vahvistamisessa.

Taulukko 5

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys sekä testikemikaalien ja levykontrollien täydet pitoisuuskäyrät

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (vain liuotin)			TB (vain liuotin)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).

Kilpailevan sitoutumisen testin tekeminen

38. Kuten taulukossa 6 osoitetaan, kuoppiin on lisättävä 80 µl liuotinkontrollia, puskurikontrollia, vertailuestrogeenia, heikosti sitoutuvaa ainetta ja sitoutumatonta ainetta sekä testikemikaaleja, jotka on valmistettu testipuskuriin. Sen jälkeen jokaiseen kuoppaan tulee lisätä 40 µl [3H]-17β-estradioliliuosta (4 nM). Kun levyjä on sekoitettu varovasti 10–15 minuuttia 2–8 °C:ssa, kuoppiin tulee lisätä 40 µl hrERα-liuosta. Testin mikrotiitterilevyjä on inkuboitava 2–8 °C:n lämpötilassa 16–20 tuntia, ja ne on asetettava sekoittajaan inkuboinnin ajaksi.

Taulukko 6

Kilpailevan hrER-sitoutumistestin osien tilavuus, mikrotiitterilevyt

Tilavuus (µl)	Ainesosa
80	Leimaamaton 17β-estradioli, noretinodreli, OTES, testikemikaalit, liuotin tai puskuri
40	4 nM [^{3}H]-17β-estradioliliuos
40	hrERα-liuos, pitoisuus määritetyn mukaisesti
160	***Kunkin testikuopan kokonaistilavuus***

39. hrERα:aan sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin kvantifiointi, sen jälkeen kun hrERα:aan sitoutunut [^{3}H]-17β-estradioli on erotettu vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä 80 µl kylmää DCC-suspensiota jokaiseen kuoppaan, on tehtävä saturaatiositoutumistestin 20–23 kohdassa kuvatun mukaisesti.

40. Kuopat H1–6 (jotka on merkitty tyhjäksi (radioaktiivisuuden mittaamista varten) taulukossa 4) edustavat [^{3}H]-leimatun estradiolin dpm-arvoa 40 µl:ssa. 40 µl alikvoottia on lisättävä suoraan kuoppien H1–H6 tuikenesteeseen.

Hyväksymisperusteet

Saturaatiositoutumisen testi

41. Spesifisen sitoutumiskäyrän tulisi saavuttaa tasanne käytettäessä suurenevia pitoisuuksia [^{3}H]-17β-estradiolista, mikä osoittaa, että ligandi on saturoinut hrERα:n.

42. [3H]-17β-estradiolin spesifinen sitoutuminen pitoisuudella 1 nM tulee olla hyväksymisalueella, joka on 15–25 prosenttia mitatusta keskimääräisestä kokonaisradioaktiivisuudesta, joka testiajoissa lisättiin. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava ja saturaatiotesti on toistettava.

43. Tietojen on tuotettava lineaarinen Scatchardin kuvaaja.

44. Epäspesifinen sitoutuminen ei saa olla liiallista. Epäspesifisen sitoutumisen arvon on yleensä oltava <35 prosenttia kokonaissitoutumisesta. Tämä osuus voi kuitenkin satunnaisesti ylittää tämän rajan, jos testissä käytetyn radioleimatun 17β-estradiolin pienimmästä pitoisuudesta mitataan hyvin pieni dpm-arvo.

Kilpailevan sitoutumisen testi

45. Leimaamattoman 17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien tulisi syrjäyttää [^{3}H]-17β-estradioli reseptorista yhteen kohtaan kilpailevan sitoutumisen osalta johdonmukaisesti.

46. Vertailuestrogeenin (ts. 17β-estradiolin) IC_{50}-arvon on oltava likimain sama kuin [^{3}H]-17β-estradiolin molaarinen konsentraatio plus saturaatiositoutumistestissä määritetty Kd-arvo.

47. Spesifisen kokonaissitoutumisen tulisi olla johdonmukaisesti hyväksymisalueella 20 ± 5 prosenttia, kun jokaiseen kuoppaan testiajoissa lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden keskimääräinen mitattu pitoisuus on 1 nM. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava.

48. Liuotin ei saa muuttaa testin herkkyyttä tai toistettavuutta. Liuotinkontrollin (TB-kuopat) tuloksia verrataan puskurikontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään. TB- ja puskurikontrollin tulosten tulisi olla verrattavissa, jos liuotin ei ole vaikuttanut testiin.

49. Sitoutumaton aine saa syrjäyttää enintään 25 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolista hrERα:sta, kun testattu konsentraatio on 10^{-3} M (OTES) tai 10^{-4} M (DBP).

50. Vertailuestrogeenille ja kahdelle heikosti sitoutuvalle aineelle (noretinodreli ja noretindroni) on laadittu suoritusvaatimukset FW hrER -sitoutumistestin validointitutkimukseen perustuvien tietojen avulla (lähdeviitteen 2 liite N). Keskiarvolle (n) +/- keskihajonnalle on määritetty 95 prosentin luottamusvälit kaikkien niiden kontrolliajojen perusteella, jotka tehtiin validointitutkimuksiin osallistuneissa laboratorioissa. Nämä luottamusvälit laskettiin vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen käyrän sovitusparametreille (ylin ja alin arvo, Hillslope, logIC_{50}). Lisäksi laskettiin heikosti sitoutuvien aineiden $\log_{10}$RBA suhteessa vertailuestrogeeniin. Nämä tiedot ovat saatavilla positiivisten kontrollien suoritusvaatimuksina. Taulukossa 1 esitetään käyrän sovituksen parametrien odotuksenmukaiset alueet, joita voidaan käyttää suoritusvaatimuksina. Käytännössä IC_{50}-arvon alue voi vaihdella hieman reseptorivalmisteen Kd-arvon ja ligandin pitoisuuden perusteella.

51. Testikemikaalien käyrän sovitusparametreille ei ole laadittu suoritusvaatimuksia, koska mahdollisten testikemikaalien valikoima on hyvin laaja, kuten myös mahdollisten affiniteettien ja tulosten vaihtelu (täysi käyrä, osittainen käyrä, ei käyrän sovitusta). Testikemikaalin jokaisen testiajon tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita. Testikemikaalista on käytettävä riittävän monta pitoisuutta, jotta kilpailevan käyrän huippu (ts. 90–100 prosentin sitoutuminen) voidaan määrittää selvästi. Rinnakkaisnäytteiden vaihtelun on oltava kohtuullista ja tieteellisesti perusteltavissa testikemikaalin jokaisen pitoisuuden ja kolmen eriaikaisen testiajon osalta. Testikemikaalin kontrollien pitäisi täyttää jokaisessa testiajossa FW-testiä koskevat suoritusvaatimukset, ja niiden tulee olla yhdenmukaiset kunkin laboratorion aiempien kontrollitietojen kanssa.

AINEISTON ANALYSOINTI

Saturaatiositoutumisen testi

52. Sekä kokonaissitoutuminen että epäspesifinen sitoutuminen mitataan. Näistä arvoista lasketaan tasapaino-olosuhteissa [^{3}H]-17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien spesifinen sitoutuminen vähentämällä epäspesifinen sitoutuminen kokonaissitoutumisesta. Spesifistä sitoutumista vs. [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuutta kuvaavan käyrän tulisi saavuttaa tasanne suurinta spesifistä sitoutumista kuvaavan arvon kohdalla, joka kuvastaa hrERα:n saturoitumista [^{3}H]-17β-estradiolilla. Lisäksi aineiston analyysissa on dokumentoitava [^{3}H]-17β-estradiolin sitoutuminen yksittäiseen suuren affiniteetin sitoutumiskohtaan. Epäspesifinen, kokonais- ja spesifinen sitoutuminen on esitettävä saturaatiositoutumista kuvaavalla käyrällä. Näiden tietojen tarkemmassa analyysissa on käytettävä epälineaarista regressioanalyysia (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), ja lopulliset tiedot tulee esittää Scatchardin kuvaajalla.

53. Aineiston analyysissa on määritettävä Bmax- ja Kd-arvot pelkästään kokonaissitoutumista koskevista tiedoista ja olettamalla, että epäspesifinen sitoutuminen on lineaarista. Toisenlaisen menetelmän käyttäminen on perusteltava. Lisäksi parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Valittu robustin regression menetelmä on ilmoitettava. Ligandin depleetion korjausta (käyttämällä esimerkiksi Swillensin menetelmää, 1995) on käytettävä aina määritettäessä Bmax- ja Kd-arvoja saturaatiositoutumistiedoista.

Kilpailevan sitoutumisen testi

54. Kilpailevan sitoutumisen käyrä esitetään [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisenä sitoutumisena vs. kilpailijan pitoisuutena (log10-yksiköt). Testikemikaalin se pitoisuus, joka estää 50 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisestä enimmäissitoutumisesta, on IC_{50}-arvo.

55. Positiivisten kontrollien (ts. vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen) log(IC_{50})-arvojen estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin (esimerkiksi BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ylin ja alin arvo sekä kulmakerroin ja log(IC_{50}) on yleensä jätettävä rajoittamattomiksi näitä käyriä sovitettaessa. Parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Ligandin depleetion korjausta ei tule käyttää. Alustavan analyysin jälkeen jokainen sitoutumiskäyrä on tarkistettava, jotta se varmasti sopii malliin asianmukaisesti. Heikosti sitoutuvan aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) lasketaan prosenttiosuutena heikosti sitoutuvan aineen log (IC_{50}) -arvosta suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon. Positiivisten kontrollien ja sitoutumattoman kontrollin tuloksia on arvioitava käyttämällä testin suorituskyvyn mittareita, jotka on esitetty tämän lisäyksen 245–50 kohdassa.

56. Kaikkien testikemikaalien tiedot on analysoitava käyttämällä vaiheittaista lähestymistapaa, jotta varmistetaan, että tiedot analysoidaan asianmukaisesti ja että kukin kilpailevan sitoutumisen käyrä luokitellaan oikein. On suositeltavaa, että testikemikaalin jokaiselle ajolle tehdään aluksi standardoitu aineistoanalyysi, joka on identtinen vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvista aineista koostuvien kontrollien yhteydessä käytetyn analyysin kanssa (ks. 55 kohta edellä). Kun se on tehty, on tehtävä käyrän sovitusparametrien tekninen tarkastus ja tarkastettava silmämääräisesti, miten hyvin tiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään jokaisesta ajosta. Jos tämän teknisen tarkastuksen aikana tehdään havaintoja, joiden mukaan spesifisesti sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen osuus pienenee pitoisuuden mukaan, jokaisen kemikaalipitoisuuden teknisten rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu on vähäistä ja kolmen ajon sovitusparametrit ovat johdonmukaisia, ne ovat hyvä osoitus siitä, että testi ja aineistoanalyysit on tehty asianmukaisesti.

Tietojen tulkinta

57. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutuva aine, jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja jos vastekäyrän alin piste tietojen vaihteluvälin alueella on 50 prosentin alapuolella (kuva 1).

58. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutumaton aine, jos

— sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja sovitetun vastekäyrän alin piste tietojen vaihteluvälin alueella on 75 prosentin alapuolella, tai

— sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa ja alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella

59. Testikemikaalit katsotaan epäselviksi, jos kumpikaan edellä esitetyistä ehdoista ei täyty (ts. jos sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

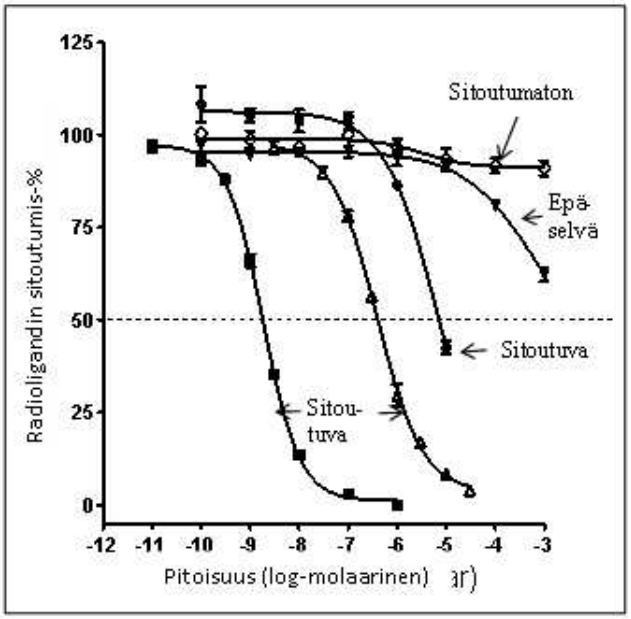
Taulukko 7

Luokitteluperusteet testikemikaalin kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella

Luokittelu	Perusteet
Sitoutuva[a]	Sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa. **Vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 50 prosentin alapuolella**.
Sitoutumaton[b]	Jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa, **sovitetun vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 75 prosentin yläpuolella**. Jos sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa, **alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella.**
Epäselvä[c]	Mikä tahansa testiaine, joka ei ole sitoutuva eikä sitoutumaton aine (esim. sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

Kuva 1

Esimerkkejä testikemikaalin luokittelusta kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella



60. Laboratoriossa testikemikaalista tehdyt useat ajot yhdistetään antamalla jokaiselle ajolle numeeriset arvot ja laskemalla ajojen keskiarvot taulukossa 8 osoitetun mukaisesti. Jokaisen laboratorion yhdistettyjen ajojen tuloksia verrataan jokaisen testikemikaalin odotuksenmukaiseen luokitukseen.

Taulukko 8

Yhdessä laboratoriossa tehtyihin useisiin ajoihin perustuva menetelmä testikemikaalin luokitteluun

Arvon antaminen jokaiselle ajolle:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	2
Epäselvä	1
Sitoutumaton	0
Luokittelu ajojen numeerisen arvon keskiarvon perusteella:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	Keskiarvo ≥ 1,5
Epäselvä	0,5 ≤ keskiarvo < 1,5
Sitoutumaton	Keskiarvo< 0,5

TESTIRAPORTTI

61. Ks. 24 kohta kappaleesta "h**rER-SITOUTUMISTESTIN OSAT**" tämän testimenetelmän osalta.

Lisäys 2.1

SANASTO

[^{3}H]E2: Tritiumilla radioleimattu 17β-estradioli

DCC: Dekstraanilla pinnoitettu hiili

E_2: Leimaamaton 17β-estradioli (inertti)

Testipuskuri: 10 mM Tris, 10 mg naudan seerumin albumiinia / ml, 2 mM DTT:tä, 10 prosenttia glyserolia, 0,2 mM leupeptiiniä, pH 7,5

hrERα: Ihmisen rekombinantti estrogeenireseptori alfa

Rinnakkaisnäyte: Yksi monesta kuopasta, joiden sisällöt ja pitoisuudet ovat samat ja jotka testataan samaan aikaan yhdessä ajossa. Tässä protokollassa jokainen testikemikaalin pitoisuus testataan kolmella rinnakkaisnäytteellä. Tämä tarkoittaa sitä, että testikemikaalin jokaisesta pitoisuudesta on kolme rinnakkaisnäytettä, jotka testataan samaan aikaan.

Testiajo: Täydellinen sarja samaan aikaan testattavia mikrotiitterilevyjen testikuoppia, joista saadaan kaikki tarvittavat tiedot, joilla voidaan luonnehtia testikemikaalin sitoutumista hrERα:aan (ts. testikuoppaan lisätty [^{3}H]-17β-estradioli kokonaisuudessaan, [^{3}H]-17β-estradiolin enimmäissitoutuminen hrERα:aan, epäspesifinen sitoutuminen ja kokonaissitoutuminen testikemikaalin eri pitoisuuksilla). Testiajossa voidaan käyttää sekä yhtä että useaa testikuoppaa (ts. rinnakkaisnäytettä) pitoisuutta kohti, mutta koska tässä protokollassa edellytetään, että rinnakkaisnäytteitä on kolme, yksi ajo koostuu kolmesta testikuopasta pitoisuutta kohti. Lisäksi tässä protokollassa edellytetään, että yhtä kemikaalia kohti tehdään kolme itsenäistä (eli eriaikaista) ajoa.

Lisäys 2.2

TYYPILLINEN [^{3}H]-17B-ESTRADIOLIN SATURAATIOTESTI KOLMELLA RINNAKKAISNÄYTEKUOPALLA

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla											
Paikka	**Rinnakkaisnäyte**	**Kuopan tyyppikoodi**	**Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)**	**Radioakt. E2:n tilavuus (µl)**	**Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)**	**Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)**	**Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)**	**Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)**	**Puskurin tilavuus (µl)**	**Reseptorin tilavuus (µl)**	**Kuoppien kokonaistilavuus**
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

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla											
Paikka	**Rinnakkaisnäyte**	**Kuopan tyyppikoodi**	**Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)**	**Radioakt. E2:n tilavuus (µl)**	**Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)**	**Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)**	**Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)**	**Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)**	**Puskurin tilavuus (µl)**	**Reseptorin tilavuus (µl)**	**Kuoppien kokonaistilavuus**
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

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla											
Paikka	**Rinnakkaisnäyte**	**Kuopan tyyppikoodi**	**Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)**	**Radioakt. E2:n tilavuus (µl)**	**Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)**	**Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)**	**Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)**	**Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)**	**Puskurin tilavuus (µl)**	**Reseptorin tilavuus (µl)**	**Kuoppien kokonaistilavuus**
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	Radio-akt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radio-akt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radio-akt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radio-akt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radio-akt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radio-akt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radio-akt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radio-akt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radio-akt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radio-akt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radio-akt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radio-akt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Radio-akt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radio-akt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radio-akt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radio-akt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla

Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppikoodi	Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)	Radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)	Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)	Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)	Puskurin tilavuus (µl)	Reseptorin tilavuus (µl)	Kuoppien kokonaistilavuus
H5	2	Radio-akt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radio-akt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radio-akt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radio-akt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radio-akt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radio-akt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radio-akt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radio-akt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Huomaa, että radioaktiiviset kuopat ovat tyhjiä inkuboinnin aikana. 40 µl lisätään vain tuikelaskentaa varten.

Lisäys 2.3

KILPAILEVAN SITOUTUMISEN TESTIKUOPPIEN JÄRJESTYS

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	A1	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	ei-r-akt. E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	ei-r-akt. E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	ei-r-akt. E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	ei-r-akt. E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	ei-r-akt. E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	ei-r-akt. E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	ei-r-akt. E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	ei-r-akt. E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	ei-r-akt. E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	B10	1	ei-r-akt. E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	ei-r-akt. E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	ei-r-akt. E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	ei-r-akt. E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	ei-r-akt. E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	ei-r-akt. E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	ei-r-akt. E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	ei-r-akt. E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	ei-r-akt. E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	ei-r-akt. E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	ei-r-akt. E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	ei-r-akt. E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tyhjä	tyhjä	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	tyhjä	tyhjä	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	tyhjä	tyhjä	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretinodreli	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretinodreli	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretinodreli	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretinodreli	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretinodreli	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretinodreli	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	D7	1	Noretinodreli	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretinodreli	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretinodreli	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretinodreli	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretinodreli	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretinodreli	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretinodreli	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretinodreli	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretinodreli	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretinodreli	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretinodreli	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	E11	2	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodreli	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

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (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	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Puskurikontrolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Puskurikontrolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Puskurikontrolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Puskurikontrolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Puskurikontrolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Puskurikontrolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Huomaa, että radioaktiiviset kuopat ovat tyhjiä inkuboinnin aikana. 40 µl lisätään vain tuikelaskentaa varten.

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	A1	1	kokonaissitoutuminen	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Testikemikaali 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Testikemikaali 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Testikemikaali 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Testikemikaali 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Testikemikaali 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Testikemikaali 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Testikemikaali 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Testikemikaali 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Testikemikaali 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Testikemikaali 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Testikemikaali 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Testikemikaali 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys												
Levy	**Paikka**	**Rinnakkaisnäyte**	**Kuopan tyyppi**	**Kuopan koodi**	**Pitoisuuskoodi**	**Kilpailijan alkupitoisuus (M)**	**hrER-varasto (µl)**	**Puskurin tilavuus (µl)**	**Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)**	**Tilavuus laimennoslevyltä (µl)**	**Lopputilavuus (µl)**	**Kilpailijan loppupitoisuus (M)**
P1	C1	1	Testikemikaali 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Testikemikaali 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Testikemikaali 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Testikemikaali 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Testikemikaali 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Testikemikaali 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Testikemikaali 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Testikemikaali 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Testikemikaali 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Testikemikaali 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Testikemikaali 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Testikemikaali 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Testikemikaali 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Testikemikaali 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Testikemikaali 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Testikemikaali 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Testikemikaali 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Testikemikaali 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Testikemikaali 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Testikemikaali 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Testikemikaali 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Testikemikaali 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Testikemikaali 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Testikemikaali 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys												
Levy	**Paikka**	**Rinnakkaisnäyte**	**Kuopan tyyppi**	**Kuopan koodi**	**Pitoisuuskoodi**	**Kilpailijan alkupitoisuus (M)**	**hrER-varasto (µl)**	**Puskurin tilavuus (µl)**	**Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)**	**Tilavuus laimennoslevyltä (µl)**	**Lopputilavuus (µl)**	**Kilpailijan loppupitoisuus (M)**
P1	E1	1	Testikemikaali 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Testikemikaali 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Testikemikaali 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Testikemikaali 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Testikemikaali 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Testikemikaali 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Testikemikaali 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Testikemikaali 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Testikemikaali 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Testikemikaali 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Testikemikaali 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Testikemikaali 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Testikemikaali 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Testikemikaali 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Testikemikaali 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Testikemikaali 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Testikemikaali 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Testikemikaali 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Testikemikaali 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Testikemikaali 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Testikemikaali 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Testikemikaali 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Testikemikaali 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Testikemikaali 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	G1	1	Testikemikaali 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Testikemikaali 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Testikemikaali 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Testikemikaali 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Testikemikaali 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Testikemikaali 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Testikemikaali 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Testikemikaali 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Testikemikaali 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Testikemikaali 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Testikemikaali 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Testikemikaali 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretinodreli	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretinodreli	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretinodreli	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretinodreli	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretinodreli	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretinodreli	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	ei-r-akt. E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	ei-r-akt. E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	ei-r-akt. E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	ei-r-akt. E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	ei-r-akt. E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	ei-r-akt. E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Lisäys 3

ESTROGEENIRESEPTORIIN SITOUTUMISTA KÄSITTELEVÄ CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTEN (CERI) *IN VITRO* -TESTI, JOSSA KÄYTETÄÄN IHMISEN REKOMBINANTIN ESTROGEENIRESEPTORI ALFAN LIGANDIA SITOVAA PROTEIININ DOMEENIA

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä estrogeenireseptorin (ERα) saturaatiota ja kilpailevaa sitoutumista käsittelevässä testissä käytetään ihmisen ERα:n (hrERα) ligandia sitovaa domeenia (LBD). Tämän proteiinimallin tuottaja on japanilainen Chemicals Evaluation Research Institute (CERI). Se on saatavana glutationi-S-transferaasi (GST) -fuusioproteiinina, ja se ilmentyy *E. coli* -bakteerissa. CERIn kehittämälle tutkimusprotokollalle tehtiin kansainvälinen monen laboratorion suorittama validointitutkimus (2), joka osoitti, että se on merkityksellinen ja luotettava testin käyttötarkoituksen kannalta.

2. Tämä testi on sellaisten aineiden tunnistamiseen tarkoitettu seulontamenettely, jotka voivat sitoutua hrERα:aan. Sillä määritetään testikemikaalin kyky kilpailla 17β-estradiolin kanssa hrERα-LBD:hen sitoutumisesta. Kvantitatiivisia testituloksia voivat olla esimerkiksi IC_{50} (testikemikaalin se pitoisuus, joka tarvitaan siihen, että puolet [^{3}H]-17β-estradiolista syrjäytetään hrERα:sta) ja testikemikaalin suhteelliset sitoutumisaffiniteetit hrERα:aan 17β-estradioliin verrattuna. Kemikaalien seulonnassa hyväksyttäviä laadullisia tuloksia voivat olla testikemikaalien luokittelut joko hrERα:aan sitoutuviksi tai sitoutumattomiksi aineiksi tai epäselviksi sitoutumiskäyriä koskevien kriteerien perusteella.

3. Testissä käytetään radioaktiivista ligandia, mikä edellyttää laboratoriolta radioaktiivisten materiaalien käyttölupaa. Kaikissa menettelyissä, joissa käytetään radioisotooppeja ja vaarallisia kemikaaleja, on noudatettava kansallisen lainsäädännön määräyksiä ja menettelyjä.

4. Kohdat "**YLEISJOHDANTO**" ja "**IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN SITOUTUMISTA TARKASTELEVAN TESTIN OSAT**" on luettava ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testiohjeessa käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATTEET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptori alfaan (hrERα) sitoutumista tarkastelevassa testissä mitataan radioleimatun ligandin ([^{3}H]17β-estradioli) kykyä sitoutua estrogeenireseptoriin testikemikaalin (eli kilpailijan) suurenevien pitoisuuksien yhteydessä. Testikemikaalit, joilla on voimakas affiniteetti estrogeenireseptoriin, kilpailevat radioleimatun ligandin kanssa pienemmällä pitoisuudella kuin ne kemikaalit, joiden affiniteetti reseptoriin on heikompi.

6. Tässä testissä on kaksi keskeistä osaa: saturaatiositoutumiskoe, jolla luonnehditaan reseptorin ja ligandin yhteisvaikutuksen parametreja, ja kilpaileva sitoutumiskoe, jolla luonnehditaan testikemikaalin ja radioleimatun ligandin kilpailua estrogeenireseptoriin sitoutumisessa.

7. Saturaatiositoutumiskokeen tarkoituksena on luonnehtia tietyn reseptorien erän sitoutumisaffiniteettia ja määrää kilpailevaa sitoutumista tarkastelevan kokeen valmistelussa. Saturaatiositoutumiskokeessa mitataan tasapaino-olosuhteissa kiinteän estrogeenireseptoripitoisuuden affiniteettia sen luonnolliseen ligandiin nähden (esitettynä dissosiaatiovakiolla, Kd) ja aktiivisten reseptorikohtien tiheyttä (Bmax).

8. Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan aineen affiniteettia kilpailla [^{3}H]17β-estradiolin kanssa estrogeenireseptoriin sitoutumisessa. Affiniteetti kvantifioidaan sellaisella testikemikaalin pitoisuudella, joka tasapaino-olosuhteissa estää 50 prosenttia [^{3}H]17β-estradiolin spesifisestä sitoutumisesta ("50 prosenttia estävä pitoisuus" tai IC_{50}). Tätä voidaan arvioida käyttämällä myös suhteellista sitoutumisaffiniteettia (RBA, suhteessa estradiolin IC_{50}-arvoon, joka on mitattu erikseen samassa ajossa). Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan [^{3}H]17β-estradiolin sitoutumista kiinteänä pitoisuutena samalla, kun läsnä on laaja kirjo (kahdeksan suuruusluokkaa) testikemikaalipitoisuuksia. Sen jälkeen tiedot sovitetaan, mikäli mahdollista, siten, että voidaan muodostaa Hillin yhtälö (Hill, 1910), jolla kuvataan sitä, miten yhdessä paikassa oleva kilpaileva sitoutuva aine syrjäyttää radioligandin. Sitä, missä määrin radioleimattu estradioli syrjäytetään, käytetään testikemikaalin luonnehtimisessa sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi tai epäselvän vasteen tuottavaksi.

MENETTELY

hrERα-proteiinin hyväksyttävän suorituskyvyn osoittaminen

9. Ennen kuin saturaatiositoutumistestiä ja kilpailevan sitoutumisen testiä aletaan käyttää rutiininomaisesti, on osoitettava, että jokainen uusi hrERα-erä toimii asianmukaisesti siinä laboratoriossa, jossa sitä käytetään. Suorituskyky osoitetaan kaksivaiheisella menettelyllä. Nämä vaiheet ovat seuraavat:
   — Tehdään [3H]-17β-estradiolin sitoutumistesti, jolla osoitetaan hrERα-spesifisyys ja saturaatio. Näiden tietojen epälineaarisella regressioanalyysilla (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja sen jälkeen tehtävällä Scatchardin kuvaajalla osoitetaan [3H]-17β-estradiolin sitoutumisaffiniteetti hrERα:aan (Kd) ja reseptorien määrä (Bmax) tietyssä hrERα-erässä.
   — Tehdään kilpailevaa sitoutumista tarkasteleva testi käyttämällä kontrolliaineita (vertailuestrogeeni (17β-estradioli), heikosti sitoutuva aine (esimerkiksi noretinodreli tai noretindroni) ja sitoutumatonta ainetta (oktyylitrietoksisilaani, OTES). Jokaisen laboratorion on luotava aiemmista tiedoista koostuva tietokanta, jolla dokumentoidaan IC50-arvojen ja muiden oleellisten arvojen yhdenmukaisuus vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen osalta eri kokeissa ja eri hrERα-erissä. Lisäksi kontrolliaineiden kilpailevan sitoutumisen käyrien parametrien on oltava 95 prosentin luottamusvälin rajoissa (ks. taulukko 1). Nämä raja-arvot on laadittu tämän testin validointitutkimukseen osallistuneista laboratorioista saatujen tietojen perusteella (2).

Taulukko 1

Vertailuestrogeenille ja heikosti sitoutuvalle aineelle kehitetyt suorituskykyvaatimukset (CERI hrER -sitoutumistesti)

Aine	Parametri	Keskiarvo [a]	Keskihajonta (n)	95 %:n luottamusvälit [b]	
				Alaraja	Yläraja
17β-estradioli	Ylin	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Alin	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	HillSlope	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretinodreli	Ylin	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Alin	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindroni [c]	Ylin	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Alapuoli	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillslope	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Keskiarvo (n) ± keskihajonta (SD) (otoskoko n) laskettiin käyttämällä käyrän sovituksen estimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin neljässä laboratoriossa validointitutkimuksen aikana (ks. lähdeviitteen 2 liite N).

[b] 95 prosentin luottamusvälit on tarkoitettu ohjeeksi hyväksymisperusteiden soveltamiseen.

[c] Noretindronin testaus oli valinnaista validointitutkimuksen alatehtävä 4:ssä (ks. lähdeviite 2, alatehtävä 4). Keskiarvo ± SD (n) laskettiin siis käyttämällä käyrän sovituksen estimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin kahdessa laboratoriossa.
IC_{50}-arvon vaihteluväliin vaikuttaa kussakin laboratoriossa käytetyn reseptorivalmisteen Kd ja radioleimatun ligandin pitoisuus. IC_{50}-arvon vaihteluvälin asianmukainen mukautus testin tekemisessä käytettyjen olosuhteiden perusteella on hyväksyttävää.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

10. Ks. 17 ja 18 kohta ja taulukko 2 kappaleesta "**hrER-SITOUTUMISTESTIN OSAT**" tämän testimenetelmän osalta. Kummassakin testissä (saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen testissä) pitää olla kolme itsenäistä testiajoa (ts. tuoreilla reseptori-, kemikaali- ja reagenssilaimennoksilla), jotka tehdään eri päivinä, ja jokaisessa testiajossa on oltava kolme rinnakkaisnäytettä.

Reseptorin (hrERα) pitoisuuden määrittäminen

11. Aktiivisen reseptorin pitoisuus vaihtelee jonkin verran erän ja säilytysolosuhteiden mukaan. Tämän vuoksi toimittajalta saadun aktiivisen reseptorin pitoisuus on määritettävä. Näin varmistetaan, että aktiivisen reseptorin pitoisuus on testiajossa asianmukainen.

12. Kilpailevaa sitoutumista vastaavissa olosuhteissa (ts. 0,5 nM [^{3}H]-estradiolia) reseptorista on inkuboitava 0,1, 0,2, 0,4 ja 0,6 nM:n nimellispitoisuudet ilman (kokonaissitoutuminen) 1 µM:n pitoisuutta leimaamatonta estradiolia ja sen kanssa (epäspesifi sitoutuminen). Spesifinen sitoutuminen, joka lasketaan kokonais- ja epäspesifin sitoutumisen erotuksena, esitetään suhteessa reseptorin nimellispitoisuuteen. Reseptorin pitoisuus, josta saatavat spesifiset sitoutumisarvot ovat 40 prosenttia lisätystä radioleimatusta aineesta, suhteutetaan vastaavaan reseptorin pitoisuuteen, joka on se reseptorin pitoisuus, jota pitää käyttää saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen kokeissa. Tämän ehdon täyttää usein lopullinen hrER:n pitoisuus 0,2 nM.

13. Jos 40 prosentin ehtoa ei voida täyttää toistuvasti, koejärjestely on tarkistettava mahdollisten virheiden varalta. Jos 40 prosentin ehtoa ei voida täyttää, se voi olla merkki siitä, että rekombinanttierässä on hyvin vähän aktiivista reseptoria. Tällöin on syytä harkita toisen reseptorierän käyttämistä.

Saturaatiotesti

14. Tässä testissä on arvioitava kahdeksan suurenevaa pitoisuutta [^{3}H]17β-estradiolista kolmena rinnakkaisnäytteenä seuraavan kolmen ehdon mukaisesti (ks. taulukko 2):

a. Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja estrogeenireseptorin kanssa. Tässä määritetään kokonaissitoutuminen määrittämällä radioaktiivisuus niissä kuopissa, joissa on vain [^{3}H]17β-estradiolia.

b. Leimattuun 17β-estradioliin nähden 2000 kertaa suuremman leimaamattoman 17β-estradiolipitoisuuden ja estrogeenireseptorin kanssa. Tämän ehdon tarkoituksena on saturoida aktiiviset sitoutumiskohdat leimaamattomalla 17β-estradiolilla ja määrittää epäspesifinen sitoutuminen mittaamalla kuoppien radioaktiivisuus. Mahdollisen jäljellä olevan radioaktiivisen estradiolin, joka voi sitoutua reseptoriin, katsotaan sitoutuvan epäspesifiseen kohtaan, koska ei-radioaktiivista estradiolia pitäisi olla niin suuri pitoisuus, että se sitoutuu kaikkiin saatavilla oleviin spesifisiin kohtiin reseptorissa.

c. Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja ilman estrogeenireseptoria (kokonaisradioaktiivisuuden määrittäminen).

[^{3}H]-17β-estradiolia, leimaamatonta 17β-estradiolia ja hrERα:aa sisältävien liuosten valmistaminen

15. [^{3}H]-17β-estradiolista on valmistettava 40 nM:n liuos 1 µM:n varastoliuoksesta [^{3}H]-17β-estradiolia DMSO:ssa lisäämällä DMSO:ta (200 nM:n valmistamiseksi) ja testipuskuria huoneenlämpötilassa (40 nM:n valmistamiseksi). Tätä 40 nM:n liuosta käyttämällä valmistetaan [^{3}H]-17β-estradiolista laimennokset, joiden pitoisuus vaihtelee välillä 0,313 nM ja 40 nM, testipuskurilla huoneenlämpötilassa (taulukon 2 rivin 12 mukaisesti). Lopulliset testipitoisuudet (0,0313–4,0 nM) saadaan lisäämällä 10 µl näistä liuoksista 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn asianmukaisiin kuoppiin (ks. taulukot 2 ja 3). Testipuskurin valmistaminen, [^{3}H]-17β-estradiolia sisältävän alkuperäisen varastoliuoksen spesifisen aktiivisuuden laskeminen sekä laimennosten valmistaminen ja pitoisuuksien määrittäminen on selostettu CERI-testin protokollassa (2).

16. Leimaamatonta 17β-estradiolia sisältävien liuosten laimennokset on valmistettava 1 nM:n 17β-estradiolivarastoliuoksesta lisäämällä testipuskuria siten, että saadaan kahdeksan suurenevaa pitoisuutta välillä 0,625 µM ja 80 µM. Lopulliset testipitoisuudet (0,0625–8 nM) saadaan lisäämällä 10 µl näistä liuoksista 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn niihin kuoppiin, jotka on tarkoitettu epäspesifisen sitoutumisen mittaamiseen (ks. taulukot 2 ja 3). Leimaamattomien 17β-estradiolilaimennosten valmistaminen on selostettu perusteellisesti CERI-testin protokollassa (2).

17. Testissä on käytettävä sellaista reseptoripitoisuutta, jolla spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 40±10 prosenttia (ks. 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava jääkylmästä testipuskurista juuri ennen käyttöä eli vasta sen jälkeen, kun kaikki kokonaissitoutumista, epäspesifiä sitoutumista ja pelkästään radioaktiivista ligandia sisältävät kuopat on täytetty.

18. 96-kuoppaiset mikrotiitterilevyt valmistellaan taulukossa 2 kuvatun mukaisesti kolmella rinnakkaisnäytteellä yhtä [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuutta kohti. Taulukossa 3 esitetään, miten [^{3}H]-17β-estradiolin, leimaamattoman 17β-estradiolin, puskurin ja reseptorin määrä määritetään.

Taulukko 2

Mikrotiitterilevyn järjestys saturaatiositoutumistestissä

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	TB:n mittaukseen			NSB:n mittaukseen			Pelkän radioakt. ligandin määritykseen				Leimaamattomat E2-laimennokset levyn sarakkeissa 4–6	[3H]E2-laimennokset levyn sarakkeissa 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E_2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: kokonaissitoutuminen,
NSB: epäspesifinen sitoutuminen
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradioli
E2: leimaamaton 17β-estradioli
(*) Tässä ilmoitetut pitoisuudet ovat jokaisen kuopan loppupitoisuuksia
(**) Leimaamattoman E2:n ja [^{3}H]E2:n laimennokset voidaan valmistaa eri levyllä.

Taulukko 3

Saturaatiomikrotiitterilevyn reagenssitilavuudet

Rivinumero		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Valmisteluvaiheet		TB-kuopat			NSB-kuopat			Pelkkä radioakt. ligandi		
Yllä olevien reaktiokuoppien osien tilavuus ja lisäysjärjestys	Puskuri	60 µl			50 µl			90 µl		
	leimaamaton E2 taulukon 2 riviltä 11	–			10 µl			–		
	[3H]E2 taulukon 2 riviltä 12	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Kokonaisreaktiotilavuus		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubointi		**KAHDEN TUNNIN INKUBAATIOREAKTION JÄLKEEN**						Radioaktiivisuuden kvantifiointi heti valmistuksen jälkeen. Ei inkubointia		
Käsittely 0,4-prosenttisella DCC:llä		Kyllä			Kyllä			**Ei**		
0,4-pros. DCC:n tilavuus		100 µl			100 µl			-		
Suodatus		Kyllä			Kyllä			Ei		
DPM-ARVOJEN MITTAUS										
Tuikeliuokseen lisätty tilavuus kvantifiointia varten		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jos dpm-arvojen mittauksessa käytetään mikrolevyjen nestetuikelaskuria, pelkkää radioaktiivista ligandia ei tule lisätä samalle levylle TB- ja NSB-kuoppien kanssa. Pelkkä radioaktiivinen ligandi on laitettava eri levylle.

(**) Jos DCC:n erottamiseen käytetään sentrifugia, 50 µl supernatanttia on mitattava nestetuikelaskurilla, jotta vältetään DCC:n kontaminoituminen.

19. Kokonaissitoutumisen ja epäspesifisen sitoutumisen määrittämiseen tarkoitettuja testin mikrotiitterilevyjä on inkuboitava kaksi tuntia huoneenlämpötilassa (22–28 °C).

hrERα:aan sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin mittaaminen

20. Kahden tunnin inkuboinnin jälkeen hrERα:aan sitoutunut [^{3}H]-17β-estradioli on erotettava vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä kuoppiin 100 µl jääkylmää 0,4-prosenttista DCC-suspensiota. Sen jälkeen levyt on asetettava jään päälle 10 minuutiksi, ja reaktioseos ja DCC-suspensio on suodatettava mikrotiitterilevyn suodattimella DCC:n poistamiseksi. Sen jälkeen nestetuikelaskentaputkissa olevaan tuikenesteeseen on lisättävä 100 µl filtraattia ja on määritettävä nestetuikelaskennalla, montako hajoamista minuutissa (dpm-arvot) kussakin putkessa tapahtuu.

21. Jos mikrolevyn suodatinta ei ole saatavilla, DCC voidaan poistaa myös sentrifugoimalla. Kuopista on otettava 50 µl supernatanttia, joka sisältää hrERα:aan sitoutunutta [^{3}H]-17β-estradiolia, erittäin varovasti, jotta kuopat eivät kontaminoidu joutumalla kosketuksiin DCC:n kanssa, ja tämä määrä on käytettävä tuikelaskennassa.

22. Pelkkä radioaktiivinen ligandi -ehtoa käytetään määrittämään, montako hajoamista minuutissa (dpm-arvo) testikuoppiin lisätyssä [^{3}H]-17β-estradiolissa on. Radioaktiivisuus on määritettävä heti valmistamisen jälkeen. Näitä kuoppia ei tule inkuboida eikä käsitellä DCC-suspensiolla, vaan niiden sisältö on siirrettävä suoraan tuikenesteeseen. Näillä mittauksilla osoitetaan, paljonko [^{3}H]-17β-estradiolia dpm:issä lisättiin kaikkiin kokonaissitoutumista ja epäspesifiä sitoutumista mittaaviin kuoppiin.

Kilpailevan sitoutumisen testi

23. Kilpailevan sitoutumisen testissä mitataan yhden [^{3}H]-17β-estradiolipitoisuuden sitoutumista samaan aikaan suurenevien testikemikaalipitoisuuksien kanssa. Jokaisesta pitoisuudesta on oltava kolme rinnakkaisnäytettä yhdessä testiajossa. Lisäksi on tehtävä kolme eriaikaista testiajoa jokaisesta testikemikaalista. Testi on tehtävä yhdellä tai useammalla 96-kuoppaisella mikrotiitterilevyllä.

Kontrollit

24. Testiä tehtäessä jokaiseen kokeeseen tulee sisältyä samanaikainen liuotinkontrolli ja muut kontrollit (ts. vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine). Vertailuestrogeenin ja kontrollien (ts. heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) täydellisiä pitoisuuskäyriä on käytettävä yhdellä levyllä jokaisessa testiajossa. Kaikilla muilla levyillä on oltava i) suuri (suurin syrjäyttävä eli arviolta radioleimatun ligandin kokonaan syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus E2:sta ja heikosti sitoutuvasta aineesta kolmena rinnakkaisnäytteenä, ii) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine kolmena rinnakkaisnäytteenä. Testipuskurin, [^{3}H]-17β-estradioli-, hrERα- ja testikemikaaliliuosten valmistamismenettelyt on selostettu perusteellisesti CERI-testin protokollassa (2).

Liuotinkontrolli:

25. Liuotinkontrolli osoittaa, ettei liuotin vaikuta testijärjestelmään. Sillä mitataan myös kokonaissitoutumista. Suositeltu liuotin on DMSO. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää etanolia, jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene DMSO:hon. DMSO:n pitoisuuden lopullisissa testikuopissa tulee olla 2,05 %, ja sitä voidaan suurentaa 2,5 prosenttiin, jos testikemikaali liukenee huonosti. Yli 2,5 prosentin DMSO-pitoisuuksia ei tule käyttää, koska suuremmat liuotinpitoisuudet voivat häiritä testiä. Jos testikemikaali ei liukene DMSO:hon mutta liukenee etanoliin, sitä voidaan käyttää enintään 2 prosentin pitoisuutena ilman, että se häiritsee testiä.

Puskurikontrolli:

26. Puskurikontrolli ei saa sisältää liuotinta eikä testikemikaalia mutta kaikkia muita testin aineita. Puskurikontrollin tuloksia verrataan liuotinkontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään.

Voimakkaasti sitoutuva aine (vertailuestrogeeni)

27. 17β-estradioli (CAS 50-28-2) on endogeeninen ligandi, ja se sitoutuu suurella affiniteetilla estrogeenireseptorin alatyyppi alfaan. Jokaisesta kilpailevaa sitoutumista tarkastelevasta hrERα-testistä on laadittava vakiokäyrä käyttämällä leimaamatonta 17β-estradiolia, jotta voidaan arvioida vaihtelua, kun testi tehdään samassa laboratoriossa myöhemmin uudestaan. Leimaamattomasta 17β-estradiolista on valmistettava kahdeksan liuosta DMSO:ssa ja testipuskurissa, ja vakiokäyrää varten käytettävät testikuoppien loppupitoisuudet on porrastettava näin: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Suurin pitoisuus leimaamatonta 17β-estradiolia (1 μM) on tarkoitettu myös epäspesifisen sitoutumisen indikaattoriksi. Taulukossa 4 tämä pitoisuus on yksilöity tunnisteella ”NSB”, vaikka se on myös osa vakiokäyrää.

Heikosti sitoutuva aine

28. Testiin on sisällytettävä myös heikosti sitoutuva aine (noretinodreli (CAS 68-23-5) tai vaihtoehtoisesti noretindroni (CAS 68-22-4)), jotta voidaan osoittaa jokaisen kokeen herkkyys ja arvioida vaihtelua, kun testi tehdään myöhemmin uudestaan. Heikosti sitoutuvasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta DMSO:ssa ja testipuskurissa, ja testikuoppien loppupitoisuudet on porrastettava näin: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} ja 10^{-9} M.

Sitoutumaton aine

29. Negatiivisena kontrollina (sitoutumattomana aineena) on käytettävä oktyylitrietoksisilaania (OTES, CAS 2943-75-1). Sen avulla voidaan varmistaa, että ajetulla testillä havaitaan ne testikemikaalit, jotka eivät sitoudu hrERα:aan. Heikosti sitoutuvasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta DMSO:ssa ja testipuskurissa, ja testikuoppien loppupitoisuudet on porrastettava näin: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Vaihtoehtoisena sitoutumattomana aineena voidaan käyttää di-n-butyyliftalaattia (DBP, CAS 84-72-2), mutta sitä saa testata vain 10^{-4}M:n pitoisuuteen saakka. DBP:n suurimman liukoisuuden testissä on osoitettu olevan 10^{-4}M.

hrERα:n pitoisuus

30. Testissä on käytettävä sellaista määrää reseptoria, jolla spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 40±10 prosenttia (ks. lisäys 3:n 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava laimentamalla funktionaalinen hrERα jääkylmäksi testipuskuriksi juuri ennen käyttöä.

[^{3}H]17β-estradioli

31. [^{3}H]-17β-estradiolin loppupitoisuuden testikuopissa on oltava 0,5 nM.

Testikemikaalit

32. Ensin on tehtävä liukoisuustesti, jossa määritetään jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja ja testiä tehtäessä käytettävä asianmukainen pitoisuusalue. Jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja on määritettävä alustavasti liuottimessa ja vahvistettava myöhemmin testiolosuhteissa. Testissä testattava loppupitoisuus saa olla enintään 1 mM. Pitoisuusalueen määritystesti koostuu liuotinkontrollista ja kahdeksasta logaritmiseen asteikkoon perustuvasta sarjalaimennoksesta, jotka aloitetaan suurimmasta hyväksyttävästä pitoisuudesta (esim. 1 mM tai vähemmän liukoisuusrajan mukaan) ja todetun sameuden tai sakan määrän mukaan (ks. lisäys 3:n 35 kohta). Kun testauksessa käytettävä pitoisuusalue on määritetty, testikemikaali on testattava käyttämällä kahdeksaa logaritmista pitoisuutta, jotka on porrastettu asianmukaisesti edeltäneessä pitoisuusalueen määritystestissä määritetyn mukaisesti. Toisen ja kolmannen kokeen pitoisuuksia on mukautettava tarpeen mukaan, jotta pitoisuus-vastekäyrää voidaan luonnehtia paremmin tarvittaessa.

33. Testikemikaalin laimennokset on tehtävä asianmukaiseen liuottimeen (ks. lisäys 3:n 25 kohta). Jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene DMSO:hon tai etanoliin ja jos liuottimen määrän lisääminen johtaisi siihen, että liuottimen pitoisuus lopullisessa testiputkessa olisi hyväksyttävää määrää suurempi, suurinta pitoisuutta voidaan pienentää seuraavaan pienempään pitoisuuteen. Tällöin pitoisuussarjan alapäähän voidaan lisätä ylimääräinen pitoisuus. Sarjan muita pitoisuuksia ei tule muuttaa.

34. Testikemikaaliliuoksia on tarkkailtava huolellisesti, kun niitä lisätään testikuoppiin, koska testikemikaali voi sakkautua testikuoppaan lisättäessä. Tiedot kaikista kuopista, joissa on sakkaa, on jätettävä pois käyrän sovituksesta, ja tietojen poisjättämisen syy on ilmoitettava.

35. Jos muista lähteistä on saatavilla aiempia tietoja, joissa on määritetty testikemikaalin log(IC_{50}-arvo, voi olla tarpeen porrastaa laimennokset geometrisesti lähemmäs odotuksenmukaista log(IC_{50})-arvoa (ts. 0,5 logaritmiyksikköä). Lopullisten tulosten on kuvastettava pitoisuuksien riittävää jakautumista log(IC_{50})-arvon kummallekin puolelle, ylin ja alin arvo mukaan luettuina, jotta sitoutumiskäyrää voidaan luonnehtia asianmukaisesti.

Testilevyn järjestäminen

36. Testiä varten on tehtävä merkityt mikrotiitterilevyt käyttämällä kuusinkertaista inkubaatiota liuotinkontrollille, vertailuestrogeenin (E2) suurimmalle pitoisuudelle, joka toimii myös epäspesifisen sitoutumisen (NSB:n) indikaattorina, puskurikontrollille, ja kolminkertaistaa inkubaatiot sitoutumattoman kontrolliaineen (oktyylitrietoksilaanin) kahdeksalle pitoisuudelle, vertailuestrogeenin (E2) seitsemälle pienemmälle pitoisuudelle, heikosti sitoutuvan aineen (noretinodrelin tai noretindronin) kahdeksalle pitoisuudelle ja jokaisen testikemikaalin kahdeksalle pitoisuudelle. Esimerkki levyn järjestyksestä vertailuestrogeenin ja kontrollin täysiä pitoisuuskäyriä varten on jäljempänä olevassa taulukossa 4. Testikemikaaleille tehdään omat mikrotiitterilevynsä, ja niillä on oltava levyn kontrollit (ts. i) suurin (eniten syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus sekä E2:ta että heikosti sitoutuvaa ainetta kolmena rinnakkaisnäytteenä, ii) liuotinkontrolli (kokonaissitoutuminen) ja epäspesifi sitoutuva aine, kumpikin kuutena rinnakkaisnäytteenä (taulukko 5). Esimerkki kilpailevan testin mikrotiitterilevyn järjestystä koskevasta taulukosta, jossa käytetään kolmea tuntematonta kemikaalia, on lisäyksessä 3.3. Taulukossa sekä taulukoissa 4 ja 5 ilmoitetut pitoisuudet tarkoittavat jokaisessa testikuopassa käytettyjä loppupitoisuuksia. E2:n suurimman pitoisuuden on oltava 1×10^{-7} M. Heikosti sitoutuvan aineen osalta on käytettävä suurinta pitoisuutta, jota siitä käytetään levyllä 1. Laboratorion on määritettävä IC_{50}-pitoisuus sen aiempiin tietoihin pohjautuvan tietokannan perusteella. Tämän arvon oletetaan olevan sama kuin validointitutkimuksissa todettu arvo (ks. taulukko 1).

Taulukko 4

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys [1] [2], sekä vertailuestrogeenin ja kontrollien täydet pitoisuuskäyrät (levy 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Puskurikontrolli ja positiivinen kontrolli (E2)			Heikosti positiivinen (noretinodreli)			Negatiivinen kontrolli (OTES)			TB ja NSB		
A	Tyhjä (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (liuotinkontrolli) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Puskurikontrolli		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Tyhjä (radioakt. aineelle) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

[1] Otos jokaisessa kokeessa käytettävälle vakiomikrotiitterilevylle.
[2] Huomaa, että tämä mikrotiitterilevy on tehty käyttämällä laimennoslevyllä tehtyjä laimennoksia, jotka on kuvattu edellisissä kohdissa käsitellyissä vaatimuksissa.
Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).
(*) Oikeasti tyhjä, kuoppa ei käytössä.
(**) Tyhjä inkuboinnin aikana mutta käytetään lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden vahvistamisessa.

Taulukko 5

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys sekä lisälevyt testikemikaaleille (TC) ja levykontrolleille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testikemikaali 1 (TC-1)			Testikemikaali 2 (TC-2)			Testikemikaali 3 (TC-3)			Kontrollit		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4.5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (liuotinkontrolli)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).

Kilpailevan sitoutumisen testin tekeminen

37. Lukuun ottamatta kokonaissitoutumista mittaavia ja tyhjiä (radioaktiivista ainetta varten tarkoitettuja) kuoppia (ks. taulukko 6) jokaiseen kuoppaan on laitettava 50 µl testipuskuria ja sekoitettava 10 µl:aan liuotinkontrollia, vertailuestrogeenia (E2), heikosti sitoutuvaa ainetta, sitoutumatonta ainetta ja testikemikaaleja sekä 10 µl:aan [3H]-17β-estradioliliuosta (5 nM). Sen jälkeen jokaiselle levylle lisätään 30 µl jääkylmää reseptoriliuosta ja sekoitetaan varovasti. hrERα-liuoksen tulee olla viimeinen lisättävä reagenssi. Testin mikrotiitterilevyjä tulee inkuboida huoneenlämpötilassa (22–28 °C) kahden tunnin ajan.

Taulukko 6

Kilpailevan hrER-sitoutumistestin osien tilavuus, mikrotiitterilevyt

Valmisteluvaiheet		Muut kuin TB-kuopat	TB-kuopat	Tyhjä (radioakt. aineelle)
Yllä olevien reaktiokuoppien osien tilavuus ja lisäysjärjestys	Huoneenlämpöinen testipuskuri	50 µl	60 µl	90 µl
	Leimaamaton E2, heikosti sitoutuva aine, sitoutumaton aine, liuotin ja testikemikaalit (*)	10 µl	-	-
	[3H]-17β-estradioli, joka tuottaa loppupitoisuudeksi 0,5 nM (ts. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα-pitoisuus määritetyn mukaisesti (ks. 12 ja 13 kohta)	30 µl	30 µl	-
Kunkin testikuopan kokonaistilavuus		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Asianmukaisesti valmistettu, jotta saadaan hyväksyttävän liuotinpitoisuuden mukainen loppupitoisuus.

38. hrERα:n sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin kvantifiointi, sen jälkeen kun hrERα:aan sitoutunut [^{3}H]-17β-estradioli on erotettu vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä 100 µl jääkylmää DCC-suspensiota jokaiseen kuoppaan, on tehtävä lisäyksen 3 saturaatiositoutumistestiä koskevissa 21–23 kohdissa kuvatun mukaisesti.

39. Kuopat G10–12 ja H10–12 (jotka on merkitty tyhjäksi (radioaktiivisuuden mittaamista varten) taulukossa 4) edustavat [^{3}H]-leimatun estradiolin dpm-arvoa 10 µl:ssa. 10 µl alikvoottia on lisättävä suoraan tuikenesteeseen.

Hyväksymisperusteet

Saturaatiositoutumisen testi

40. Spesifisen sitoutumiskäyrän tulisi saavuttaa tasanne käytettäessä suurenevia pitoisuuksia [^{3}H]-17β-estradiolista, mikä osoittaa, että ligandi on saturoinut hrERα:n.

41. [3 H]-17β-estradiolin spesifinen sitoutuminen pitoisuudella 0,5 nM tulee olla hyväksymisalueella, joka on 30–50 prosenttia mitatusta keskimääräisestä kokonaisradioaktiivisuudesta, joka testiajoissa lisättiin. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava ja saturaatiotesti on toistettava.

42. Tietojen on tuotettava lineaarinen Scatchardin kuvaaja.

43. Epäspesifinen sitoutuminen ei saa olla liiallista. Epäspesifisen sitoutumisen arvon on yleensä oltava <35 prosenttia kokonaissitoutumisesta. Tämä osuus voi kuitenkin satunnaisesti ylittää tämän rajan, jos testissä käytetyn radioleimatun 17β-estradiolin pienimmästä pitoisuudesta mitataan hyvin pieni dpm-arvo.

Kilpailevan sitoutumisen testi

44. Leimaamattoman 17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien tulisi syrjäyttää [^{3}H]-17β-estradioli reseptorista yhteen kohtaan kilpailevan sitoutumisen osalta johdonmukaisesti.

45. Vertailuestrogeenin (ts. 17β-estradiolin) IC_{50}-arvon on oltava likimain sama kuin [^{3}H]-17β-estradiolin molaarinen konsentraatio plus saturaatiositoutumistestissä määritetty Kd-arvo.

46. Spesifisen kokonaissitoutumisen tulisi olla johdonmukaisesti hyväksymisalueella 40 ± 10 prosenttia, kun jokaiseen kuoppaan testiajoissa lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden keskimääräinen mitattu pitoisuus on 0,5 nM. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava.

47. Liuotin ei saa muuttaa testin herkkyyttä tai toistettavuutta. Liuotinkontrollin (TB-kuopat) tuloksia verrataan puskurikontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään. TB- ja puskurikontrollin tulosten tulisi olla verrattavissa, jos liuotin ei ole vaikuttanut testiin.

48. Sitoutumaton aine saa syrjäyttää enintään 25 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolista hrERα:sta, kun testattu konsentraatio on 10^{-3} M (OTES) tai 10^{-4} M (DBP).

49. Vertailuestrogeenille ja kahdelle heikosti sitoutuvalle aineelle (noretinodreli ja noretindroni) on laadittu suoritusvaatimukset CERI hrER -sitoutumistestin validointitutkimukseen perustuvien tietojen avulla (lähdeviitteen 2 liite N). Keskiarvolle (n) +/- keskihajonnalle on määritetty 95 prosentin luottamusvälit kaikkien niiden kontrolliajojen perusteella, jotka tehtiin neljässä validointitutkimuksiin osallistuneissa laboratorioissa. Nämä 95 prosentin luottamusvälit laskettiin vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvien aineiden käyrän sovitusparametreille (ylin ja alin arvo, Hillslope ja $\log IC_{50}$). Lisäksi laskettiin heikosti sitoutuvien aineiden $\log_{10}$RBA suhteessa vertailuestrogeeniin. Taulukossa 1 esitetään käyrän sovituksen parametrien odotuksenmukaiset alueet, joita voidaan käyttää suoritusvaatimuksina. Käytännössä IC_{50}-arvon alue voi vaihdella hieman reseptorivalmisteen kokeellisesti johdetun Kd-arvon ja testissä käytetyn ligandin pitoisuuden perusteella.

50. Testikemikaalien käyrän sovitusparametreille ei ole laadittu suoritusvaatimuksia, koska mahdollisten testikemikaalien valikoima on hyvin laaja, kuten myös mahdollisten affiniteettien ja tulosten vaihtelu (täysi käyrä, osittainen käyrä, ei käyrän sovitusta). Testikemikaalin jokaisen testiajon tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita. Testikemikaalista on käytettävä riittävän monta pitoisuutta, jotta kilpailevan käyrän huippu (ts. 90–100 prosentin sitoutuminen) voidaan määrittää selvästi. Rinnakkaisnäytteiden vaihtelun on oltava kohtuullista ja tieteellisesti perusteltavissa testikemikaalin jokaisen pitoisuuden ja kolmen eriaikaisen testiajon osalta. Testikemikaalin kontrollien pitäisi täyttää jokaisessa testiajossa CERI-testiä koskevat suoritusvaatimukset, ja niiden tulee olla yhdenmukaiset kunkin laboratorion aiempien kontrollitietojen kanssa.

AINEISTON ANALYSOINTI

Saturaatiositoutumisen testi

51. Sekä kokonaissitoutuminen että epäspesifinen sitoutuminen mitataan. Näistä arvoista lasketaan [^{3}H]-17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien spesifinen sitoutuminen vähentämällä epäspesifinen sitoutuminen kokonaissitoutumisesta. Spesifiä sitoutumista vs. [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuutta kuvaavan käyrän tulisi saavuttaa tasanne suurinta spesifistä sitoutumista kuvaavan arvon kohdalla, joka kuvastaa hrERα:n saturoitumista [^{3}H]-17β-estradiolilla. Lisäksi aineiston analyysissa on dokumentoitava [^{3}H]-17β-estradiolin sitoutuminen yksittäiseen suuren affiniteetin sitoutumiskohtaan. Epäspesifinen, kokonais- ja spesifinen sitoutuminen on esitettävä saturaatiositoutumista kuvaavalla käyrällä. Näiden tietojen tarkemmassa analyysissa on käytettävä epälineaarista regressioanalyysia (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), ja lopulliset tiedot tulee esittää Scatchardin kuvaajalla.

52. Aineiston analyysissa on määritettävä Bmax- ja Kd-arvot pelkästään kokonaissitoutumista koskevista tiedoista ja olettamalla, että epäspesifinen sitoutuminen on lineaarista. Toisenlaisen menetelmän käyttäminen on perusteltava. Lisäksi parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Valittu robustin regression menetelmä on ilmoitettava. Ligandin depleetion korjausta (käyttämällä esimerkiksi Swillensin menetelmää, 1995) on käytettävä aina määritettäessä Bmax- ja Kd-arvoja saturaatiositoutumistiedoista.

Kilpailevan sitoutumisen testi

53. Kilpailevan sitoutumisen käyrä esitetään [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisenä sitoutumisena vs. kilpailijan pitoisuutena (log10-yksiköt). Testikemikaalin se pitoisuus, joka estää 50 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisestä enimmäissitoutumisesta, on IC_{50}-arvo.

54. Positiivisten kontrollien (ts. vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen) $\log(IC_{50})$-arvojen estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin (esimerkiksi BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ylin, alin, kulmakerroin ja $\log(IC_{50})$ on yleensä jätettävä rajattomiksi näitä käyriä sovitettaessa. Parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Ligandin depleetion korjausta ei tule käyttää. Alustavan analyysin jälkeen jokainen sitoutumiskäyrä on tarkistettava, jotta se varmasti sopii malliin asianmukaisesti. Heikosti sitoutuvan aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) lasketaan prosenttiosuutena heikosti sitoutuvan aineen log (IC_{50}) -arvosta suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon. Positiivisten kontrollien ja sitoutumattoman kontrollin tuloksia on arvioitava käyttämällä testin suorituskyvyn mittareita, jotka on esitetty tämän lisäyksen 344–49 kohdassa.

55. Kaikkien testikemikaalien tiedot on analysoitava käyttämällä vaiheittaista lähestymistapaa, jotta varmistetaan, että tiedot analysoidaan asianmukaisesti ja että kukin kilpailevan sitoutumisen käyrä luokitellaan oikein. On suositeltavaa, että testikemikaalin jokaiselle ajolle tehdään aluksi standardoitu aineistoanalyysi, joka on identtinen vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvista aineista koostuvien kontrollien yhteydessä käytetyn analyysin kanssa (ks. tämän lisäyksen 354 kohta). Kun se on tehty, on tehtävä käyrän sovitusparametrien tekninen tarkastus ja tarkastettava silmämääräisesti, miten hyvin tiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään jokaisesta ajosta. Jos tämän teknisen tarkastuksen aikana tehdään havaintoja, joiden mukaan spesifisesti sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen osuus pienenee pitoisuuden mukaan, jokaisen testikemikaalipitoisuuden teknisten rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu on vähäistä ja kolmen ajon sovitusparametrit ovat johdonmukaisia, ne ovat hyvä osoitus siitä, että testi ja aineistoanalyysit on tehty asianmukaisesti.

Tietojen tulkinta

56. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutuva aine, jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja jos vastekäyrän alin piste tietojen vaihteluvälin alueella on 50 prosentin alapuolella (kuva 1).

57. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutumaton aine, jos

— sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja sovitetun vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 75 prosentin alapuolella, tai

— sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa ja alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella

58. Testikemikaalit katsotaan epäselviksi, jos kumpikaan edellä esitetyistä ehdoista ei täyty (ts. jos sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

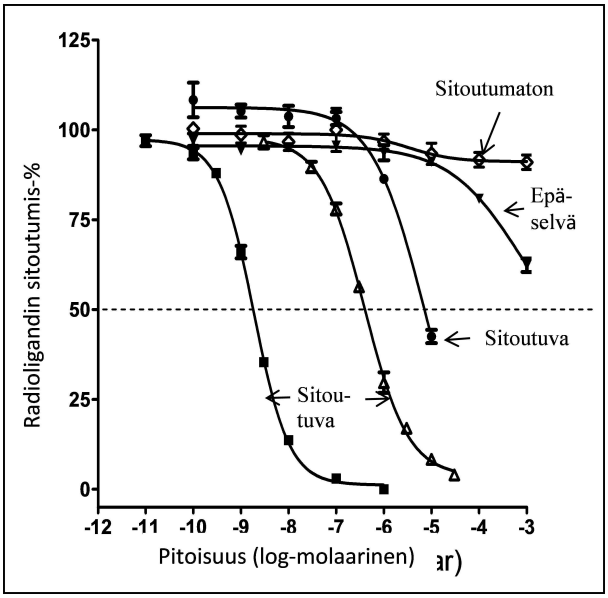
Taulukko 7

Luokitteluperusteet testikemikaalin kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella

Luokittelu	Perusteet
Sitoutuva[a]	Sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa. **Vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 50 prosentin alapuolella**.
Sitoutumaton[b]	Jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa, **sovitetun vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 75 prosentin yläpuolella**. Jos sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa, **alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella.**
Epäselvä[c]	Mikä tahansa testiaine, joka ei ole sitoutuva eikä sitoutumaton aine (esim. sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

Kuva 1

Esimerkkejä testikemikaalin luokittelusta kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella



59. Laboratoriossa testikemikaalista tehdyt useat ajot yhdistetään antamalla jokaiselle ajolle numeeriset arvot ja laskemalla ajojen keskiarvot taulukossa 8 osoitetun mukaisesti. Jokaisen laboratorion yhdistettyjen ajojen tuloksia verrataan jokaisen testikemikaalin odotuksenmukaiseen luokitukseen.

Taulukko 8

Yhdessä laboratoriossa tehtyihin useisiin ajoihin perustuva menetelmä testikemikaalin luokitteluun

Arvon antaminen jokaiselle ajolle:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	2
Epäselvä	1
Sitoutumaton	0
Luokittelu ajojen numeerisen arvon keskiarvon perusteella:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	Keskiarvo ≥ 1,5
Epäselvä	0,5 ≤ keskiarvo < 1,5
Sitoutumaton	Keskiarvo < 0,5

TESTIRAPORTTI

60. Ks. 24 kohta kappaleesta ”hrER-SITOUTUMISTESTIN OSAT” tämän testimenetelmän osalta.

Lisäys 3.1

SANASTO

[^{3}H]E2: Tritiumilla radioleimattu 17β-estradioli

DCC: Dekstraanilla pinnoitettu hiili

E_2: Leimaamaton 17β-estradioli (inertti)

Testipuskuri: 10 mM Tris-HCl:ää, pH 7,4, joka sisältää 1 mM EDTAa, 1 mM EGTAa, 1 mM NaVO3:a, 10 prosenttia glyserolia, 0,2 mM leupeptiiniä, 1 mM ditiotreitolia ja 10 mg/ml naudan seerumin albumiinia.

hrERα: Ihmisen rekombinantti estrogeenireseptori alfa (ligandin sitoutumisdomeeni)

Rinnakkaisnäyte: Yksi monesta kuopasta, joiden sisällöt ja pitoisuudet ovat samat ja jotka testataan samaan aikaan yhdessä ajossa. Tässä protokollassa jokainen testikemikaalin pitoisuus testataan kolmella rinnakkaisnäytteellä. Tämä tarkoittaa sitä, että testikemikaalin jokaisesta pitoisuudesta on kolme rinnakkaisnäytettä, jotka testataan samaan aikaan.

Testiajo: Täydellinen sarja samaan aikaan testattavia mikrotiitterilevyjen testikuoppia, joista saadaan kaikki tarvittavat tiedot, joilla voidaan luonnehtia testikemikaalin sitoutumista hrERα:aan (ts. testikuoppaan lisätty [^{3}H]-17β-estradioli kokonaisuudessaan, [^{3}H]-17β-estradiolin enimmäissitoutuminen hrERα:an, epäspesifinen sitoutuminen ja kokonaissitoutuminen testikemikaalin eri pitoisuuksilla). Testiajossa voidaan käyttää sekä yhtä että useaa testikuoppaa (ts. rinnakkaisnäytettä) pitoisuutta kohti, mutta koska tässä protokollassa edellytetään, että rinnakkaisnäytteitä on kolme, yksi ajo koostuu kolmesta testikuopasta pitoisuutta kohti. Lisäksi tässä protokollassa edellytetään, että yhtä kemikaalia kohti tehdään kolme itsenäistä (eli eriaikaista) ajoa.

Lisäys 3.2

KILPAILEVAN SITOUTUMISEN TESTIKUOPPIEN JÄRJESTYS

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	A1	1	Tyhjä	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Tyhjä	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Tyhjä	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	ei-r-akt. E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	ei-r-akt. E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	ei-r-akt. E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	ei-r-akt. E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	ei-r-akt. E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	ei-r-akt. E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	ei-r-akt. E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	ei-r-akt. E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	D3	3	ei-r-akt. E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	ei-r-akt. E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	ei-r-akt. E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	ei-r-akt. E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	ei-r-akt. E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	ei-r-akt. E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	ei-r-akt. E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	ei-r-akt. E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	ei-r-akt. E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	ei-r-akt. E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	ei-r-akt. E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	ei-r-akt. E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	ei-r-akt. E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	A4	1	Noretinodreli	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretinodreli	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretinodreli	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretinodreli	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretinodreli	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretinodreli	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretinodreli	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretinodreli	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretinodreli	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretinodreli	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretinodreli	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretinodreli	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretinodreli	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	E5	2	Noretinodreli	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretinodreli	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	Noretinodreli	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretinodreli	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretinodreli	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretinodreli	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretinodreli	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretinodreli	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	Noretinodreli	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	Noretinodreli	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	Noretinodreli	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

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (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

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (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	kokonaissitoutuminen	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	B11	5	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Puskurikontrolli	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Puskurikontrolli	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Puskurikontrolli	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Puskurikontrolli	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Puskurikontrolli	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Puskurikontrolli	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Tyhjä (radioakt. aineelle)	Radioakt.	H1	—	90	—	10	—	100	—

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	G11 (*)	2	Tyhjä (radioakt. aineelle)	Radioakt.	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Tyhjä (radioakt. aineelle)	Radioakt.	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Tyhjä (radioakt. aineelle)	Radioakt.	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Tyhjä (radioakt. aineelle)	Radioakt.	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Tyhjä (radioakt. aineelle)	Radioakt.	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Tuntematon 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Tuntematon 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Tuntematon 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Tuntematon 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Tuntematon 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Tuntematon 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Tuntematon 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Tuntematon 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Tuntematon 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	D1	1	Tuntematon 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Tuntematon 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Tuntematon 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Tuntematon 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Tuntematon 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Tuntematon 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Tuntematon 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Tuntematon 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Tuntematon 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Tuntematon 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Tuntematon 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Tuntematon 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Tuntematon 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Tuntematon 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	H3	3	Tuntematon 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Tuntematon 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Tuntematon 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Tuntematon 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Tuntematon 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Tuntematon 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Tuntematon 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Tuntematon 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Tuntematon 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Tuntematon 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Tuntematon 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Tuntematon 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Tuntematon 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Tuntematon 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	E5	2	Tuntematon 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Tuntematon 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Tuntematon 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Tuntematon 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Tuntematon 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Tuntematon 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Tuntematon 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Tuntematon 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Tuntematon 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Tuntematon 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Tuntematon 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Tuntematon 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Tuntematon 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Tuntematon 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	B7	1	Tuntematon 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Tuntematon 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Tuntematon 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Tuntematon 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Tuntematon 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Tuntematon 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Tuntematon 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Tuntematon 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Tuntematon 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Tuntematon 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Tuntematon 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Tuntematon 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Tuntematon 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Tuntematon 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	F9	3	Tuntematon 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Tuntematon 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Tuntematon 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Tuntematon 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Tuntematon 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Tuntematon 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Tuntematon 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontrolli E2 (maks.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontrolli E2 (maks.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontrolli E2 (maks.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontrolli E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Kontrolli E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolli E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	C10	1	Kontrolli NE (maks.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolli NE (maks.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolli NE (maks.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolli NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50x-10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolli NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50x-10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolli NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50x-10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	G10	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Huomaa, että radioaktiiviset kuopat ovat tyhjiä inkuboinnin aikana. 10 µl lisätään vain tuikelaskentaa varten.

Lisäys 4

KILPAILEVAN HRER-SITOUTUMISTESTIN AINEISTON ANALYSOINNISSA HUOMIOON OTETTAVIA NÄKÖKOHTIA

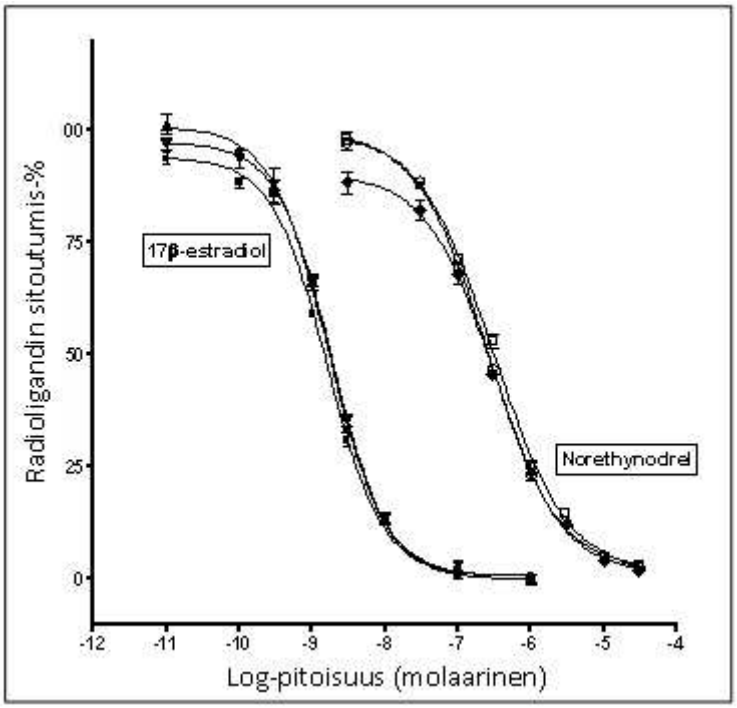
1. Kilpailevassa hrERα-sitoutumistestissä mitataan yhden [^{3}H]-17β-estradiolipitoisuuden sitoutumista samaan aikaan suurenevien testikemikaalipitoisuuksien kanssa. Kilpailevan sitoutumisen käyrä esitetään [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisenä sitoutumisena vs. kilpailijan pitoisuutena (log10-yksiköt). Testikemikaalin se pitoisuus, joka estää 50 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisestä enimmäissitoutumisesta, on IC_{50}-arvo.

Vertailuestrogeenia ja heikosti sitoutuvaa ainetta koskevien tietojen analysointi (1)

2. Kontrolliajoista saadut tiedot (ts. [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen spesifinen sitoutuminen ja kontrollikemikaalin log-pitoisuus) muunnetaan tarkempaa analyysia varten. Positiivisten kontrollien (ts. vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen) log(IC_{50})-arvojen estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin (esimerkiksi BioSoft; GraphPad Prism) (2). Ylin, alin, kulmakerroin ja log(IC50) voidaan yleensä jättää rajattomiksi näitä käyriä sovitettaessa. Parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Valittu robustin regression menetelmä on ilmoitettava. FW:n tai CERIn hrER-testeissä ei ole tarvittu ligandin depleetion korjausta, mutta sitä voidaan tarvittaessa harkita. Alustavan analyysin jälkeen jokainen sitoutumiskäyrä on tarkistettava, jotta se varmasti sopii malliin asianmukaisesti. Heikosti sitoutuvan aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) lasketaan prosenttiosuutena heikosti sitoutuvan aineen log (IC_{50}) -arvosta suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon. Positiivisten kontrollien ja sitoutumaton aine -kontrollin tuloksia on arvioitava käyttämällä testin suorituskyvyn mittareita ja hyväksymisperusteita, jotka on kuvattu tässä testimenetelmässä (20 kohta), lisäyksessä 2 (FW-testi, 41–51 kohta) ja lisäyksessä 3 (CERI-testi, 41–51 kohta). Esimerkkejä kolmesta vertailuestrogeenilla ja heikosti sitoutuvalla aineella tehdystä testiajosta on kuvassa 1.

Kuva 1

Esimerkkejä vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuva aine -kontrollin kilpailevan sitoutumisen käyristä



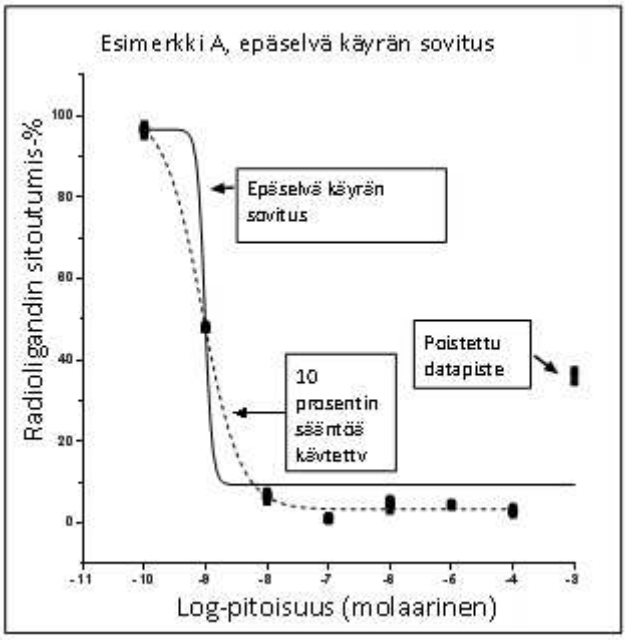
Testikemikaalien tietojen analysointi

3. Kaikkien testikemikaalien tiedot on analysoitava käyttämällä vaiheittaista lähestymistapaa, jotta varmistetaan, että tiedot analysoidaan asianmukaisesti ja että kukin kilpailevan sitoutumisen käyrä luokitellaan oikein. Testikemikaalin jokaiselle ajolle on aluksi tehtävä standardoitu aineistoanalyysi, joka on identtinen vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvista aineista koostuvien kontrollien yhteydessä käytetyn analyysin kanssa. Kun se on tehty, on tehtävä käyrän sovitusparametrien tekninen tarkastus ja tarkastettava silmämääräisesti, miten hyvin tiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään jokaisesta ajosta. Jos tämän teknisen tarkastuksen aikana tehdään havaintoja, joiden mukaan spesifisesti sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen osuus pienenee pitoisuuden mukaan, jokaisen kemikaalipitoisuuden teknisten rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu on vähäistä ja kolmen ajon sovitusparametrit ovat johdonmukaisia, ne ovat hyvä osoitus siitä, että testi ja aineistoanalyysit on tehty asianmukaisesti. Testikemikaalin jokaisen testiajon tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita, ja tieteellisesti perusteltuja on oltava tietojen, joiden nojalla kukin testikemikaali luokiteltiin sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi.

4. Toisinaan tiedot voivat edellyttää erityistä paneutumista, jotta hrER:ään sitoutumista koskevien tietojen analysointi ja tulkinta on asianmukaista. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että kilpailevaan reseptoriin sitoutumista koskevien tietojen analysointi ja tulkinta voivat vaikeutua, jos spesifisen sitoutumisen prosentuaalinen osuus kasvaa, kun kemikaaleja testataan suurimmilla pitoisuuksilla (kuva 2). Tämä on tunnettu ongelma, johon on törmätty käytettäessä protokollia moniin kilpailevaan reseptoriin sitoutumista koskeviin testeihin (3. Näissä tapauksissa vasteen on todettu olevan pitoisuudesta riippuvainen pienemmillä pitoisuuksilla, mutta kun testikemikaalin pitoisuus saavuttaa liukoisuusrajan, [^{3}H]17β-estradiolin syrjäyttäminen ei enää vähene. Näissä tapauksissa tiedot suuremmista pitoisuuksista osoittavat, että testin biologinen raja on saavutettu. Usein tämä ilmiö on liittynyt esimerkiksi kemikaalin liukenemattomuuteen ja sakkautumiseen suuremmilla pitoisuuksilla, tai se voi kuvastaa sitä, että dekstraanilla pinnoitetun hiilen kapasiteetti kerätä sitoutumatonta radioleimattua ligandia erottamisen aikana ylittyy kemikaalin suurimmilla pitoisuuksilla. Jos tällaiset datapisteet otetaan mukaan sovitettaessa kilpailevan sitoutumisen tietoja S-käyrään, seurauksena voi olla testikemikaalin virheellinen luokittelu estrogeenireseptoriin sitoutumispotentiaalin osalta (kuva 2). Tämän välttämiseksi FW- ja CERI hrER -sitoutumistesteissä on mahdollisuus sulkea analyysista pois datapisteet, joissa rinnakkaisnäytteiden [^{3}H]17β-estradiolin spesifisen prosentuaalisen sitoutumisen keskiarvo on vähintään 10 prosenttia suurempi kuin pienemmällä pitoisuudella saatu keskiarvo (tästä käytetään nimitystä 10 prosentin sääntö). Tätä sääntöä voidaan käyttää tietylle käyrälle vain kerran, ja tietoja täytyy olla vähintään kuudesta pitoisuudesta, jotta käyrä voidaan luokitella oikein.

Kuvio 2

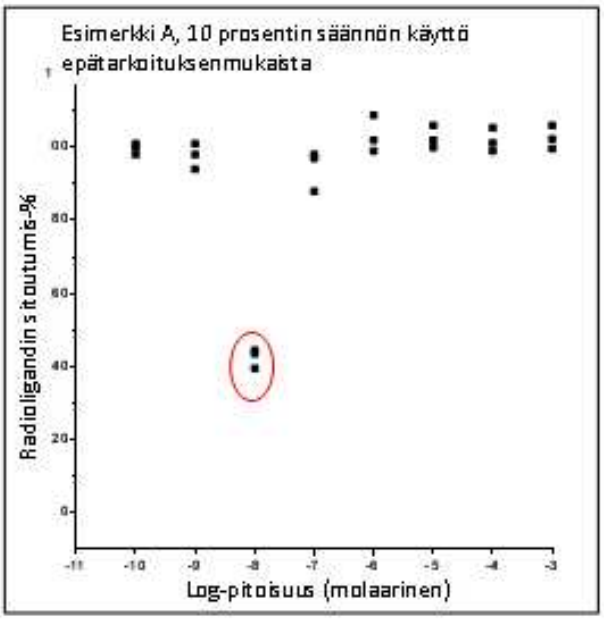
Esimerkkejä kilpailevan sitoutumisen käyristä, joissa käytetään tai ei käytetä 10 prosentin sääntöä

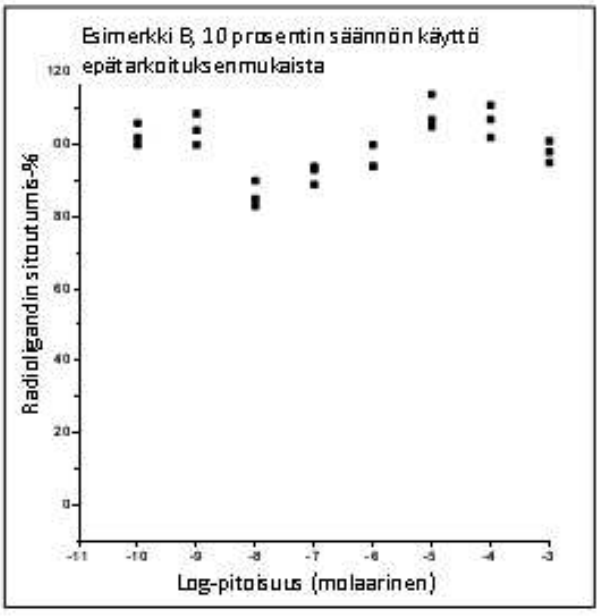


5. Kymmenen prosentin sääntöä on käytettävä näiden käyrien korjaamisessa asianmukaisesti ja huolellisesti, ja se on varattava niihin tapauksiin, joissa näyttää vahvasti siltä, että aine on ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin sitoutuva aine. FW hrER -sitoutumistestin validointitutkimukseen sisältyviä kokeita tehtäessä todettiin, että 10 prosentin säännön soveltamisella oli joskus tahattomia seurauksia, joita ei voitu ennakoida. Niissä kemikaaleissa, jotka eivät olleet vuorovaikutuksessa reseptorin kanssa (ts. varsinaiset sitoutumattomat aineet), näkyi usein radioligandin 100-prosenttiseen sitoutumiseen nähden vaihtelua, joka oli suurempaa kuin 10 prosenttia testattujen pitoisuuksien vaihteluvälistä. Jos pienin arvo saatiin pienimmällä pitoisuudella, kaikista suuremmista pitoisuuksista saadut tiedot voidaan mahdollisesti poistaa analyysista 10 prosentin sääntöä käyttämällä, vaikka nämä pitoisuudet voivat olla hyödyllisiä sen vahvistamisessa, että kemikaali on sitoutumaton aine. Kuvassa 3 on esimerkkejä tilanteista, jolloin 10 prosentin säännön käyttö ei ole tarkoituksenmukaista.

Kuva 3

Esimerkkejä kilpailevaa sitoutumista koskevista tiedoista, joiden yhteydessä 10 prosentin säännön käyttäminen ei ole tarkoituksenmukaista





LÄHDEKIRJALLISUUS

(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, s. 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 IHON HERKISTYMISTESTIT *IN VITRO*, JOISSA KÄSITELLÄÄN KESKEISTÄ TAPAHTUMAA ELI DENDRIITTISOLUJEN AKTIVOITUMISEN VAIKUTUSTA IHON HERKISTYMISEN HAITTAVAIKUTUSREITTIIN

YLEISJOHDANTO

Dendriittisolujen aktivoitumiseen keskeisenä tapahtumana perustuva testimenetelmä

1. Ihoa herkistävällä aineella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun EU-asetuksen 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Nykyiset tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty OECD:n AOP-ohjelmassa tiivistetysti haittavaikutusreittinä (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) herkistymisen käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta haittavaikutukseen eli allergiseen kosketusihottumaan. Herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma (eli ensimmäinen keskeinen tapahtuma) on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin. Toinen keskeinen tapahtuma tässä haittavaikutusreitissä tapahtuu keratinosyyteissä; se käsittää tulehdusvasteita ja geeniekspression muutoksia, jotka liittyvät tiettyihin solujen viestinvälitysreitteihin, kuten antioksidatiivisista/elektrofiilisista vaste-elementeistä (ARE) riippuviin reitteihin. Kolmas keskeinen tapahtuma on dendriittisolujen aktivoituminen, jota arvioidaan yleensä tiettyjen solujen pintamerkkiaineiden, kemokiinien ja sytokiininen, ilmenemisen perusteella. Neljäs keskeinen tapahtuma on T-solujen aktivoituminen ja proliferaatio, jota arvioidaan välillisesti hiirille tehdyllä paikallisella imusolmukemääritysmenetelmällä eli LLNA-kokeella (Local Lymph Node Assay) (3).

2. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 442E (2017). Siinä kuvataan *in vitro* -testejä, joilla tutkitaan mekanismeja, jotka on kuvattu ihon herkistymisen haittavaikutusreitin keskeisen tapahtuman eli dendriittisolujen aktivoitumisen yhteydessä (2). Testimenetelmä koostuu testeistä, joita käytetään apuna ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti.

   Tässä testimenetelmässä kuvatut testit ovat

   — ihmisen solulinjaan perustuva aktivointitesti (h-CLAT, human Cell Line Activation Test)

   — U937-solulinjaan perustuva aktivointitesti (U-SENS™)

   — interleukiini 8:n reportterigeenitesti (IL-8 Luc -testi).

3. Tähän testimenetelmään sisältyvissä testeissä ja niihin liittyvässä OECD:n testiohjeessa voi olla eroja tietojen tuottamiseen käytetyn menettelyn ja mitattujen lukemien osalta, mutta niitä voi käyttää ihon herkistymisen haittavaikutusreitin keskeiseen tapahtumaan eli dendriittisolujen aktivoitumista koskeviin testituloksiin liittyvien maiden vaatimusten yhteydessä samalla, kun hyödynnetään OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353. 31.12.2008. s. 1).

Taustaa ja keskeiseen tapahtumaan perustuvaan testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

4. Ihon herkistymisen arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnussonin ja Kligmanin GPMT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6) (4) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Hiirellä tehtävät testit, LLNA (TM B.42) (3) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta, LLNA: DA (TM B.50) (5) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.

5. Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testimenetelmät on katsottu tieteellisesti päteviksi menetelmiksi ihon herkistymisen haittavaikutusreitin ensimmäisen keskeisen tapahtuman (TM B.59; DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) (7)) ja toisen keskeisen tapahtuman (TM B.60; ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmä (8)) osalta ihon herkistymiseen liittyvän kemikaalien vaarallisuuden arvioinnissa.

6. Tässä testimenetelmässä kuvatuilla testeillä joko kvantifioidaan muutosta solun pintamerkkiaineen (-aineiden) ilmentymisessä, joka liittyy monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumiseen herkistäville aineille altistumisen jälkeen (esim. CD54, CD86), tai muutoksia IL-8:n, dendriittisolujen aktivoitumiseen liittyvän sytokiinin, ilmentymisessä. Ihoa herkistävien aineiden on ilmoitettu indusoivan solukalvon merkkiaineiden (esim. CD40, CD54, CD80, CD83 ja CD86) ilmentymistä sen lisäksi, että ne indusoivat myös proinflammatorisia sytokiineja, kuten IL-1β:aa ja TNF-α:aa, ja useita kemokiinejä, kuten IL-8:aa (CXCL8) ja CCL3:a (9) (10) (11) (12), jotka liittyvät dendriittisolujen aktivoitumiseen (2).

7. Koska dendriittisolujen aktivoituminen on kuitenkin vain yksi keskeinen tapahtuma ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä (2) (13), niistä testeistä saadut tiedot, joissa mitataan pelkästään dendriittisolujen aktivoitumisen merkkiaineita, eivät välttämättä riitä siihen, että kemikaalien ihoa herkistävästä vaikutuksesta tai sen puuttumisesta voitaisiin tehdä päätelmiä. Siksi tässä testimenetelmässä kuvatuilla testeillä tuotettuja tietoja suositellaan käytettäväksi tukevina tietoina ihoa herkistävien (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) ja herkistämättömien aineiden erottelussa testauksen ja arvioinnin yhdennettyjen lähestymistapojen (IATA) mukaisesti yhdistämällä ne muihin täydentäviin tietoihin. Ne voivat olla tietoja, jotka on saatu *in vitro* -testeillä, joissa tutkitaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista (13). Esimerkkejä näillä testeillä tuotettujen tietojen käytöstä määritettyjen lähestymistapojen (jotka on standardoitu sekä käytettävien tiedonlähteiden että ennusteiden johtamisessa tietoihin sovellettavien menettelyjen osalta) mukaisesti on julkaistu (13), ja niitä voidaan käyttää hyödyllisinä elementteinä IATAn mukaisesti.

8. Tässä testimenetelmässä kuvattuja testejä ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokittelemiseen YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokkiin 1A ja 1B (ne viranomaiset, jotka käyttävät näitä kahta valinnaista alaluokkaa) eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Sääntelykehyksen mukaan näillä menetelmillä saatuja positiivisia tuloksia voidaan kuitenkin käyttää yksinään kemikaalin luokittelussa YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.

9. Tässä testimenetelmässä käytetyllä ilmauksella 'testikemikaali' tarkoitetaan sitä, mitä testataan [1], eikä ilmaus liity siihen, voidaanko testejä käyttää yhdestä tai useammasta ainesosasta koostuvien aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Testien käytettävyydestä useasta ainesosasta koostuvien aineiden/seosten testaamiseen on tällä hetkellä niukalti tietoa (14) (15). Teknisesti testejä voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi [2]. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Lisäksi useasta ainesosasta koostuvia aineita tai seoksia testattaessa pitää ottaa huomioon sytotoksisten ainesosien mahdollinen häiritsevä vaikutus havaittuihin vasteisiin.

[1] Kesäkuussa 2013 pidetyssä OECD:n yhteisessä kokouksessa sovittiin, että ilmausta "testikemikaali" olisi käytettä aina kun mahdollista aiempaa yhdenmukaisemmin uusissa ja päivitettävissä OECD:n testiohjeissa kuvaamaan sitä, mitä testataan.

[2] Tätä virkettä ehdotettiin ja se hyväksyttiin kansallisten koordinaattorien työryhmän kokouksessa huhtikuussa 2014.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (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. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Tämän liitteen B.42 luku: Paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä.

(4) Tämän liitteen B.6 luku: Ihon herkistyminen.

(5) Tämän liitteen B.50 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: DA.

(6) Tämän liitteen B.51 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: BrdU-ELISA.

(7) Tämän liitteen B.59 luku: In chemico -ihoherkistys: DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay).

(8) Tämän liitteen B.60 luku: *In vitro* -ihoherkistys: ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmä.

(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. Saatavana osoitteessa https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

Lisäys 1

IN VITRO -IHOHERKISTYS: IHMISEN SOLULINJAAN PERUSTUVA AKTIVOINTITESTI (H-CLAT, HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST)

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. h-CLAT-testissä kvantifioidaan muutokset niiden solujen pintamerkkiaineiden ilmentymisessä, jotka liittyvät monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumisprosessiin (ts. CD86 ja CD54), ihmisen monosyyttileukemiasolulinjassa THP-1 herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1) (2). Sen jälkeen solujen CD86- ja CD-54-pintamerkkiaineiden mitattuja ilmentymistasoja käytetään tukemaan ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua.

2. h-CLAT-testi on arvioitu Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorion (EURL ECVAM) koordinoimassa validointitutkimuksessa ja sen jälkeen tehdyssä riippumattomassa vertaisarvioinnissa, jonka teki EURL ECVAMin tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC). Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella EURL ECVAM suositteli (3), että h-CLAT-testiä käytetään IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten h-CLAT-testillä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. On osoitettu, että h-CLAT on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelytekniikoista ja virtaussytometria-analyysista. Testistä odotettavien ennusteiden laboratorioiden sisäinen ja niiden välinen toistettavuus on 80 prosentin luokkaa (3) (12). Validointitutkimuksesta (13) ja muista julkaistuista tutkimuksista (14) saadut tulokset osoittavat, että LLNA-testin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 85 prosenttia (N=142), herkkyys on 93 prosenttia (94/101) ja spesifisyys 66 prosenttia (27/41) (EURL ECVAMin tekemän uudelleenanalyysin (12) perusteella, kun otetaan huomioon kaikki olemassa oleva tiedot paitsi negatiiviset tulokset niistä kemikaaleista, joiden Log Kow -arvo on suurempi kuin 3,5 4 kohdassa kuvatun mukaisesti). h-CLAT-testistä saatavat väärät negatiiviset ennusteet koskevat todennäköisemmin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on pieni tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (4) (13) (15). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että h-CLAT-menetelmää voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat h-CLAT-menetelmän käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavana olevien tietojen perusteella on osoitettu, että h-CLAT-menetelmää voidaan käyttää testattaessa kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin funktionaalisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (in vivo -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia (3) (14) (15). h-CLAT-menetelmä soveltuu testikemikaaleille, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (ts. kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai separoidu liuottimesta/kantaja-aineesta eri faaseihin) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa (ks. 14 kohta). Testikemikaalit, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, antavat helposti vääriä negatiivisia tuloksia (14). Siksi niistä testikemikaaleista saatuja negatiivisia tuloksia, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, ei tule ottaa huomioon. Sen sijaan näistä testikemikaaleista saatuja positiivisia tuloksia, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, voidaan käyttää tukemaan testikemikaalin määrittämistä ihoa herkistäväksi aineeksi. Lisäksi käytetyn solulinjan rajallisen metabolointikyvyn (16) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohapteenit (eli aineet, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien kautta) ja prehapteenit (eli aineet, jotka hapetus aktivoi) voivat antaa h-CLAT-testissä negatiivisia tuloksia varsinkin hapettumisvauhdin ollessa hidas (15). Fluoresoivia testikemikaaleja voidaan arvioida h-CLAT-testillä (17), mutta voimakkaasti fluoresoivat testikemikaalit, jotka emittoivat samalla aallonpituudella kuin fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) tai propidiumjodidi (PI), häiritsevät virtaussytometrista tutkimusta, eikä niitä siis voida arvioida oikein FITC-konjugoituja vasta-aineita tai propidiumjodidia käyttämällä. Tässä tapauksessa voidaan käyttää muita fluorokromilla leimattuja vasta-aineita tai muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kunhan voidaan osoittaa, että ne tuottavat samanlaiset tulokset kuin FITC-leimatut vasta-aineet (ks. 24 kohta) tai propidiumjodidi (ks. 18 kohta) esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet (lisäys 1 ja 2). Edellä esitetyn perusteella negatiivisia tuloksia on tulkittava ilmoitettujen rajoitusten valossa ja muiden tietolähteiden perusteella IATAn puitteissa. Jos voidaan osoittaa, ettei h-CLAT-menetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin.

5. Kuten edellä on todettu, h-CLAT-menetelmä auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin (4) (5) (9) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten h-CLAT-menetelmän tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.1.

TESTIN PERIAATE

7. hCLAT-menetelmä on in vitro -testi, jolla kvantifioidaan solun pintamerkkiaineen (CD86 ja CD54) ilmentymisen muutokset ihmisen monosyyttileukemian solulinjassa (THP-1-solut) 24 tunnin pituisen testikemikaalille altistuksen jälkeen. Nämä pintamolekyylit ovat tyypillisiä monosyyttisten THP-1-solujen aktivoitumisen merkkiaineita, ja ne voivat jäljitellä dendriittisolujen aktivoitumista, jolla on merkittävä tehtävä T-solujen virittymisessä (priming). Pintamerkkiaineiden ilmentymisen muutoksia mitataan virtaussytometrilla sen jälkeen, kun solut on ensin värjätty fluorokromilla leimatuilla vasta-aineilla. Samaan aikaan mitataan myös sytotoksisuus, jotta voidaan arvioida, tapahtuuko pintamerkkiaineiden ilmentymisen ylössäätelyä (upregulation) sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla. Pintamerkkiaineiden suhteellinen fluoresenssin intensiteetti liuotin-/kantaja-ainekontrolliin verrattuna lasketaan, ja sitä käytetään ennustemallina (ks. 26 kohta) tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemista.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

8. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 1.2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla. Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettävä tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 11 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 20–22 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

9. Tämä testi perustuu eläinkokeiden vaihtoehtoisia menetelmiä koskevan h-CLAT-tietokantapalvelun (DB-ALM) protokollaan nro 158 (18). Tätä protokollaa käytettiin EURL ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa. Suosituksena on käyttää tätä protokollaa, kun h-CLAT-menetelmä otetaan käyttöön ja kun sitä käytetään laboratoriossa. Jäljempänä kuvataan h-CLAT-menetelmän keskeiset osat ja menettelyt. Menetelmässä on kaksi vaihetta: *annoksenmääritystesti* ja *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaaminen*.

Solujen valmistelu

10. h-CLAT-menetelmässä on käytettävä ihmisen monosyyttileukemiasoluista koostuvaa solulinjaa (THP-1). Solut (TIB-202™) on suositeltavaa hankkia korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection.

11. THP-1-soluja viljellään (olosuhteet: 37°C, hiilidioksidipitoisuus 5 %, kosteutettu ilma) RPMI-1640-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanolia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Penisilliinin ja streptomysiinin käyttö kasvatusliuoksessa voidaan välttää. Siinä tapauksessa käyttäjien on kuitenkin varmistettava, ettei antibioottien puuttuminen kasvatusliuoksesta vaikuta tuloksiin, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Jotta kontaminaation riski pidetään mahdollisimman pienenä, on noudatettava hyviä soluviljelykäytäntöjä riippumatta siitä, onko soluviljelyliuoksessa antibiootteja vai ei. THP-1-solut kylvetään tavallisesti 2–3 päivän välein tiheyteen 0,1–0,2 × 10^6 solua/ml. Niitä on ylläpidettävä tiheydellä 0,1–1,0 × 10^6 solua/ml. Ennen kuin soluja käytetään testauksessa, niiden laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Solujen reaktiivisuustesti on tehtävä käyttämällä positiivisia kontrolleja, (2,4-dinitroklooribentseeni (DNCB) (CAS-nro 97-00-7, puhtaus ≥ 99 %) ja nikkelisulfaatti ($NiSO_4$) (CAS-nro 10101-97-0, puhtaus ≥ 99 %)) ja negatiivista kontrollia (maitohappo (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %)), kahden viikon kuluessa sulatuksesta. Sekä DNCB:n että $NiSO_4$:n pitäisi tuottaa positiivinen vaste sekä CD86- että CD54-pintamerkkiaineille, ja maitohapon pitäisi tuottaa negatiivinen vaste niille kummallekin. Testissä saa käyttää vain soluja, jotka läpäisevät reaktiivisuustestin. Soluja voidaan kasvattaa enintään kaksi kuukautta sulatuksen jälkeen. Siirrostuksia saa olla enintään 30. Reaktiivisuustesti on tehtävä 20–24 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

12. Testausta varten THP-1-solujen kylvötiheyden on oltava joko 0,1 × 10^6 solua/ml tai 0,2 × 10^6 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa joko 72 tai 48 tuntia. On tärkeää, että solujen tiheys on viljelypullossa mahdollisimman tasainen heti esiviljelyn jälkeen jokaisessa kokeessa (käyttämällä jompaakumpaa edellä esitetyistä esiviljelyehdoista), koska solujen tiheys viljelypullossa heti esiviljelyn jälkeen voi vaikuttaa allergeenien aiheuttamaan CD86:n/CD54:n ilmentymiseen (19). Testauspäivänä viljelypullosta otetut solut on resuspendoitava tuoreella kasvatusliuoksella tiheyteen 2 × 10^6 solua/ml. Sen jälkeen solut jaetaan 24-kuoppaiselle tasapohjaiselle levylle (500 µl, 1 × 10^6 solua/kuoppa) tai 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle levylle (80 µl 1,6 × 10^5 solua/kuoppa).

Annoksenmääritystesti

13. *Annoksenmääritystestillä* määritetään CV75-arvo eli se testikemikaalin pitoisuus, jolla solujen elinkyvyksi (CV, cell viability) saadaan 75 prosenttia verrattuna liuotin-/kantaja-ainekontrolliin. CV75-arvon avulla määritetään testikemikaalien pitoisuus *CD86:n/CD54:n* ilmentymisen mittauksessa (ks. 20–24 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

14. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. h-CLAT-menetelmässä testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti (ks. myös 4 kohta) suolaliuokseen tai kasvatusliuokseen ensimmäisenä liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona tai dimetyylisulfoksidiin (DMSO, ≥ puhtaus 99 %) toisena liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona, jos testikemikaali ei liukene tai muodosta stabiilia dispersiota kahdessa ensin mainitussa liuottimessa/kantaja-aineessa. Lopulliset pitoisuudet ovat 100 mg/ml (suolaliuoksessa tai kasvatusliuoksessa) tai 500 mg/ml (DMSO:ssa). Muita kuin edellä mainittuja liuottimia/kantaja-aineita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut. Testikemikaalin stabiilisuus lopullisessa liuottimessa/kantaja-aineessa on otettava huomioon.

15. Laimentaminen on tehtävä seuraavien vaiheiden mukaisesti aloittamalla testikemikaalien varastoliuospitoisuuksista 100 mg/ml (suolaliuos tai kasvatusliuos) tai 500 mg/ml (DMSO):

— Liuottimena/kantaja-aineena suolaliuos tai kasvatusliuos: Valmistetaan kahdeksan varastoliuosta (kahdeksan pitoisuutta) kaksinkertaisella sarjalaimennoksella asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta käyttämällä. Nämä varastoliuokset laimennetaan sen jälkeen 50-kertaisesti kasvatusliuokseen (työliuokset). Jos levyn suurin loppupitoisuus 1 000 µg/ml ei ole toksinen, enimmäispitoisuus on määritettävä uudelleen tekemällä uusi sytotoksisuustesti. Levyn loppupitoisuus saa olla enintään 5 000 µg/ml suolaliuokseen tai kasvatusliuokseen liuenneiden tai stabiilisti dispergoituneiden testikemikaalien yhteydessä.

— Liuottimena/kantaja-aineena DMSO: Valmistetaan kahdeksan varastoliuosta (kahdeksan pitoisuutta) kaksinkertaisella sarjalaimennoksella asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta käyttämällä. Nämä varastoliuokset laimennetaan sen jälkeen 250-kertaisesti kasvatusliuokseen (työliuokset). Levyn enimmäispitoisuus saa olla enintään 1 000 µg/ml, vaikka tämä pitoisuus ei olisi toksinen.

Työliuoksia käytetään altistukseen siten, että levyllä olevaan THP-1-solususpensioon lisätään yhtä suuri tilavuus työliuosta (ks. myös 17 kohta), jotta saadaan vielä toinen kaksinkertainen laimennos (levyn loppupitoisuus vaihtelee yleensä välillä 7,81–1 000 µg/ml).

16. h-CLAT-menetelmässä käytettävä liuotin-/kantaja-ainekontrolli on kasvatusliuos (ne testikemikaalit, jotka liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti (ks. 4 kohta) joko kasvatusliuokseen tai suolaliuokseen) tai DMSO (ne testikemikaalit, jotka liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti DMSO:hon), ja levyllä testattava yksi loppupitoisuus on 0,2 prosenttia. Tälle kontrollille tehdään samat laimennokset kuin työliuoksille (ks. 15 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

17. Kasvatusliuos tai työliuokset (ks. 15 ja 16 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 24- tai 96-kuoppaisella tasapohjaisella levyllä (ks. 12 kohta). Käsitellyt levyt inkuboidaan 24±0,5 tuntia 37 °C:ssa (hiilidioksidipitoisuus 5 %). Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levy kalvolla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa (20).

Propidiumjodidi (PI) -värjäys

18. Altistuksen (24±0,5 h) jälkeen solut siirretään näyteputkiin ja kerätään sentrifugoimalla. Supernatantit hävitetään ja loput solut resuspendoidaan 200 µl:lla (96-kuoppainen levy) tai 600 µl:lla (24-kuoppainen levy) fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, joka sisältää 0,1-prosenttista naudan seerumin albumiinia (värjäyspuskuria). Solususpensiosta 200 µl siirretään 96-kuoppaiselle pyöreäpohjaiselle levylle (96 kuopan osalta) tai mikroputkiin (24 kuopan osalta) ja pestään kahdesti 200 µl:lla (96 kuopan osalta) tai 600 µl:lla (24 kuopan osalta) värjäyspuskuria. Lopuksi solut resuspendoidaan värjäyspuskuriin (esim. 400 µl) ja PI-liuosta lisätään (esim. 20 µl) (esimerkki: PI-liuoksen loppupitoisuus on 0,625 µg/ml). Muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kuten 7-aminoaktinomysiini D:tä (7-AAD) ja trypaanisinistä tms., voidaan käyttää, jos vaihtoehtoisilla värjäysaineilla voidaan osoittaa saatavan samanlaisia tuloksia kuin PI-liuoksella, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet.

Sytotoksisuuden mittaus virtaussytometrialla ja CV75-arvon määrittäminen

19. Propidiumjodidin kertymä analysoidaan virtaussytometrilla kanavalla FL-3. Yhteensä kerätään 10 000 elävää solua (PI-negatiivinen). Solujen elinkyky voidaan laskea seuraavalla sytometrianalyysiohjelman yhtälöllä. Jos solujen elinkyky on pieni, on kerättävä enintään 30 000 solua, myös kuolleita soluja. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan kerätä minuutin kuluttua analyysin aloittamisesta.

$$Solun\ elinkyky = \frac{Elävien\ solujen\ määrä}{Kerättyjen\ solujen\ kokonaismäärä} \times$$

CV75-arvo (ks. 13 kohta), eli pitoisuus, jolla 75 prosenttia THP-1-soluista jää eloon (25 prosentin sytotoksisuus), lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttäen seuraavaa yhtälöä:

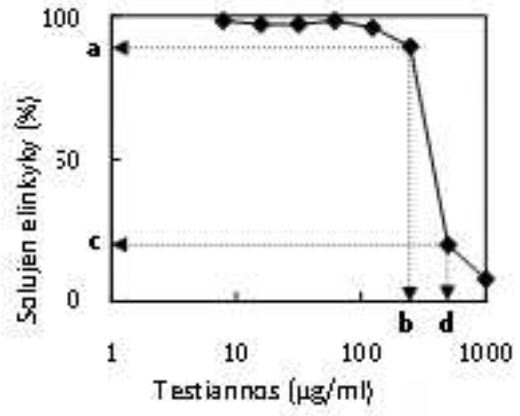
$$Log\ CV75 = \frac{(-c) \times Log(b) - (-a) \times Log(d)}{a - c}$$

Jossa:

a on solujen elinkyvyn minimiarvo, joka on enemmän kuin 75 prosenttia

c on solujen elinkyvyn maksimiarvo, joka on vähemmän kuin 75 prosenttia

b ja d ovat pitoisuudet, jotka osoittavat solujen elinkykyarvot a ja c.



CV75-arvon johtamisessa voidaan käyttää myös muita lähestymistapoja, kunhan voidaan osoittaa, ettei se vaikuta tuloksiin (esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita).

CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaaminen

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

20. Testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti asianmukaiseen liuottimeen/kantaja-aineeseen (suolaliuos, kasvatusliuos tai DMSO; ks. 14 kohta). Testikemikaalit laimennetaan ensin pitoisuuteen, joka vastaa 100-kertaisesti (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 500-kertaisesti (DMSO:n osalta) 1,2 × CV75 -arvoa, joka on määritetty *annoksenmääritystestissä* (ks. 19 kohta). Jos CV75-arvoa ei voida määrittää (ts. jos *annoksenmääritystestissä* ei havaita riittävää sytotoksisuutta), alkupitoisuutena on käytettävä testikemikaalin suurinta liukoista tai stabiilisti dispergoitua pitoisuutta, joka on valmistettu kullakin liuottimella/kantaja-aineella. Levyn loppupitoisuus saa kuitenkin olla enintään 5 000 µg/ml (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 1 000 µg/ml (DMSO:n yhteydessä). Sen jälkeen tehdään 1,2-kertaiset sarjalaimennokset käyttämällä asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta, jotta saadaan varastoliuokset (kahdeksan pitoisuutta välillä 100×1,2 × CV75 – 100×0,335 × CV75 (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai välillä 500×1,2 × CV75 – 500×0,335 × CV75 (DMSO:n yhteydessä)), jotka testataan h-CLAT-menetelmällä (ks. esimerkki annosteluohjeesta DB-ALM-protokollasta nro 158). Seuraavaksi varastoliuokset laimennetaan vielä 50-kertaiseksi (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 250-kertaiseksi (DMSO:n yhteydessä) kasvatusliuokseen (työliuokset). Näitä työliuoksia käytetään altistuksessa, ja levyllä käytetään lopullista laimennuskerrointa, joka on 2. Jos tulokset eivät täytä kohdassa 29 ja 30 kuvattuja hyväksymisperusteita solujen elinkyvyn osalta, *annoksenmääritystesti* voidaan toistaa, jotta CV75-arvo voidaan määrittää tarkemmin. CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittauksessa voidaan käyttää vain 24-kuoppaisia levyjä.

21. Liuotin-/kantaja-ainekontrolli valmistetaan 16 kohdassa kuvatulla tavalla. h-CLAT-menetelmässä käytettävä positiivinen kontrolli on DNCB (ks. 11 kohta), josta valmistetaan varastoliuokset DMSO:ssa. Ne laimennetaan 20 kohdassa varastoliuosten osalta kuvatun mukaisesti. *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa* DNCB:tä tulee käyttää positiivisena kontrollina yhtenä loppupitoisuutena levyllä (yleensä 4,0 µg/ml). Jotta DNCB:n pitoisuudeksi levylle saadaan 4,0 µg/ml, valmistetaan varastoliuos, joka sisältää 2 mg/ml DNCB:tä DMSO:ssa, ja tämä liuos laimennetaan 250-kertaiseksi kasvatusliuoksella siten, että lopputuloksena on työliuos, jonka pitoisuus on 8 µg/ml. Vaihtoehtoisesti positiivisen kontrollin pitoisuutena voidaan käyttää DNCB:n CV75-arvoa, joka määritetään jokaisessa testilaitoksessa. Myös muita sopivia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailukelpoiset ajon hyväksymisperusteet. Positiivisten kontrollien osalta levyn loppupitoisuus saa kuitenkin olla enintään 5 000 µg/ml (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 1 000 µg/ml (DMSO:n yhteydessä). Ajon hyväksymisperusteet ovat samat kuin testikemikaalille kuvatut (ks. 29 kohta), lukuun ottamatta viimeistä hyväksymisperustetta, sillä positiivinen kontrolli testataan yhtenä pitoisuutena.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

22. Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolliaineesta tarvitaan yksi koe, jotta saadaan ennuste. Jokainen koe koostuu vähintään kahdesta itsenäisestä ajosta, joissa mitataan *CD86:n/CD54:n ilmentymistä* (ks. 26–28 kohta). Kukin itsenäinen ajo tehdään eri päivänä tai samana päivänä, kunhan a) jokaiseen ajoon valmistetaan riippumattomat tuoreet varastoliuokset ja työliuokset testikemikaalista ja vasta-aineliuokset ja b) jokaisessa ajossa käytetään itsenäisiä kerättyjä soluja (ts. solut kerätään eri viljelypulloista), mutta solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta siirrostuksesta. Testikemikaaleista ja kontrolliaineista valmistettuihin työliuoksiin (500 µl) sekoitetaan 500 µl suspendoituja soluja ($1x10^6$ solua) suhteessa 1:1, ja soluja inkuboidaan 24±0,5 h, kuten 20 ja 21 kohdassa on selostettu. Jokaisessa ajossa riittää yksi rinnakkaisnäyte testikemikaalin ja kontrolliaineen kustakin pitoisuudesta, koska ennuste tehdään vähintään kahden itsenäisen ajon perusteella.

Solujen värjäys ja analyysi

23. Altistuksen (24±0,5 h) jälkeen solut siirretään 24-kuoppaiselta levyltä näyteputkiin ja kerätään sentrifugoimalla. Sen jälkeen ne pestään kahdesti 1 ml:llä värjäyspuskuria (tarvittaessa pesukertoja voidaan lisätä). Pesun jälkeen solut estetään 600 µl:lla estoliuosta (värjäyspuskuri, joka sisältää 0,01 prosenttia (w/v) globuliinia (Cohn-fraktio II, III, ihminen; SIGMA, nro G2388-10G tai vastaava)) ja inkuboidaan 4°C:ssa 15 minuutin ajan. Estämisen jälkeen solut jaetaan kolmeen 180 µl:n alikvoottiin 96-kuoppaiselle pyöreäpohjaiselle levylle tai mikroputkeen.

24. Sentrifugoinnin jälkeen solut värjätään 50 µl:lla FITC-leimattua anti-CD86:ta, anti-CD54:ää tai hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla 4°C:ssa 30 minuutin ajan. h-CLAT-menetelmän DB-ALM-protokollassa nro 158 (18) kuvattuja vasta-aineita on käytettävä laimentamalla ne suhteeseen 3:25 v/v (CD86 (BD-PharMingen, nro 5556 57; klooni: Fun-1)) tai suhteeseen 3:50 v/v (CD54 (DAKO, nro F7143; klooni: 6.5B5) ja IgG1 (DAKO, nro X0927)) värjäyspuskurilla.Testin

kehittäjät ovat määrittäneet nämä vasta-aineiden laimennuskertoimet sellaisiksi, että ne tuottavat parhaan signaali-kohinasuhteen. Testin kehittäjien kokemuksen perusteella vasta-aineiden fluoresenssin intensiteetti on yleensä yhdenmukainen erien välillä. Käyttäjät voivat kuitenkin määrittää parhaat käyttöpitoisuudet titraamalla vasta-aineet omissa laboratorio-olosuhteissaan tarvittaessa. Muita fluorokromilla leimattuja anti-CD86- ja/tai anti-CD54-vasta-aineita voidaan käyttää, jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia kuin FITC-konjugoidut vasta-aineet, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. On huomattava, että h-CLAT-menetelmän DB-ALM-protokollassa 158 (18) kuvatun kloonin tai vasta-aineen toimittajan vaihtaminen voi vaikuttaa tuloksiin. Kun solut on pesty vähintään kaksi kertaa 150 µl:lla värjäyspuskuria, ne resuspendoidaan värjäyspuskuriin (esim. 400 µl), ja siihen lisätään PI-liuosta (esim. 20 µl, jotta saadaan loppupitoisuus 0,625 µg/ml) tai muuta sytotoksisuuden merkkiaineliuosta (ks. 18 kohta). CD86:n ja CD54:n ilmentymistasot sekä solujen elinkyky analysoidaan virtaussytometrin avulla.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

25. CD86:n ja CD54:n ilmentyminen analysoidaan virtaussytometrilla kanavalla FL-1. Fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon (MFI) perusteella lasketaan CD86:n ja CD54:n suhteellinen fluoresenssin intensiteetti (RFI) positiivisen kontrollin (ctrl) solujen ja kemikaalilla käsiteltyjen solujen osalta seuraavalla yhtälöllä:

$$RFI = \frac{\textit{kemikaalilla käsitellyn solun MFI} - \textit{kemikaalilla käsitellyn isotooppikontrollisolujen MFI}}{\textit{liuotin/tai kantaja} - \textit{ainekäs} - \textit{kontr.solujen MFI} - \textit{liuotin/tai kantaja} - \textit{ainekäs. isotooppikontr.sol.MFI}} \times$$

Myös solujen elinkyky - isotyyppikontrollin (ctrl) soluista (jotka on värjätty hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla) lasketaan 19 kohdassa kuvatulla yhtälöllä.

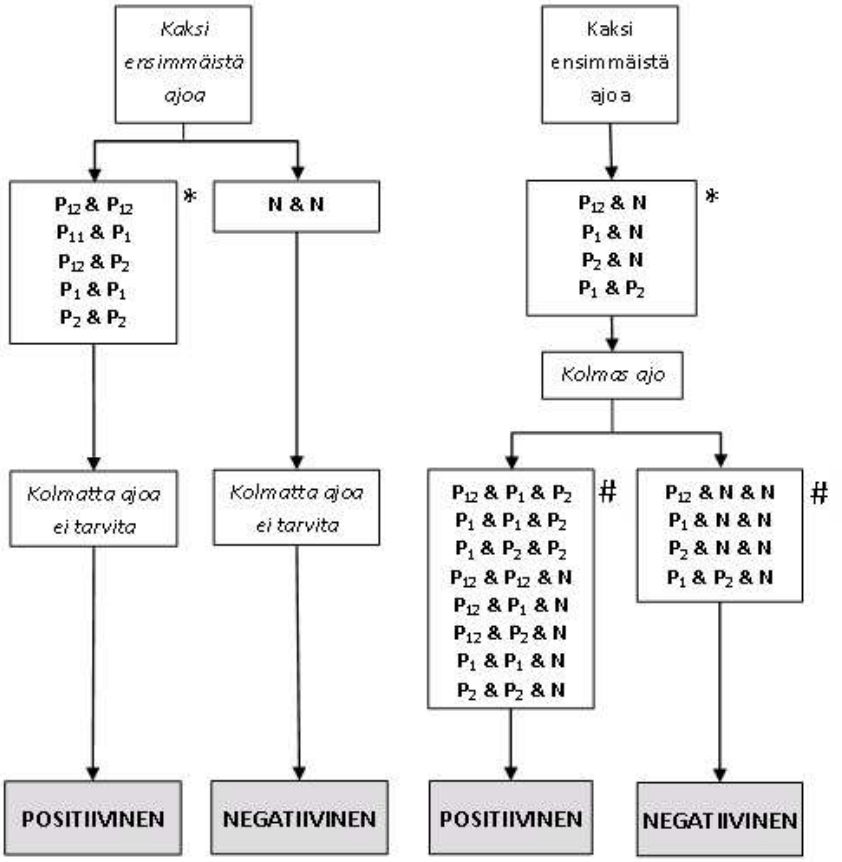
Ennustemalli

26. *CD86:n/CD54:n* ilmentymisen mittaamisessa jokainen testikemikaali testataan vähintään kahdessa itsenäisessä ajossa, jotta saadaan yksi ennuste (POSITIIVINEN tai NEGATIIVINEN). h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN, jos vähintään yksi seuraavista ehdoista täyttyy joko kummassakin kahdesta ajosta tai vähintään kahdessa kolmesta itsenäisestä ajosta. Muussa tapauksessa h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN (kuvio 1):

— CD86:n RFI on yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia millä tahansa testatulla pitoisuudella (kun solujen elinkyky on ≥ 50 %).

— CD54:n RFI on yhtä suuri tai suurempi kuin 200 prosenttia millä tahansa testatulla pitoisuudella (kun solujen elinkyky on ≥ 50 %).

27. Tämän perusteella on siis niin, että jos ensimmäiset kaksi ajoa antavat kumpainenkin positiivisen tuloksen CD86:lle ja/tai CD54:lle, h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä. Vastaavasti jos ensimmäiset kaksi ajoa antavat negatiivisen tuloksen kummankin merkkiaineen osalta, h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN (30 kohdan määräykset asianmukaisesti huomioon ottaen) eikä kolmatta ajoa tarvita. Jos ensimmäiset kaksi ajoa eivät kuitenkaan ole johdonmukaisia vähintään jommankumman merkkiaineen osalta (CD54 tai CD86), on tehtävä kolmas ajo ja lopullinen ennuste perustuu siihen, mikä on kolmen itsenäisen ajon enemmistötulos (eli kaksi ajoa kolmesta). Tältä osin on todettava, että jos tehdään kaksi itsenäistä ajoa ja toinen antaa positiivisen tuloksen vain CD86:lle (jäljempänä P_1) ja toinen antaa positiivisen tuloksen vain CD54:lle (jäljempänä P_2), on tehtävä kolmas ajo. Jos kolmas ajo antaa negatiivisen tuloksen kummallekin merkkiaineelle (jäljempänä N), h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN. Toisaalta jos kolmas ajo antaa positiivisen tuloksen jommallekummalle merkkiaineelle (P_1 tai P_2) tai kummallekin merkkiaineelle (jäljempänä P_{12}), h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN.



Kuva 1: h-CLAT-menetelmässä käytetty ennustemalli. h-CLAT-ennustetta pitää tarkastella IATAn ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohtien määräysten valossa.

P_1: ajon tulos: vain CD86 positiivinen; P_2: ajon tulos: vain CD54 positiivinen; P_{12}: ajon tulos: sekä CD86 että CD54 positiivinen; N: ajon tulos: sekä CD86 että CD54 negatiivinen.

* Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät ensimmäisen kahden ajon tuloksista riippumatta järjestyksestä, jossa ne on voitu saada.

Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät kolmen ajon tuloksista ensimmäisestä kahdesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella. Nämäkään eivät kuvasta sitä järjestystä, jossa ne on voitu saada.

28. Niille testikemikaaleille, joiden on ennustettu olevan POSITIIVISIA h-CLAT-menetelmällä, voidaan haluttaessa määrittää kaksi vaikuttavaa pitoisuutta (EC) (EC150-arvo CD86:lle ja EC200-arvo CD54:lle). Tämä on siis se pitoisuus, jolla testikemikaalit indusoivat RFI-arvon 150 tai 200. Näistä EC-arvoista voi olla apua myös herkistyspotentiaalin (9) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa (4) (5) (6) (7) (8). Ne voidaan laskea seuraavilla yhtälöillä:

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

jossa

A_{pit} on pienin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun RFI > 150 (CD86) tai 200 (CD54)

B_{pit} on suurin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun RFI < 150 (CD86) tai 200 (CD54)

A_{RFI} on RFI pienimmällä pitoisuudella, kun RFI > 150 (CD86) tai 200 (CD54)

B_{RFI} on RFI suurimmalla pitoisuudella, kun RFI < 150 (CD86) tai 200 (CD54)

Jos halutaan tarkemmat EC150- ja EC200-arvot, *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa* voidaan tarvita kolme itsenäistä ajoa. Lopulliset EC150- ja EC200-arvot määritetään kolmesta itsenäisestä ajosta laskettujen EC-arvon mediaaniksi. Jos vain kaksi kolmesta itsenäisestä ajosta täyttää positiivisen tuloksen kriteerit (ks. 26 ja 27 kohta), kahdesta lasketusta EC150- tai EC200-arvoista hyväksytään suurempi arvo.

Hyväksymisperusteet

29. Seuraavien hyväksymisperusteiden on täytyttävä h-CLAT-menetelmää käytettäessä (22) (27).

— Kasvatusliuos- ja liuotin-/kantaja-ainekontrollien solujen elinkyvyn pitää olla suurempi kuin 90 prosenttia.

— Liuotin-/kantaja-ainekontrollissa sekä CD86:n että CD54:n RFI-arvot eivät saa ylittää positiivisen tuloksen kriteerejä (CD86:n RFI ≥ 150 % ja CD54:n RFI ≥ 200 %). Liuotin-/kantaja-ainekontrollin RFI-arvot lasketaan käyttämällä 25 kohdassa kuvattua yhtälöä (”kemikaalin MFI” on korvattava ”liuottimen/kantaja-aineen MFI:llä” ja ”liuottimen/kantaja-aineen MFI” on korvattava ”(kasvatusliuos)kontrollin MFI:llä”).

— Sekä kasvatusliuos- että liuotin-/kantaja-ainekontrolleissa CD86:n ja CD54:n MFI:n suhteessa isotyyppikontrolliin on oltava > 105 %.

— Positiivisessa kontrollissa (DNCB) sekä CD86:n että CD54:n RFI-arvojen on täytettävä positiivisen tuloksen kriteerit (CD86:n RFI ≥ 150 ja CD54:n RFI ≥ 200), ja solujen elinkyvyn on oltava yli 50 %.

— Testikemikaalin osalta solujen elinkyvyn on oltava yli 50 prosenttia vähintään neljässä testatusta pitoisuudesta jokaisessa ajossa.

30. Negatiiviset tulokset hyväksytään vain sellaisista testikemikaaleista, joiden yhteydessä solujen elinkyky on alle 90 prosenttia suurimmalla testatulla pitoisuudella (ts. 1,2 × CV75 20 kohdassa kuvatun sarjalaimennoksen mukaisesti). Jos solujen elinkyky on kaavalla 1,2 × CV75 yhtä kuin tai suurempi kuin 90 prosenttia, negatiivinen tulos on hylättävä. Tässä tapauksessa on suositeltavaa yrittää täsmentää annoksen valintaa toistamalla CV75-määritys. On kuitenkin muistettava, että kun testikemikaalin enimmäispitoisuutena testissä käytetään pitoisuutta 5 000 µg/ml suolaliuoksessa (tai kasvatusliuoksessa tai muissa liuottimissa/kantaja-aineissa), pitoisuutta 1 000 µg/ml DMSO:ssa tai suurinta liukoista pitoisuutta, negatiivinen tulos on hyväksyttävä, vaikka solujen elinkyky on yli 90 prosenttia.

Testiraportti

31. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, Log Kow, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, Log K_{ow}, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksymisperusteista.

Negatiivinen ja liuotin-/kantaja-ainekontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testistä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— käytetty virtaussytometri (esim. malli), myös laiteasetukset sekä tiedot globuliinista, vasta-aineista ja sytotoksisuuden merkkiaineista, joita testissä käytettiin

— menettely, jolla osoitettiin laboratorion pätevyys testin tekemisessä testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, ja menettely, jolla osoitettiin testin suorituskyvyn toistettavuus pidemmällä aikavälillä, esim. aikaisemmat kontrollitiedot ja/tai aikaisempien reaktiivisuustestien tiedot.

Testin hyväksymisperusteet

— solujen elinkyky sekä liuotin-/kantaja-ainekontrollista saadut MFI- ja RFI-arvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky sekä positiivisesta kontrollista saadut RFI-arvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky kaikilla testatun kemikaalin testatuilla pitoisuuksilla.

Testimenettely

— tehtyjen ajojen lukumäärä

— testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— tietojen taulukointi: CV75 (tarvittaessa), yksittäiset geometriset MFI-, RFI- ja solujen elinkykyarvot, EC150/EC200-arvot (tarvittaessa) testikemikaalista ja positiivisesta kontrollista jokaisesta ajosta ja tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin perusteella

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— h-CLAt-menetelmällä saatujen tulosten tarkastelu

— testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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. Saatavana osoitteessa 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). Saatavana osoitteessa 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 Saatavana osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599–609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683–1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81–88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23. Saatavana osoitteessa 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. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa 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.

Lisäys 1.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (22).

Kemikaali: Aine tai seos.

CV75: Arvioitu pitoisuus, jolla solujen elinkyky on 75 prosenttia.

EC150: Pitoisuudet, joilla CD86:n ilmentymisen RFI-arvo on 150.

EC200: Pitoisuudet, joilla CD54:n ilmentymisen RFI-arvo on 200.

Virtaussytometria: Sytometrinen tekniikka, jossa nesteeseen suspendoidut solut virtaavat yksi kerrallaan niihin kohdistetun valon läpi, ja valo sirottuu soluille ja niiden osille ominaisella tavalla. Solut usein leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin valo ensin absorboituu ja sen jälkeen emittoituu muuttuneilla taajuuksilla.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment), yhdennetty lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin: Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Kasvatusliuoskontrolli: Käsittelemätön rinnakkaisnäyte, joka sisältää kaikki testijärjestelmän osat. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, vaikuttaako liuotin/kantaja-aine testijärjestelmään.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

Positiivinen kontrolli: Rinnakkaisnäyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Suhteellinen fluoresenssin intensiteetti (RFI): Kemikaaleilla käsiteltyjen solujen fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon suhteelliset arvot verrattuna liuottimella/kantaja-aineella käsiteltyjen solujen MFI-arvoon.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja halutun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (21).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (21).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (21).

Värjäyspuskuri: Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka sisältää 0,1 prosenttia naudan seerumin albumiinia.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen/kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (21).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (myös työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (23).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testi: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (21).

Lisäys 1.2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen h-CLAT-ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla CV75-, EC150- ja EC200-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaroihin. Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu h-CLAT-menetelmällä. Myös h-CLAT-menetelmästä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (3) (14).

Taulukko 1

Suositellut aineet h-CLAT-menetelmää koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste [1]	CV75-viitealue yksikössä µg/ml [2]	h-CLAT-tulokset CD86:n osalta (EC150-viitealue yksikössä µg/ml) [2]	h-CLAT-tulokset CD54:n osalta (EC200-viitealue yksikössä µg/ml) [2]
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	2–12	Positiivinen (0,5–10)	Positiivinen 0,5-15
4-fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	5–95	Positiivinen (<40)	Negatiivinen (>1,5) [3]
Nikkelisulfaatti	10101-97-0	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	30–500	Positiivinen (<100)	Positiivinen (10–100)
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	30–400	Negatiivinen (>10) [3]	Positiivinen (10–140)
R(+)-limoneeni	5989-27-5	Neste	Herkistävä (heikko)	>20	Negatiivinen (>5) [3]	Positiivinen (<250)
Imidatsolidinyyliurea	39236-46-9	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	25–100	Positiivinen (20–90)	Positiivinen (20–75)
Isopropanoli	67-63-0	Neste	Herkistämätön	>5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
Glyseroli	56-81-5	Neste	Herkistämätön	>5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
Maitohappo	50-21-5	Neste	Herkistämätön	1 500–5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
4-aminobentsoehappo	150-13-0	Kiinteä	Herkistämätön	>1 000	Negatiivinen (>1 000)	Negatiivinen (>1 000)

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (3) (14). *In vivo* -vaikutuskyky johdetaan ECETOCin ehdottamien kriteerien pohjalta (24).

(2) Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (13) (25).

(3) Aikaisemmin suurin osa negatiivista tuloksista on saatu tälle merkkiaineelle, ja sen takia negatiivinen tulos on odotuksenmukaisin. Esitetty alue määriteltiin muutaman aikaisemmin saadun positiivisen tuloksen perusteella. Jos saadaan positiivinen tulos, EC-arvon on oltava ilmoitetulla viitealueella.

Lisäys 2

IN VITRO -IHOHERKISTYS: U937-SOLULINJAAN PERUSTUVA AKTIVOINTITESTI (U-SENS™)

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. U-SENS™-testissä kvantifioidaan muutokset sellaisen solun pintamerkkiaineen ilmentymisessä, joka liittyy monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumisprosessiin (ts. CD86), ihmisen histiosyyttisessa lymfoomasolulinjassa U937 herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1). Sen jälkeen solulinjassa U937 CD86-pintamerkkiaineen mitattuja ilmentymistasoja käytetään tukemaan ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua.

2. U-SENS™-testi on arvioitu L'Orealin koordinoimassa validointitutkimuksessa (2) ja sen jälkeen tehdyssä riippumattomassa vertaisarvioinnissa, jonka teki Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorion (EURL ECVAM) tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) (3). Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella EURL ECVAM suositteli (4), että U-SENS™-testiä käytetään IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Ohjeasiakirjassaan, joka koskee ihon herkistymiseen liittyvien IATAn osana käytettyjen tietojen integrointia ja yksittäisiä tiedonlähteitä koskevien jäsenneltyjen lähestymistapojen raportointia, OECD käsittelee lukuisia tapausselostuksia, joissa kuvataan erilaisia testausstrategioita ja ennustemalleja. Yksi erilaisista määritetyistä lähestymistavoista on U-SENS-testi (5). Esimerkkejä U-SENS™-testillä saatujen tietojen käytöstä muiden tietojen, myös aikaisempien tietojen ja olemassa olevien validien ihmistä koskevien tietojen (6) kanssa, on raportoitu myös muualla kirjallisuudessa (4) (5) (7).

3. On osoitettu, että U-SENS™-testi on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelytekniikoista ja virtaussytometria-analyysista. Testistä odotettavien ennusteiden laboratorioiden sisäinen toistettavuus on 90 prosentin ja laboratorioiden välinen toistettavuus on 84 prosentin luokkaa (8). Validointitutkimuksesta (8) ja muista julkaistuista tutkimuksista (1) saadut tulokset osoittavat, että LLNA-testin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 86 prosenttia (N=166), herkkyys on 91 prosenttia (118/129) ja spesifisyys 65 prosenttia (24/37). Ihmisiä koskeviin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 77 prosenttia (N=101), herkkyys on 100 prosenttia (58/58) ja spesifisyys 47 prosenttia (20/43). LLNA-testiin verrattuna U-SENS™-testistä saatavat väärät negatiiviset ennusteet koskevat todennäköisemmin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on pieni tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (1) (8) (9). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että U-SENS™-testiä voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat U-SENS™-testin käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavilla olevien tietojen perusteella U-SENS™-testin osoitettiin olevan sovellettavissa testikemikaaleihin (myös kosmetiikan ainesosiin, kuten säilöntäaineisiin, pinta-aktiivisiin aineisiin, vaikuttaviin aineisiin ja väriaineisiin), jotka kattavat useita orgaanisia funktionaalisia ryhmiä ja fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, ihoherkistyspotentiaaleja (*in vivo* -tutkimuksissa määritetyn mukaisesti) ja monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden tiedetään liittyvän ihon herkistymiseen (kuten Michael-akseptorit, Schiffin emäksen muodostuminen, asyylin siirtoaine, bimolekulaarinen nukleofiilinen substituutio [SN2] tai nukleofiilinen aromaattinen substituutio [SNAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENS™-testi soveltuu testikemikaaleille, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (ts. kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai separoidu liuottimesta/kantaja-aineesta eri faaseihin) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa (ks. 13 kohta). U-SENS™-testillä ennustettiin oikein kemikaalit, jotka määritettiin aineistossa prehapteeneiksi (aineiksi, jotka hapetus aktivoi) tai prohapteeneiksi (aineiksi, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien välityksellä) (1) (10). Kalvojen toimintaa häiritsevät aineet voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia CD86:n epäspesifisen ilmentymisen lisääntymisen vuoksi, sillä kolme seitsemästä väärästä positiivisesta tuloksesta *in vivo* -vertailuokituksessa oli pinta-aktiivisia aineita (1). Sen vuoksi pinta-aktiivisia aineita koskeviin positiivisiin tuloksiin on syytä suhtautua varauksellisesti, kun taas niitä koskevia negatiivisia tuloksia voidaankäyttää

tukena testikemikaalin määrittämisessä herkistämättömäksi aineeksi. Fluoresoivia testikemikaaleja voidaan arvioida U-SENS™-testillä (1), mutta voimakkaasti fluoresoivat testikemikaalit, jotka emittoivat samalla aallonpituudella kuin fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) tai propidiumjodidi (PI), häiritsevät virtaussytometrista tutkimusta, eikä niitä siis voida arvioida oikein FITC-konjugoituja vasta-aineita (mahdolliset väärät negatiiviset tulokset) tai propidiumjodidia käyttämällä (solujen elinkyky ei mitattavissa). Tässä tapauksessa voidaan käyttää muita fluorokromilla leimattuja vasta-aineita tai muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kunhan voidaan osoittaa, että ne tuottavat samanlaiset tulokset kuin FITC-leimatut vasta-aineet tai propidiumjodidi (ks. 18 kohta) esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet (lisäys 2.2). Edellä esitetyn perusteella pinta-aktiivisia aineita koskevia positiivisia tuloksia ja voimakkaasti fluoresoivia testikemikaaleja koskevia negatiivisia tuloksia on tulkittava ilmoitettujen rajoitusten ja muiden tietolähteiden perusteella IATAn mukaisesti. Jos voidaan osoittaa, ettei U-SENS™-testi sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, sitä ei pidä käyttää niihin.

5. Kuten edellä on todettu, U-SENS™-testi auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten U-SENS™-testillä saatuja tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 2.1.

TESTIN PERIAATE

7. U-SENS™-testi on *in vitro* -testi, jolla kvantifioidaan solun pintamerkkiaineen CD86 ilmentymisen muutokset ihmisen histiosyyttisessä lymfoomasolulinjassa (U937-solut) 45±3 tunnin pituisen testikemikaalille altistuksen jälkeen. CD86-pintamerkkiaine on yksi tyypillinen U937-solujen aktivoitumisen merkkiaine. CD86:n tiedetään olevan stimuloiva molekyyli, joka voi jäljitellä monosyyttien aktivoitumista, millä on tärkeä tehtävä T-solujen erilaistumisessa. Solujen CD86-pintamerkkiaineiden ilmentymisen muutoksia mitataan virtaussytometrilla sen jälkeen, kun solut on ensin värjätty fluoreseiini-isotiosyanaatilla (FITC) leimatuilla vasta-aineilla. Samaan aikaan mitataan myös sytotoksisuus (käyttämällä esimerkiksi propidiumjodidia), jotta voidaan arvioida, tapahtuuko CD86-pintamerkkiaineen ilmentymisen ylössäätelyä (upregulation) sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla. CD86-pintamerkkiaineen stimulaatioindeksi (S.I.) liuotin-/kantaja-ainekontrolliin verrattuna lasketaan, ja sitä käytetään ennustemallina (ks. 19 kohta) tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemista.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

8. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2.2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla *in vitro* -menetelmiä koskevia hyviä käytäntöjä noudattaen (11). Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettävä tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 11 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 15 ja 16 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

9. Tämä testi perustuu eläinkokeiden vaihtoehtoisia menetelmiä koskevan U-SENS™-tietokantapalvelun (DB-ALM) protokollaan nro 183 (12). Vakiomenettelyjä (Standard Operating Procedures, SOP) pitää käyttää, kun laboratorio ottaa U-SENS™-testin käyttöön ja käyttää sitä. U-SENS™-testin tekemisessä voidaan käyttää automatisoitua järjestelmää, jos voidaan osoittaa, että se antaa samanlaiset tulokset, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 mainitut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Seuraavassa kuvataan U-SENS™-testin pääosat ja menettelyt.

Solujen valmistelu

10. U-SENS™-testissä on käytettävä ihmisen histiosyyttisistä lymfoomasoluista koostuvaa solulinjaa U937 (13). Solut (klooni CRL1593.2) on suositeltavaa hankkia korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection.

11. U937-soluja viljellään (olosuhteet: 37 °C, hiilidioksidipitoisuus 5 %, kosteutettu ilma) RPMI-1 640-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 prosenttia vasikkasikiön seerumia (FCS:ää), 2 mM L-glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä (valmis kasvatusliuos). U937-solut siirrostetaan rutiininomaisesti 2–3 päivän välein tiheyteen 1,5 tai 3 × 10^5 solua/ml. Solutiheys saa olla enintään 2 × 10^6 solua/ml, ja solujen elinkyvyn, joka mitataan trypaanisinisellä väriin perustuvalla poissulkemisella, tulee olla ≥ 90 prosenttia (tätä ei kuitenkaan sovelleta ensimmäiseen sulatuksen jälkeiseen siirrostukseen). Ennen testauksessa käyttämistä jokaisen solu-, FCS- tai vasta-aine-erän laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Solujen reaktiivisuustesti on tehtävä käyttämällä positiivista kontrollia eli pikryylisulfonihappoa (2,4,6-trinitrobentseeni-sulfonihappo: TNBS) (CAS-nro 2 508-19-2, puhtaus ≥ 99 %) ja negatiivista kontrollia eli maitohappoa (LA) (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %), vähintään viikon kuluttua sulatuksesta. Reaktiivisuustestissä on testattava kuusi loppupitoisuutta kummastakin kahdesta kontrollista (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75 ja 100µg/ml; maitohappo: 1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml). Valmiiseen kasvatusliuokseen liuenneen TNBS:n pitäisi tuottaa positiivinen ja pitoisuuteen liittyvä vaste CD86:sta (ts. kun positiivista pitoisuutta, CD86 S.I. ≥ 150, seuraa pitoisuus, jossa CD86 S.I suurenee), ja valmiiseen kasvatusliuokseen liuenneen maitohapon pitäisi tuottaa negatiivinen vaste CD86:sta (ks. 21 kohta). Testissä saa käyttää vain sellaista soluerää, joka läpäisi reaktiivisuustestin kaksi kertaa. Soluja voidaan kasvattaa enintään seitsemän viikkoa sulatuksen jälkeen. Siirrostuksia saa olla enintään 21. Reaktiivisuustesti on tehtävä 18–22 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

12. Testausta varten U937-solujen kylvötiheyden on oltava joko 3 × 10^5 solua/ml tai 6 × 10^5 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa joko kaksi päivää tai yksi päivä. Muita kuin edellä kuvattuja esiviljelyolosuhteita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut ja jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Testauspäivänä viljelypullosta otetut solut on resuspendoitava tuoreella kasvatusliuoksella tiheyteen 5 × 10^5 solua/ml. Sen jälkeen solut jaetaan 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle levylle (100 µl) (lopullinen solutiheys 0,5 × 10^5 solua/kuoppa).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

13. Liukoisuus arvioidaan ennen testausta. Sitä varten testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti pitoisuudella 50 mg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen ensimmäisenä liuotinvaihtoehtona tai dimetyylisulfoksidiin (DMSO, ≥, puhtaus 99 %) toisena liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona, jos testikemikaali ei liukene valmiista kasvatusliuoksesta koostuvaan liuottimeen/kantaja-aineeseen. Testauksessa testikemikaali liuotetaan loppupitoisuuteen 0,4 mg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen, jos kemikaali liukenee tähän liuottimeen/kantaja-aineeseen. Jos kemikaali liukenee ainoastaan DMSO:hon, kemikaali liuotetaan pitoisuudella 50 mg/ml. Muita kuin edellä mainittuja liuottimia/kantaja-aineita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut. Testikemikaalin stabiilisuus lopullisessa liuottimessa/kantaja-aineessa on otettava huomioon.

14. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. Koska annoksenmääritystestiä ei tehdä, ensimmäisessä ajossa tulee testata kuusi loppupitoisuutta (1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa, joka on joko valmis kasvatusliuos tai 0,4-prosenttinen DMSO-liuos. Seuraaviin ajoihin testikemikaaliliuoksista valmistetaan vähintään neljä työliuosta (ts. vähintään neljä pitoisuutta) käyttämällä kyseistä liuotinta/kantaja-ainetta ja aloittamalla 0,4 mg/ml -pitoisuudesta valmiissa kasvatusliuoksessa tai 50 mg/ml -pitoisuudesta DMSO:ssa. Työliuoksia käytetään käsittelyssä siten, että levyllä olevan työliuoksen tilavuuteen lisätään yhtä suuri tilavuus U937-solususpensiota (ks. 11 kohta edellä), jotta saadaan toinen kaksinkertainen laimennos (12). Mahdollisten seuraavien ajojen pitoisuudet (joita on oltava vähintään neljä) valitaan kaikkien aiempien ajojen yksittäisten tulosten perusteella (8). Käyttökelpoiset loppupitoisuudet ovat 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 ja 200 µg/ml. Suurin loppupitoisuus on 200 µg/ml. Jos CD86:sta saadaan positiivinenarvo

pitoisuudella 1 µg/ml, sen jälkeen testataan pitoisuus 0,1 µg/ml, jotta löydetään se pitoisuus testikemikaalista, jolla CD86:n arvo ei ylitä positiivisen tuloksen rajaa. Jokaisesta ajosta lasketaan EC150-arvo (pitoisuus, jolla kemikaali saavuttaa CD86:n osalta positiivisen rajan, joka on 150 prosenttia, ks. 19 kohta), jos CD86:sta havaitaan positiivinen pitoisuus-vaste. Jos testikemikaalin aiheuttama CD86:n positiivinen vaste ei liity pitoisuuteen, EC150-arvon laskeminen ei välttämättä ole oleellista, kuten U-SENS™ DB-ALM -protokollassa nro 183 on kuvattu (12). Jokaisesta ajosta lasketaan CV70-arvo (pitoisuus, jolla kemikaali saavuttaa sytotoksisuusrajan eli 70 prosenttia, ks. 19 kohta), mikäli mahdollista (12). Jotta voidaan tutkia CD86-arvon suurenemisen pitoisuus-vastevaikutus, kaikki pitoisuudet käyttökelpoisista pitoisuuksista on valittava tasaisesti EC150-arvon (tai CD86:n osalta suurimman negatiivisen ei-sytotoksisen pitoisuuden) ja CV70-arvon (tai suurimman sallitun pitoisuuden eli 200 µg/ml:n) väliltä. Yhdessä ajossa on testattava vähintään neljä pitoisuutta, joista ainakin kahden on oltava samoja kuin aiemmassa ajossa (aiemmissa ajoissa), jotta niitä voidaan vertailla.

15. U-SENS™-testissä käytettävä liuotin-/kantaja-ainekontrolli on valmis kasvatusliuos (valmiiseen kasvatusliuokseen liukenevat tai stabiilisti dispergoituvat testikemikaalit) (ks. 4 kohta) tai 0,4-prosenttinen DMSO valmiissa kasvatusliuoksessa (testikemikaalit, jotka liukenevat tai dispergoituvat stabiilisti DMSO:hon).

16. U-SENS™-testissä käytettävä positiivinen kontrolli on valmiiseen kasvatusliuokseen valmistettu TNBS (ks. 11 kohta). TNBS:ää on käytettävä positiivisena kontrollina CD86:n ilmentymisen mittaamisessa lopullisena pitoisuutena levyllä (50 µg/ml), ja sillä solujen elinkyvyn tulisi olla > 70 prosenttia. Jotta TNBS:n pitoisuudeksi levylle saadaan 50 µg/ml, valmistetaan 1 M:n (ts. 293 mg/ml) varastoliuos TNBS:ää valmiissa kasvatusliuoksessa, ja tämä liuos laimennetaan 2 930-kertaiseksi valmiilla kasvatusliuoksella siten, että lopputuloksena on työliuos, jonka pitoisuus on 100 µg/ml. Negatiivisena kontrollina on käytettävä maitohappoa (LA, CAS-nro 50-21-5) pitoisuudella 200 µg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen liuotettuna (0,4 mg/ml:n varastoliuoksesta). Jokaiselle levylle valmistetaan jokaisessa ajossa kolme rinnakkaisnäytettä kasvatusliuoksesta, joka toimii käsittelemättömänä kontrollina, liuotin-/kantaja-ainekontrollista sekä negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista (12). Muita sopivia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailuajon hyväksymisperusteet. Ajon hyväksymisperusteet ovat samat kuin testikemikaalin perusteet (ks. 12 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

17. Liuotin-/kantaja-ainekontrolli tai työliuokset (ks. 14–16 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 96-kuoppaisella tasapohjaisella levyllä (ks. 12 kohta). Käsitellyt levyt inkuboidaan 45±3 tuntia 37 °C:ssa (hiilidioksidipitoisuus 5 %). Ennen inkubointia levyt peitetään puoliläpäisevällä kalvolla, jotta vältetään haihtuvien testikemikaalien höyrystyminen ja testikemikaaleilla käsiteltyjen solujen ristikontaminaatio (12).

Solujen värjäys

18. Altistuksen (45±3 h) jälkeen solut siirretään V:n muotoiselle mikrotiitterilevylle ja kerätään sentrifugoimalla. Liukoisuuden häiriöt määritellään mikroskoopilla havaittavina kiteinä tai pisaroina 45 ± 3 tuntia käsittelyn jälkeen (ennen solujen värjäystä). Supernatantit hävitetään ja jäljellä olevat solut pestään kerran 100 µl:lla jääkylmää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS:ää), joka sisältää 5 prosenttia vasikkasikiön seerumia (värjäyspuskuria). Sentrifugoinnin jälkeen solut resuspendoidaan 100 µl:lla värjäyspuskuria ja värjätään 5 µl:lla (ts. 0,25 µg) FITC-leimattua anti-CD86:ta tai hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla 4 °C:ssa 30 minuutin ajan valolta suojattuna. U-SENS™ DB-ALM -protokollassa nro 183 (12) kuvattuja vasta-aineita on käytettävä (CD86: BD-PharMingen nro 5556 57, klooni: Fun-1, tai Caltag/Invitrogen nro MHCD8601, klooni: BU63; ja IgG1: BD-PharMingen nro 5557 48 tai Caltag/Invitrogen nro GM4992). Testin kehittäjien kokemuksen perusteella vasta-aineiden fluoresenssin intensiteetti on yleensä yhdenmukainen erien välillä. Testissä voidaan käyttää muita klooneja tai sellaisten vasta-aineiden tuottajia, jotka ovat läpäisseet reaktiivisuustestin (ks. 11 kohta). Käyttäjät voivat kuitenkin määrittää parhaan käyttöpitoisuuden titraamalla vasta-aineet omissa laboratorio-olosuhteissaan. Muita havaintojärjestelmiä, kuten fluorokromilla leimattuja anti-CD86-vasta-aineita, voidaan käyttää, jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia kuin FITC-konjugoidut vasta-aineet, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Sen jälkeen,kun

solut on pesty kahdesti 100 µl:lla värjäyspuskuria ja kerran 100 µl:lla jääkylmää PBS:ää, ne resuspendoidaan jääkylmällä PBS:llä (125 µl näytteille, jotka analysoidaan manuaalisesti putki kerrallaan, tai 50 µl, jos käytetään automaattista näytelevyä), ja siihen lisätään PI-liuosta (loppupitoisuus 3 µg/ml). Muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kuten 7-aminoaktinomysiini D:tä (7-AAD) ja trypaanisinistä tms., voidaan käyttää, jos vaihtoehtoisilla värjäysaineilla voidaan osoittaa saatavan samanlaisia tuloksia kuin PI-liuoksella, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet.

Virtaussytometria-analyysi

19. CD86:n ilmentymistaso ja solujen elinkyky analysoidaan virtaussytometrin avulla. Solut näkyvät kokoa (FSC) ja granulaarisuutta (SSC) ilmaisevina pistekaavioina (logaritminen asteikko), joiden avulla voidaan selvästi tunnistaa populaatio ensimmäisellä portilla (R1) ja eliminoida solujäte. Tavoitteena on saada yhteensä 10 000 solua porttiin R1 jokaisesta kuopasta. Saman R1-portin solut näytetään FL3- tai FL4-/SSC-pistekaaviona. Elinkykyiset solut rajataan toisella portilla (R2), jolla valitaan propidiumjodidin osalta negatiivisten solujen populaatio (FL3- tai FL4-kanava). Solujen elinkyky voidaan laskea seuraavalla sytometrianalyysiohjelman yhtälöllä. Jos solujen elinkyky on heikko, voidaan kerätä enintään 20 000 solua, myös kuolleita soluja. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan kerätä minuutin kuluttua analyysin aloittamisesta.

$$Solujen\ elinkyky = \frac{Elävien\ solujen\ määrä}{Kerättyjen\ solujen\ kokonaismäärä} \times 100$$

FL-1-positiivisten solujen prosentuaalinen osuus mitataan sen jälkeen näistä elinkykyisistä soluista R2-portilla (R1-portin sisällä). CD86:n ilmentyminen solujen pinnalla analysoidaan FL1-/SSC-pistekaaviolla, joka koskee portilla elinkykyisiä soluja (R2).

Kasvatusliuos-/IgG1-kuoppien osalta analyysin markkeri asetetaan lähelle pääpopulaatiota, jolloin kasvatusliuoskontrollien IgG1-arvon kohdealue on 0,6–0,9 prosenttia.

Väri-interferenssi määritetään FITC-leimatun IgG1-pistekaavion muutokseksi (IgG1 FL1:n geometrinen keskiarvo S.I. ≥ 150 %).

Kontrollisolujen (käsittelemättömät tai 0,4-prosenttinen DMSO) ja kemikaalilla käsiteltyjen solujen CD86:n stimulaatioindeksi (S.I.) lasketaan seuraavalla yhtälöllä:.

$$S.I. = \frac{CD86^{+}käsitellyt\ solut - \%\ of\ IgG1^{+}käsitellyt\ solut}{\%\ of\ CD86^{+}kontrollisolut - \%\ of\ IgG1^{+}kontrollisolut} \times 100$$

Käsittelemättömien $IgG1^{+}$-kontrollisolujen prosenttiosuus: Sillä tarkoitetaan analyysimarkkerilla määritettyjen FL1-positiivisten IgG1-solujen prosenttiosuutta (hyväksyttävä alue on välillä ≥ 0,6 ja < 1,5 prosenttia, ks. 22 kohta) elinkykyisistä käsittelemättömistä soluista.

$IgG1^{+}$-/$CD86^{+}$-kontrollisolujen / käsiteltyjen solujen prosenttiosuus: Sillä tarkoitetaan FL1-positiivisten IgG1-/CD86-solujen prosenttiosuutta, joka mitataan liikuttamatta analyysimarkkeria elinkykyisten kontrollisolujen / käsiteltyjen solujen seassa.

TIEDOT JA RAPORTOINTIi

Tietojen arviointi

20. U-SENS™-testissä lasketaan seuraavat parametrit: CV70-arvo (pitoisuus, joka osoittaa, että U937-soluista 70 prosenttia on elossa (sytotoksisuus 30 %)) ja EC150arvo (pitoisuus, jolla testikemikaalit ovat indusoineet CD86:n stimulaatioindeksiksi (S.I.) 150 prosenttia.

CV70 lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttämällä seuraavaa yhtälöä:

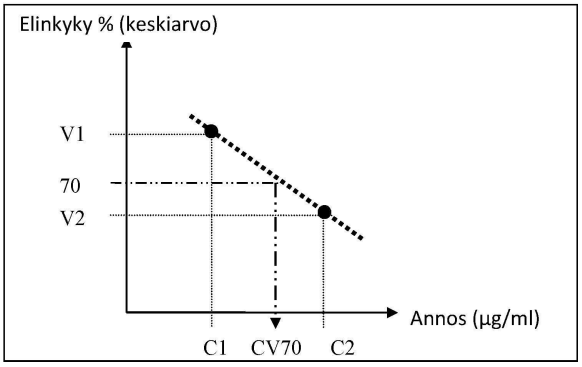
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

Jossa:

V1 on solujen elinkyvyn minimiarvo, joka on enemmän kuin 70 prosenttia

V2 on solujen elinkyvyn maksimiarvo, joka on vähemmän kuin 70 prosenttia

C1 ja C2 ovat pitoisuudet, jotka osoittavat solujen elinkykyarvot V1 ja V2.



CV70-arvon johtamisessa voidaan käyttää myös muita lähestymistapoja, kunhan voidaan osoittaa, ettei se vaikuta tuloksiin (esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita).

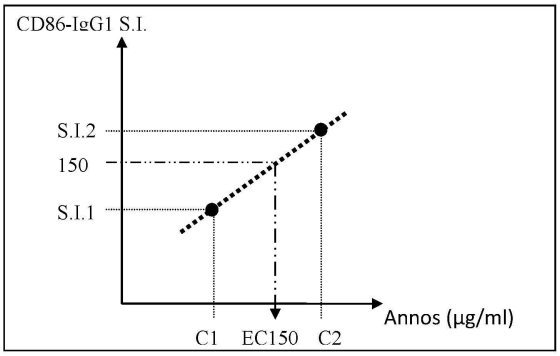
EC150 lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttämällä seuraavaa yhtälöä:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Jossa:

C1 on suurin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun CD86:n S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 on pienin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun CD86:n S.I.≥ 150 % (S.I. 2).



EC150- ja CV70-arvot lasketaan

— jokaisesta testiajosta: yksittäisiä EC150- ja CV70-arvoja käytetään työkaluina tutkittaessa CD86:n ilmentymisen lisääntymisen pitoisuus-vastevaikutusta (ks. 14 kohta)

— CV70-kokonaisarvo määritetään keskimääräisen elinkyvyn perusteella (12)

— EC150-kokonaisarvo määritetään CD86-arvojen keskimääräisen stimulaatioindeksin perusteella siitä testikemikaalista, joka U-SENS™-testissä määritetään POSITIIVISEKSI (ks. 21 kohta) (12).

Ennustemalli

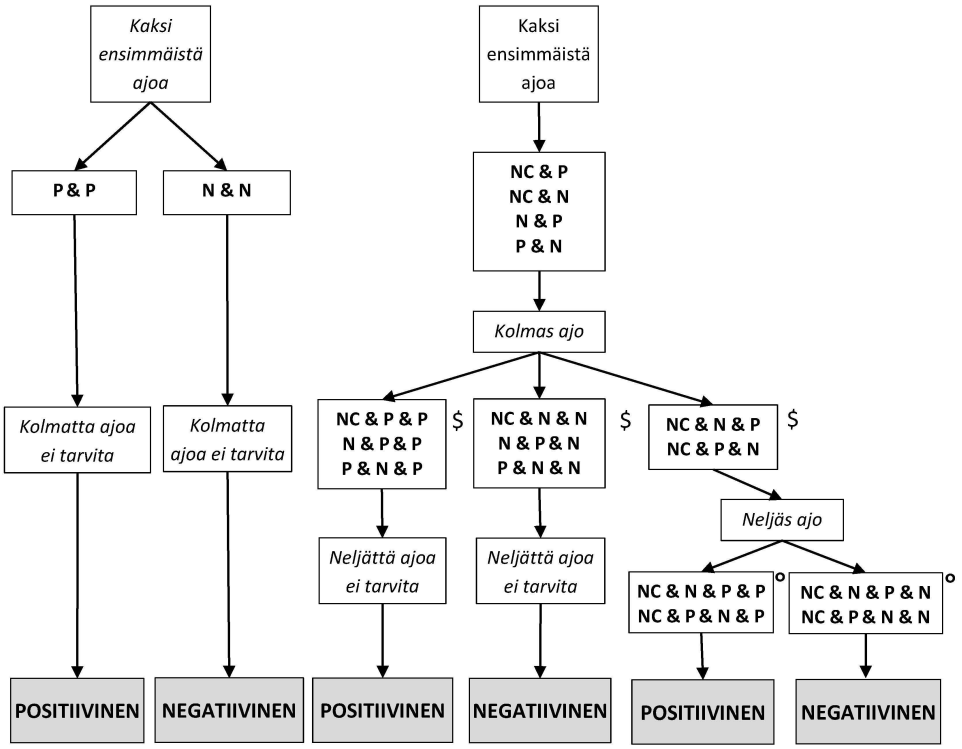
21. CD86:n ilmentymisen mittaamisessa jokainen testikemikaali testataan vähintään neljänä pitoisuutena ja vähintään kahdessa itsenäisessä ajossa (jotka tehdään eri päivinä), jotta saadaan yksi ennuste (NEGATIIVINEN tai POSITIIVINEN).

— U-SENS™-testiajon yksittäistä päätelmää pidetään negatiivisena (jäljempänä N), jos CD86:n stimulaatioindeksi on alle 150 prosenttia kaikilla ei-sytotoksisilla pitoisuuksilla (solujen elinkyky ≥ 70 %) ja jos interferenssiä ei havaita (sytotoksisuus, liukoisuus: ks. 18 kohta, tai väri: ks. 19 kohta, riippumatta niistä ei-sytotoksisista pitoisuuksista, joilla interferenssiä havaitaan). Kaikissa muissa tapauksissa: U-SENS™-testiajon yksittäistä päätelmää pidetään positiivisena (jäljempänä P), jos CD86:n stimulaatioindeksi on yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia ja/tai interferenssiä on havaittu.

— U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN, jos vähintään kaksi itsenäistä ajoa ovat negatiivisia (N) (kuva 1). Jos ensimmäiset kaksi ajoa ovat kumpikin negatiivisia (N), U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä.

— U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN, jos vähintään kaksi itsenäistä ajoa ovat positiivisia (P) (kuva 1). Jos ensimmäiset kaksi ajoa ovat kumpikin positiivisia (P), U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä.

— Koska annoksenmääritystestiä ei tehdä, poikkeus on se, jos CD86:n stimulaatioindeksi on ensimmäisessä ajossa yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia vain suurimmalla ei-sytotoksisella pitoisuudella. Tällöin testiajon katsotaan olevan EPÄSELVÄ (ES), ja lisätestiajoissa on testattava lisää pitoisuuksia (suurimman ei-sytotoksisen pitoisuuden ja pienimmän sytotoksisen pitoisuuden väliltä, ks. 20 kohta). Jos testiajon tulos on epäselvä, on tehtävä vähintään kaksi lisätestiajoa. Jos toisen ja kolmannen ajon tulokset ovat epäyhtenäiset (N ja/tai P riippumattomasti), on tehtävä vielä neljäs ajo (kuva 1). Näiden seuranta-ajojen katsotaan olevan positiivisia, jos vain yhdellä ei-sytotoksisella pitoisuudella CD86-arvoksi saadaan yhtä kuin tai enemmän kuin 150 prosenttia, koska pitoisuuden määrittämistä on mukautettu tietylle testikemikaalille. Lopullinen ennuste perustuu siihen, mikä on kolmen tai neljän itsenäisen testiajon enemmistötulos (ts. kaksi kolmesta tai kaksi neljästä) (kuva 1).



Kuva 1: U-SENS™-testissä käytetty ennustemalli. U-SENS™-ennustetta pitää tarkastella IATAn sekä 4 kohdan ja yleisjohdannon kohtien 7, 8 ja 9 määräysten valossa.

N: Testiajo, jossa ei ole havaittu CD86:n positiivisuutta tai interferenssiä.

P: Testiajo, jossa on havaittu CD86:n positiivisuutta ja/tai interferenssiä (interferenssejä).

ES: Epäselvä. Ensimmäisen ajon tulos on epäselvä, kun CD86 on positiivinen vain suurimmalla ei-sytotoksisella pitoisuudella.

#: Vain ensimmäiseen ajoon liittyvä yksittäinen epäselvä päätelmä johtaa automaattisesti siihen, että on tehtävä kolmas ajo, jotta saadaan aikaan enemmistö positiivisista (P) tai negatiivisista (N) päätelmistä vähintään kahdessa kolmesta itsenäisestä päätöksestä.

$: Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät kolmen ajon tuloksista ensimmäisestä kahdesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella.

°: Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät neljän ajon tuloksista ensimmäisestä kolmesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella.

Hyväksymisperusteet

22. Seuraavien hyväksymisperusteiden on täytyttävä U-SENS™-testiä käytettäessä (12).

— Altistusajan (45±3 h) päättyessä käsittelemättömien U937-solujen keskimääräinen elinkyky kolmessa rinnakkaisnäytteessä on oltava > 90 prosenttia, eikä CD86:n ilmentymisessä saa näkyä muutosta. Käsittelemättömien U937-solujen CD86:n perusilmentymisen on oltava välillä ≥ 2 ja ≤ 25 prosenttia.

— Jos liuottimena käytetään DMSO:ta, DMSO-kantaja-ainekontrollin validiteetti arvioidaan laskemalla DMSO:lla aikaansaatu stimulaatioindeksi verrattuna käsittelemättömiin soluihin, ja kolmen rinnakkaisnäytteen solujen keskimääräisen elinkyvyn on oltava > 90 prosenttia. DMSO-kantaja-ainekontrolli on validi, jos sen kolmen rinnakkaisnäytteen CD86:n stimulaatioindeksin keskiarvo on alle 250 prosenttia käsittelemättömien U937-solujen kolmen rinnakkaisnäytteen CD86:n stimulaatioindeksin keskiarvosta.

— Testiajoja pidetään valideina, jos vähintään kaksi kolmesta käsittelemättömien U937-solujen IgG1-arvosta on välillä ≥ 0,6 ja < 1,5 prosenttia.

— Samaan aikaan testattua negatiivista kontrollia (maitohappo) pidetään validina, jos vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä on negatiivisia (CD86:n stimulaatioindeksi < 150 prosenttia) ja ei-sytotoksisia (solujen elinkyky ≥ 70 prosenttia).

— Positiivista kontrollia (TNBS) pidetään validina, jos vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä on positiivisia (CD86:n stimulaatioindeksi ≥ 150 prosenttia) ja ei-sytotoksisia (solujen elinkyky ≥ 70 prosenttia).

Testiraportti

23. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, liukoisuus kasvatusliuokseen, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, liukoisuus kasvatusliuokseen, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksymisperusteista.

Negatiivinen ja liuotin-/kantaja-ainekontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testausolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testistä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— käytetty virtaussytometri (esim. malli), myös laiteasetukset sekä tiedot käytetyistä vasta-aineista ja sytotoksisuuden merkkiaineesta

— menettely, jolla osoitettiin laboratorion pätevyys testin tekemisessä testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, ja menettely, jolla osoitettiin testin suorituskyvyn toistettavuus pidemmällä aikavälillä, esim. aikaisemmat kontrollitiedot ja/tai aikaisempien reaktiivisuustestien tiedot.

Testin hyväksymisperusteet

— solujen elinkyky sekä liuotin-/kantaja-ainekontrollista saadut CD86:n stimulaatioindeksiarvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky sekä positiivisesta kontrollista saadut stimulaatioindeksiarvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky kaikilla testatun kemikaalin testatuilla pitoisuuksilla.

Testimenettely

— tehtyjen ajojen lukumäärä

— testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— altistusaika

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— tietojen taulukointi: CV70 (tarvittaessa), stimulaatioindeksiarvot, solujen elinkykyarvot, EC150-arvot (tarvittaessa) testikemikaalista ja positiivisesta kontrollista jokaisesta ajosta, ja tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin perusteella

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— U-SENS™-testillä saatujen tulosten tarkastelu

— testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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. Saatavana osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Saatavana osoitteessa [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa [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. Saatavana osoitteessa 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™), s. 33. Saatavana osoitteessa [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. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (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. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Lisäys 2.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (15).

CD86:n pitoisuus-vaste: Pitoisuudesta riippuvaisuudella (tai pitoisuus-vasteella) tarkoitetaan sitä, kun positiivista pitoisuutta (CD86 S.I. ≥ 150) seuraa pitoisuus, joka suurentaa CD 86:n stimulaatioindeksiä.

Kemikaali: Aine tai seos.

CV70: Arvioitu pitoisuus, jolla solujen elinkyky on 70 prosenttia.

Muutos: Muutoksesta on kyse silloin, kun i) käsittelemättömän kontrollirinnakkaisnäytteen 3 korjattu %$CD86^+$-arvo on alle 50 prosenttia käsittelemättömien kontrollirinnakkaisnäytteiden 1 ja 2 keskimääräisestä korjatusta %$CD86^+$-arvosta, ja ii) negatiivisen kontrollirinnakkaisnäytteen 3 korjattu %$CD86^+$-arvo on alle 50 prosenttia negatiivisten kontrollirinnakkaisnäytteiden 1 ja 2 keskimääräisestä korjatusta %$CD86^+$-arvosta.

EC150: Arvioidut pitoisuudet, joilla CD86:n ilmentymisen stimulaatioindeksi on 150 prosenttia.

Virtaussytometria: Sytometrinen tekniikka, jossa nesteeseen suspendoidut solut virtaavat yksi kerrallaan niihin kohdistetun valon läpi, ja valo sirottuu soluille ja niiden osille ominaisella tavalla. Solut usein leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin valo ensin absorboituu ja sen jälkeen emittoituu muuttuneilla taajuuksilla.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

Positiivinen kontrolli: Rinnakkaisnäyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation, kuten hapetuksen, jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja halutun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (14).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (14).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (14).

S.I.: Stimulaatioindeksi. Kemikaaleilla käsiteltyjen solujen fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon suhteelliset arvot verrattuna liuottimella käsiteltyjen solujen arvoihin.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (14).

Värjäyspuskuri: Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka sisältää 5 prosenttia vasikkasikiön seerumia.

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testillä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (esimerkiksi työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (16).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testi: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (14).

Lisäys 2.2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen U-SENS™-ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla CV70- ja EC150-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaroihin. Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu U-SENS™-testillä. Myös U-SENS™-testistä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (1) (8).

Taulukko 1

Suositellut aineet U-SENS™-testiä koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste [1]	U-SENS Liuotin/kantaja-aine	U-SENS CV70: viitealue yksikössä µg/ml [2]	U-SENS EC150-viitealue yksikössä µg/ml [2]
4-fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Kasvatusliuos [3]	<30	Positiivinen (≤10)
Pikryylisulfonihappo	2508-19-2	Neste	Herkistävä (voimakas)	Kasvatusliuos	>50	Positiivinen (≤50)
Dietyylimaleaatti	141-05-9	Neste	Herkistävä (kohtalainen)	DMSO	10-100	Positiivinen (≤20)
Resorsinoli	108-46-3	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Kasvatusliuos	>100	Positiivinen (≤50)
Kanelialkoholi	104-54-1	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	DMSO	>100	Positiivinen (10–100)
4-allyylianisoli	140-67-0	Neste	Herkistävä (heikko)	DMSO	>100	Positiivinen (<200)
Sakariini	81-07-2	Kiinteä	Herkistämätön	DMSO	>200	Negatiivinen (>200)
Glyseroli	56-81-5	Neste	Herkistämätön	Kasvatusliuos	>200	Negatiivinen (>200)
Maitohappo	50-21-5	Neste	Herkistämätön	Kasvatusliuos	>200	Negatiivinen (>200)
Salisyylihappo	69-72-7	Kiinteä	Herkistämätön	DMSO	>200	Negatiivinen (>200)

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

([1]) *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (1) (8). In vivo -vaikutuskyky johdetaan ECETOCin ehdottamien kriteerien pohjalta (17).

([2]) Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (1) (8).

([3]) Kasvatusliuos: RPMI-1640-kasvatusliuos, johon on lisätty 10 % vasikkasikiön seerumia, 2 mM L-glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä (8).

Lisäys 3

IN VITRO -IHOHERKISTYS: IL-8 LUC -TESTI

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. Toisin kuin testeissä, joissa analysoidaan solun pintamerkkiaineiden ilmentymistä, IL8 Luc -testissä kvantifioidaan muutoksia IL-8:n ilmentymisessä. IL-8 on dendriittisolujen aktivoitumiseen liittyvä sytokiini. THP-1-soluista johdetussa IL-8-reportterisolulinjassa (THP-G8, peräisin ihmisen akuutin monosyyttileukemian solulinjasta THP-1) IL-8:n ilmentymistä mitataan herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1). Sen jälkeen ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa käytetään apuna lusiferaasin ilmentymistä.

2. IL-8 Luc -testi on arvioitu validointitutkimuksessa (2), jonka tekivät JaCVAM (japanilainen vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus), **Japanin talous-, kauppa- ja teollisuusministeriö** (METI) sekä **JSAAE** (Japanin eläinkokeille vaihtoehtoisia menetelmiä kehittävä yhteisö). Sen jälkeen testille tehtiin riippumaton vertaisarviointi (3) JaCVAMin ja Japanin terveys-, työ- ja hyvinvointiministeriön (MHLW) sekä **vaihtoehtoisia testimenetelmiä koskevan kansainvälisen yhteistyöelimen** (ICATM) tuella. Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella IL-8 Luc -testiä pidetään käyttökelpoisena IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten IL-8 Luc -testillä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (4) (5) (6).

3. On osoitettu, että IL-8 Luc -testi on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelystä ja lusiferaasin mittaamisesta. Laboratorion sisäinen toistettavuus oli 87,7 prosenttia ja laboratorioiden välinen toistettavuus 87,5 prosenttia (2). Validointitutkimuksesta (2) ja muista julkaistuista tutkimuksista (1) (6) saadut tiedot osoittavat, että LLNA-tietoihin verrattuna IL-8 Luc -testi luokitteli 118 kemikaalia 143:sta positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 25 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottelemisessa ihoa herkistämättömistä aineista (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka Ei luokitusta) on 86 prosenttia (101/118), herkkyys 96 prosenttia (92/96) ja spesifisyys 41 prosenttia (9/22). Kun jätetään jäljempänä kuvatun sovellettavuusalueen ulkopuoliset aineet huomiotta (5 kohta), IL-8 Luc -testi luokitteli 113 kemikaalia 136:sta positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 23 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 89 prosenttia (101/113), herkkyys 96 prosenttia (92/96) ja spesifisyys 53 prosenttia (9/17). Kun käytetään julkaisussa Urbisch ja muut (7) lainattuja tietoja ihmisistä, IL-8 Luc -testi luokitteli 76 kemikaalia 90:stä positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 14 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 80 prosenttia (61/76), herkkyys 93 prosenttia (54/58) ja spesifisyys 39 prosenttia (7/18). Kun jätetään sovellettavuusalueen ulkopuoliset aineet huomiotta, IL-8 Luc -testi luokitteli 71 kemikaalia 84:stä positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 13 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 86 prosenttia (61/71), herkkyys 93 prosenttia (54/58) ja spesifisyys 54 prosenttia (7/13). IL-8 Luc -testillä saadaan vääriä negatiivisia ennusteita todennäköisimmin kemikaaleilla, joiden ihoherkistyspotentiaali on vähäinen tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin niillä, joiden potentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (6). Kokonaisuutena nämä tiedot puoltavat IL-8 Luc -testin käyttöä ihon herkistymistä aiheuttavien vaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat IL-8 Luc -testin käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia testejä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavana olevien tietojen perusteella on osoitettu, että IL-8 Luc -testiä voidaan käyttää testattaessa kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin funktionaalisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (*in vivo* -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia (2) (6).

5. Vaikka IL-8 Luc -testissä käytettävä liuotin on X-VIVO™ 15, sillä määritettiin oikein kemikaalit, joiden Log K_{ow} -arvo on >3,5, ja ne, joiden vesiliukoisuus on noin 100 µg/ ml EPI Suite™-menetelmällä laskettuna, ja sen tehokkuus havaita vesiliukoisuudeltaan heikot herkistävät aineet onkin parempi kuin silloin, jos IL-8 Luc -testissä käytetään liuottimena dimetyylisulfoksidia (DMSO:ta) (2). Sellaisia testikemikaaleja koskevat negatiiviset tulokset, jotka eivät liukene pitoisuudella 20 mg/ml, voivat kuitenkin olla vääriä negatiivisia tuloksia, koska ne eivät pysty liukenemaan X-VIVO™ 15:een. Sen vuoksi tällaisia kemikaaleja koskevia negatiivisia tuloksia ei tule ottaa huomioon. Validointitutkimuksessa todettiin, että väärien negatiivisten tulosten osuus oli anhydridien osalta suuri. Lisäksi solulinjan rajallisen metabolointikyvyn (8) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohapteenit (aineet, jotka vaativat metabolista aktivointia) ja prehapteenit (aineet, jotka hapetus aktivoi) voivat antaa testissä negatiivisia tuloksia. Vaikka oletettuja pre-/prohapteeneja koskevia negatiivisia tuloksia on siis tulkittava varauksellisesti, IL-8 Luc -testi määritti oikein 11/11 prehapteenia, 6/6 prohapteenia ja 6/8 pre-/prohapteenia IL-8 Luc -testin aineistossa (2). Pre- ja prohapteenien havaitsemiseen tarkoitetun kolmen eläinkokeettoman testin (DPRA, KeratinoSens™ ja h-CLAT) hiljattain tehdyn kattavan arvioinnin (9) ja sen perusteella, että IL-8 Luc -testissä käytettävissä THP-G8-soluissa on kyse solulinjasta, joka on peräisin h-CLAT-testissä käytetyistä THP-1-soluista, IL-8 Luc -testi voi osaltaan parantaa eläinkokeettomien testien herkkyyttä havaita pre- ja prohapteeneja muihin testeihin yhdistettynä. Tähän mennessä testatuista pinta-aktiivisista aineista saatiin (vääriä) positiivisia tuloksia riippumatta niiden tyypistä (ts. kationinen, anionineen tai ioniton). Kemikaalit, jotka häiritsevät lusiferaasia, voivat häiritä myös sen aktiivisuutta/mittausta ja aiheuttaa näennäistä inhibiota tai luminesenssin lisääntymistä (10). Esimerkiksi fytoestrogeenipitoisuuksien, jotka ovat suurempia kuin 1 µM, on raportoitu vaikuttavan häiritsevästi luminesenssisignaaleihin muissa lusiferaasipohjaisissa reportterigeenitesteissä, mikä johtuu lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta. Tämän seurauksena lusiferaasin ilmentymistä, joka on saatu suurilla pitoisuuksilla fytoestrogeeneja tai vastaavia yhdisteitä, joiden epäillään aiheuttavan fytoestrogeenin tavoin lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, on tutkittava huolellisesti (11). Edellä sanotun perusteella pinta-aktiiviset aineet, anhydridit ja lusiferaasia häiritsevät kemikaalit eivät kuulu tämän testin sovellettavuusalueeseen. Jos voidaan osoittaa, ettei IL-8 Luc -testi sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, sitä ei pidä käyttää niihin.

6. Kuten edellä on todettu, IL-8 Luc -testi auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten IL-8 Luc -testin tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa muihin tietolähteisiin yhdistettynä.

7. Määritelmät esitetään lisäyksessä 3.1.

TESTIN PERIAATE

8. IL-8 Luc -testissä käytetään ihmisen monosyyttileukemiasoluihin perustuvaa solulinjaa THP-1, joka on saatu American Type Culture Collectionista (Manassas, VA, Yhdysvallat). Tohokun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan dermatologian laitos valmisti tätä solulinjaa käyttämällä THP-1-soluihin perustuvan IL-8-reportterisolulinjan nimeltä THP-G8, joka sisältää vakaan lusiferaasioranssin (Stable Luciferase Orange, SLO) ja vakaan lusiferaasipunaisen (Stable Luciferase Red, SLR) lusiferaasigeenejä, joita IL-8 säätelee, sekä glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (GAPDH) promoottoreita (1). Tämän avulla voidaan mitata lusiferaasigeenin induktiota: hyvin tunnettujen lusiferaasisubstraattien tuottamaan valoon perustuvan luminesenssin havaitseminen on indikaattori IL-8:n aktivoitumisesta ja GAPDH:sta soluissa herkistäville kemikaaleille altistamisen jälkeen.

9. Kaksivärisessä testissä käytetään oranssia valoa emittoivaa lusiferaasia (SLO; λmaks. = 580 nm) (12) IL-8:n promoottorigeenin ilmentymiseen ja punaista valoa emittoivaa lusiferaasia (SLR; λmaks. = 630 nm) (13) sisäisen säätelyn promoottorigeenin, GAPDH:n, ilmentymiseen. Nämä kaksi lusiferaasia emittoivat eriväristä valoa reagoidessaan tulikärpäsen d-lusiferiiniin, ja niiden luminesenssi mitataan samanaikaisesti yhden vaiheen reaktiossa erottelemalla testiseoksen emissio käyttämällä optista suodatinta (14) (lisäys 3.2).

10. THP-G8-soluja käsitellään testikemikaalilla 16 tuntia, minkä jälkeen mitataan IL-8-promoottorin aktiivisuutta kuvaavan SLO-lusiferaasin aktiivisuus (SLO-LA) ja GAPDH-promoottorin aktiivisuutta kuvaavan SLR-lusiferaasin aktiivisuus (SLR-LA). Jotta lyhenteet olisi helpompi ymmärtää, SLO-LA-lyhenteestä käytetään jäljempänä muotoa IL8LA ja SLR-LA-lyhenteestä muotoa GAPLA. Taulukossa 1 selitetään IL-8 Luc -testissä käytettävät ilmaukset, jotka liittyvät lusiferaasiaktiivisuuteen. Mitattujen arvojen perusteella lasketaan normalisoitu IL8LA (nIL8LA), joka on IL8LA:n ja GAPLAn välinen suhde; nIL8LA:n induktio (Ind-IL8LA), joka on testikemikaalilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA:n nelinkertaisesti mitattujen arvojen ja käsittelemättömien THP-G8-solujen nIL8LA:n arvojen aritmeettisten keskiarvojen suhde; sekä GAPLAn inhibitio (Inh-GAPLA), joka on testikemikaalilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLAn nelinkertaisesti mitattujen arvojen ja käsittelemättömien THP-G8-solujen GAPLAn arvojen aritmeettisten keskiarvojen suhde ja jota käytetään sytotoksisuuden indikaattorina.

Taulukko 1

IL-8 Luc -testissä käytettävien lusiferaasiaktiivisuuteen liittyvien ilmausten selitykset

Lyhenteet	Määritelmä
GAPLA	SLR-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa GAPDH-promoottorin aktiivisuutta
IL8LA	SLO-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa IL-8-promoottorin aktiivisuutta
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	Kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA / käsittelemättömien solujen nIL8LA
Inh-GAPLA	Kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLA / käsittelemättömien solujen GAPLA
CV05	Kemikaalin pienin pitoisuus, jolla Inh-GAPLA-arvo on < 0,05.

11. Saatavilla on suoritusvaatimukset (15), jotka helpottavat IL-8 Luc -testin kaltaisten muunneltujen *in vitro* -IL-8-lusiferaasitestien validointia. Myös OECD:n testiohjetta 442E voidaan muuttaa oikea-aikaisesti, kun nämä vaatimukset lisätään ohjeisiin. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data, MAD) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten mukaisesti validoitujen testien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt nämä testit testiohjeeseen 442E (16).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

12. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 3.3 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla *in vitro* -menetelmiä koskevia hyviä käytäntöjä noudattaen (17). Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettävä tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 15 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 21–24 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

13. IL-8 Luc -testin vakiomenettely (Standard Operating Procedures, SOP) on saatavana, ja sitä pitäisi käyttää, kun laboratorio tekee testin (18). Laboratoriot, jotka haluavat tehdä testin, voivat tilata rekombinantinTHP-G8-solulinjan

GPC Lab. Co. Ltd:ltä (Tottori, Japani) tekemällä materiaalinsiirtosopimuksen OECD:n malliin sisältyvien ehtojen mukaisesti. Seuraavissa kohdissa kuvataan testin pääosat ja menettelyt.

Solujen valmistelu

14. IL-8 Luc -testissä on käytettävä THP-G8-solulinjaa, joka tilataan GPC Lab. Co. Ltd:ltä Tottorista Japanista (ks. 8 ja 13 kohta). Vastaanoton jälkeen soluja propagoidaan (2–4 siirrostusta) ja säilytetään pakastettuina homogeenisena kantana. Tämän kannan soluja voidaan propagoida enintään 12 siirrostusta tai enintään kuuden viikon ajan. Propagoinnissa käytetään RPMI-1 640-kasvatusliuosta, joka sisältää 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS:ää), antibiootti-/antimykoottiliuosta (100 U/ml penisilliini G:tä, 100 µg/ml streptomysiiniä ja 0,25 µg/ml amfoterisiini B:tä 0,85-prosenttisessa suolaliuoksessa) (esim. GIBCO, luettelonro 15 240-062), 0,15 µg/ml puromysiiniä (esim. CAS-nro 58-58-2) ja 300 µg/ml G418:aa (esim. CAS-nro 1083 21-42-2).

15. Ennen kuin soluja käytetään testauksessa, niiden laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Tämä testi on tehtävä sulatuksesta 1–2 viikon kuluttua tai 2–4 siirrostuksen jälkeen, ja siinä on käytettävä positiivista kontrollia, 4-nitrobentsyylibromidia (4-NBB) (CAS-nro 100-11-8, puhtaus ≥ 99 %) ja negatiivista kontrollia, maitohappoa (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %). 4-NBB:n tulisi tuottaa positiivinen vaste Ind-IL8LA:lle (≥1,4), kun taas maitohapon tulisi tuottaa negatiivinen vaste Ind-IL8LA:lle (<1,4). Testissä saa käyttää vain soluja, jotka läpäisevät reaktiivisuustestin. Testi on tehtävä 22–24 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

16. Testausta varten THP-G8-solujen kylvötiheyden on oltava 2–5 × 10^5 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa 48–96 tuntia. Testauspäivänä viljelypullosta kerätyt solut pestään RPMI-1640:llä, joka sisältää 10 % FBS:ää muttei antibiootteja. Sen jälkeen solut resuspendoidaan RPMI-1640-liuokseen, joka sisältää 10 % FBS:ää muttei antibiootteja, tiheyteen 1 × 10^6 solua/ml. Tämän jälkeen solut jaetaan 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle mustalle levylle (esim. Costar, luettelonro 3603) (50 µl) (5 × 10^4 solua/kuoppa).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

17. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. IL-8 Luc -testissä testikemikaalit liuotetaan X-VIVO™ 15 -liuottimeen, joka on kaupallisesti saatavilla oleva seerumiton kasvatusliuos (Lonza, 04-418Q), loppupitoisuuteen, joka on 20 mg/ml. X-VIVO™ 15:tä lisätään 20 mg:aan testikemikaalia (kemikaalin liukoisuudesta riippumatta) mikrosentrifugiputkessa 1 ml:n tilavuuteen. Sen jälkeen putkea ravistetaan voimakkaasti ja sekoitetaan sekoittimessa enimmäisnopeudella 8 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan 20°C:n lämpötilassa. Jos kiinteät kemikaalit eivät ole vieläkään liuenneet, putkea käsitellään ultraäänellä, kunnes kemikaali on liuennut kokonaan tai dispergoitunut stabiilisti. X-VIVO™ 15:een liukenevien testikemikaalien osalta liuos laimennetaan X-VIVO™ 15:lla viisinkertaisesti ja käytetään testikemikaalin X-VIVO™ 15 -varastoliuoksena (4 mg/ml). Niiden testikemikaalien osalta, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een, seosta sekoitetaan uudestaan vähintään 30 minuutin ajan ja sen jälkeen sentrifugoidaan kierrosluvulla 15000 rpm (≈20000 *g*) 5 minuutin ajan. Näin saatavaa supernatanttia käytetään testikemikaalin X-VIVO™ 15 -varastoliuoksena. Muiden liuottimien, kuten DMSO:n, veden tai kasvatusliuoksen, käytölle on esitettävä tieteelliset perusteet. Yksityiskohtainen menettely kemikaalien liuottamiseksi esitetään lisäyksessä 3.5. X-VIVO™ 15 -liuokset (ks. 18–23 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 96-kuoppaisella tasapohjaisella mustalla levyllä (ks. 16 kohta).

18. Ensimmäisen testiajon tarkoituksena on määrittää sytotoksinen pitoisuus ja tutkia kemikaalien ihoherkistyspotentiaalia. Testikemikaalien X-VIVO™ 15 -varastoliuoksista tehdään X-VIVO™ 15:n avulla sarjalaimennokset laimennuskertoimella 2 (ks. lisäys 3.5) käyttämällä 96-kuoppaista testiblokkia (esim. Costar, luettelonro EW-01729-03). Seuraavaksi 50 µl laimennettua liuosta / kuoppa lisätään 50 µl:aan solususpensiota 96-kuoppaisella tasapohjaisella mustalla levyllä. X-VIVO™ 15:een liukenevien testikemikaalien loppupitoisuudet ovat siis 0,002–2 mg/ml (lisäys 3.5). Niille testikemikaaleille, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml, määritetään vain laimennuskertoimet välille $2–2^{10}$, vaikka testikemikaalien todelliset loppupitoisuudet ovat epäselvät ja määräytyvät sen mukaan, mikä on testikemikaalien saturoitunut pitoisuus X-VIVO™ 15 -varastoliuoksessa.

19. Seuraavissa testiajoissa (ts. toiset, kolmannet ja neljännet rinnakkaisnäytteet) X-VIVO™ 15 -varastoliuoksesta tehdään neljä kertaa suurempi pitoisuus kuin se pitoisuus, jolla solujen elinkyky oli 05 (CV05; pienin pitoisuus, jolla Inh-GAPLA-arvo on < 0,05) ensimmäisessä kokeessa. Jos Inh-GAPLA-arvo ei laske alle 0,05:n ensimmäisen testiajon suurimmalla pitoisuudella, X-VIVO™ 15 -varastoliuoksesta tehdään ensimmäisen ajon suurimman pitoisuuden mukaan. CV05-pitoisuus lasketaan jakamalla ensimmäisen ajon varastoliuoksen pitoisuus CV05:n laimennuskertoimella (X) (laimennuskerroin CV05 (X); laimennuskerroin, jolla varastoliuos saatiin laimennettua CV05-arvoon) (ks. lisäys 3.5). Niiden testiaineiden osalta, jotka eivät liukene X-VIVO-liuokseen pitoisuudella 20 mg/ml, CV05 määritetään varastoliuoksen pitoisuudella × 1/X. Testiajoihin 2–4 valmistetaan toinen varastoliuos kaavalla 4 × CV05 (lisäys 3.5).

20. X-VIVO™ 15:n toisista varastoliuoksista tehdään sarjalaimennokset laimennuskertoimella 1,5 käyttäen 96-kuoppaista testiblokkia. Seuraavaksi 50 µl laimennettua liuosta / kuoppa lisätään 50 µl:aan solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuopissa. Kunkin testikemikaalin kukin pitoisuus on testattava neljässä kuopassa. Näytteet sekoitetaan levysekoittajalla ja niitä inkuboidaan 16 tunnin ajan 37°C:ssa (CO_2-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan jäljempänä kuvatulla tavalla.

21. Liuotinkontrolli on seos, joka sisältää 50 µl X-VIVO™ 15:tä / kuoppa ja 50 µl solususpensiota / kuoppa RPMI-1640-liuoksessa, joka sisältää 10 prosenttia FBS:ää.

22. Suositeltu positiivinen kontrolli on 4-NBB. 4-NBB:tä laitetaan 20 mg 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, johon lisätään X-VIVO™ 15:tä enintään 1 ml. Putkea ravistetaan voimakkaasti ja sekoitetaan sekoittajassa enintään 8 kierrosta minuutissa -kierrosluvulla vähintään 30 minuutin ajan. Sentrifugoinnin (20000 g, 5 min) jälkeen supernatantti laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 4 ja 500 µl laimennettua supernatanttia siirretään 96-kuoppaisen testiblokin kuoppiin. Laimennettua supernatanttia laimennetaan lisää X-VIVO™ 15:llä kertoimilla 2 ja 4, ja 50 µl liuosta lisätään 50 µl:aan THP-G8-solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuoppiin (lisäys 3.6). Positiivisen kontrollin kukin pitoisuus on testattava neljässä kuopassa. Levyä sekoitetaan levysekoittajalla ja sitä inkuboidaan 16 tunnin ajan hiilidioksidi-inkubaattorissa (37°C, CO_2-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan 29 kohdassa kuvatulla tavalla.

23. Suositeltu negatiivinen kontrolli on maitohappo. Maitohappoa laitetaan 20 mg 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, johon lisätään enintään 1 ml X-VIVO™ 15:tä (20 mg/ ml). Maitohappoliuos (20 mg/ml) laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 5 (4 mg/ml); 500 µl tästä maitohappoliuoksesta, jonka pitoisuus on 4 mg/ml, siirretään 96-kuoppaisen testiblokin kuoppiin. Tämä liuos laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 2 ja sen jälkeen vielä kerran kertoimella 2, jotta saadaan liuokset, joiden pitoisuudet ovat 2 mg/ml ja 1 mg/ml. Näistä kolmesta liuoksesta ja kantaja-ainekontrollista (X-VIVO™ 15) 50 µl kutakin lisätään 50 µl:aan THP-G8-solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuoppiin. Negatiivisen kontrollin kukin pitoisuus testataan neljässä kuopassa. Levyä sekoitetaan levysekoittajalla ja sitä inkuboidaan 16 tunnin ajan hiilidioksidi-inkubaattorissa (37°C, CO_2-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan 29 kohdassa kuvatulla tavalla.

24. Muita sopivia positiivisia tai negatiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailuajon hyväksymisperusteet.

25. Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levyt kalvolla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa.

26. Testikemikaaleista ja liuotinkontrollista on tehtävä 2–4 ajoa, jotta voidaan tehdä positiivinen tai negatiivinen ennuste (ks. taulukko 2). Kukin ajo tehdään eri päivinä käyttämällä testikemikaaleista tuoretta X-VIVO™ 15 -varastoliuosta ja erikseen kerättyjä soluja. Solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta siirrostuksesta.

Lusiferaasiaktiivisuuden mittaukset

27. Luminesenssi mitataan käyttämällä 96-kuoppaisen mikrolevyn luminometriä, jossa on optiset suodattimet. Tällaisia laitteita ovat esimerkiksi Phelios (ATTO, Tokio, Japani), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Saksa) ja ARVO-sarja (PerkinElmer, Waltham, MA, Yhdysvallat). Luminometri on kalibroitava jokaiseen testiin toistettavuuden varmistamiseksi (19). Kalibrointia varten saatavana on rekombinantteja oranssia ja punaista valoa emittoivia lusiferaaseja.

28. Esilämmitettyä Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssia (Tripluc) laitetaan 100 µl kemikaalilla käsiteltyä tai käsittelemätöntä solususpensiota sisältävän levyn jokaiseen kuoppaan. Levyä sekoitetaan 10 minuuttia noin 20°C:n lämpötilassa, ja sen jälkeen levy asetetaan luminometriin lusiferaasiaktiivisuuden mittaamiseksi. Bioluminesenssia mitataan 3 sekuntia sekä optista suodatinta käyttämättä (F0) että sitä käyttäen (F1). Toisenlaisten asetusten (jotka määräytyvät esimerkiksi käytettävän luminometrin mallin mukaan) käyttäminen on perusteltava.

29. Jokaisen pitoisuuden parametrit lasketaan mitatuista arvoista, joita ovat IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, GAPLAn keskiarvo ± keskihajonta, nIL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, Ind-IL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, Inh-GAPLA:n keskiarvo ± keskihajonta sekä Ind-IL8LA:n 95 prosentin luottamusväli. Tässä kohdassa käytettyjen parametrien määritelmät on esitetty lisäyksessä 3.1 ja 3.4.

30. Ennen mittausta monivärisissä reportteritesteissä tehdään yleensä värierottelu käyttämällä ilmaisimia (luminometri ja levylukija), joissa on optiset suodattimet, kuten tarkkuussuodattimet (yli- tai alipäästö) tai kaistanpäästösuodattimet. Suodattimien transmissiokertoimet jokaisen bioluminesenssisignaalin värin osalta on kalibroitava ennen testausta lisäyksen 3.2 mukaisesti.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

31. Positiivisen/negatiivisen päätöksen perusteissa edellytetään, että jokaisessa testiajossa

— IL-8 Luc -testin ennuste on positiivinen, jos testikemikaalin Ind-IL8LA-arvo on ≥ 1,4 ja Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusvälin alaraja on ≥ 1,0

— IL-8 Luc -testin ennuste on negatiivinen, jos testikemikaalin Ind-IL8LA-arvo on < 1,4 ja/tai Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusvälin alaraja on < 1,0.

Ennustemalli

32. Testikemikaalit, joista saadaan kaksi positiivista tulosta ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa tai neljännessä ajossa, määritetään positiivisiksi, kun taas ne testikemikaalit, joista saadaan kolme negatiivista tulosta ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa tai neljännessä ajossa, määritetään oletettavasti negatiivisiksi (taulukko 2). Oletettavasti negatiivisista kemikaaleista ne, jotka liukenevat X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml, katsotaan negatiivisiksi, kun taas ne, jotka eivät liukene tähän liuokseen tällä pitoisuudella, on jätettävä pois analyysista (kuva 1).

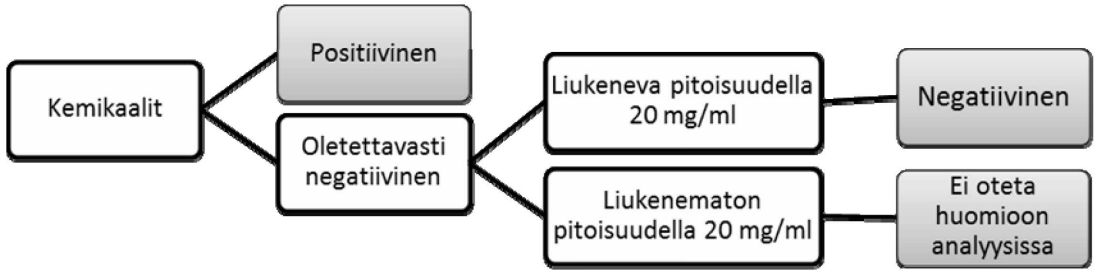
Taulukko 2

Positiivisten ja oletettavasti negatiivisten kemikaalien määrittämisperusteet

1. testiajo	2. testiajo	3. testiajo	4. testiajo	Lopullinen ennuste
Positiivinen	Positiivinen	–	–	Positiivinen
	Negatiivinen	Positiivinen	–	Positiivinen
		Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen	–	Positiivinen
		Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
	Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
		Negatiivinen	–	Oletettavasti negatiivinen

Kuva 1

Lopullisen arvion ennustemalli



Hyväksymisperusteet

33. Seuraavien hyväksyntäperusteiden pitää täyttyä IL-8 Luc -testiä käytettäessä:

— Ind-IL8LA-arvon on oltava yli 5,0 vähintään yhdellä positiivisen kontrollin (4-NBB) pitoisuudella jokaisessa testiajossa.

— Ind-IL8LA-arvon on oltava alle 1,4 millä tahansa negatiivisen kontrollin (maitohappo) pitoisuudella jokaisessa testiajossa.

— Sellaiset tiedot levyiltä, joissa soluja ja Triplucia mutta ei kemikaaleja sisältävien kontrollikuoppien GAPLA-arvo on alle viisi kertaa vain testiliuosta (50 µl RPMI-1640-liuosta (joka sisältää 10 prosenttia FBS:ää) / kuoppa ja 50 µl X-VIVO™ 15:tä / kuoppa) sisältävien kuoppien arvosta, on hylättävä.

— Tiedot levyiltä, joissa testi- tai kontrollikemikaalien kaikkien pitoisuuksien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05, on hylättävä. Tässä tapauksessa ensimmäinen testi on toistettava, jolloin toistetun testin suurin loppupitoisuus on edellisen testin pienin loppupitoisuus.

Testiraportti

34. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaalit

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— liukoisuus X-VIVO™ 15:een. Siihen liukenemattomien kemikaalien osalta tieto siitä, oliko sentrifugoinnin jälkeen havaittavissa saostumista tai flotaatiota.

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta, jos X-VIVO™ 15:tä ei ole käytetty.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— liukoisuus X-VIVO™ 15:een. Siihen liukenemattomien kemikaalien osalta tieto siitä, oliko sentrifugoinnin jälkeen havaittavissa saostumista tai flotaatiota.

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta, jos X-VIVO™ 15:tä ei ole käytetty.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista hyväksymisperusteista.

Negatiivinen kontrolli:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t) ja/tai muut tunnisteet

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos negatiiviset kontrollit ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja, ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testistä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— FBS:n eränumero ja alkuperä, toimittajan nimi, 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn eränumero ja Triplucreagenssin eränumero

— siirrostusten lukumäärä ja testauksessa käytetty solutiheys

— testaamista edeltävään kylvöön käytetty solujen laskentamenetelmä ja toimenpiteet, joilla on varmistettu solujen määrän tasainen jakautuminen

— käytetty luminometri (esimerkiksi malli), myös instrumenttiasetukset, käytetty lusiferaasisubstraatti sekä lisäyksessä 3.2 kuvattuun kontrollitestiin perustuvien asianmukaisten luminesenssimittausten esittely

— menettely, jolla on osoitettu laboratorion pätevyys tehdä testi (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen) tai testin toistettavuus ajan mittaan.

Testimenettely

— rinnakkaisnäytteiden ja tehtyjen testiajojen lukumäärä

— testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus tutkimukselle asetetuista hyväksymisperusteista

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— IL8LA- ja GAPLA-arvojen mittaukset

— nIL8LA-, Ind-IL8LA- ja Inh-GAPLA-arvojen laskelmat

— Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusväli

— kaavio, jossa kuvataan lusiferaasiaktiivisuuden induktion ja elinkyvyn annos-vastekäyrät

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— IL-8 Luc -testillä saatujen tulosten tarkastelu

— testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa 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. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, saatavana osoitteessa 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: Scientific Evidence. 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. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Lisäys 3.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (20).

Kemikaali: Aine tai seos.

CV05: Solujen elinkyky (cell viability) 05 eli pienin pitoisuus, jolla kemikaalien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05.

FInSLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa Ind-IL8LA-arvoa. Ks. Ind-IL8LA:n määritelmä.

GAPLA: Vakaan lusiferaasipunaisen (SLR) lusiferaasiaktiivisuus (λmaks. = 630 nm), jota säätelee GAPDH:n promoottori. Arvo kertoo solujen elinkyvyn ja elinkykyisten solujen lukumäärän.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

II-SLR-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa Inh-GAPLA-arvoa. Ks. Inh-GAPLA:n määritelmä.

IL-8 (interleukiini-8): Endoteelisoluista, fibroblasteista, keratinosyyteistä, makrofageista ja monosyyteistä saatava sytokiini, joka aiheuttaa neutrofiilien ja T-solulymfosyyttien kemotaksiaa.

IL8LA: Vakaan lusiferaasioranssin (SLO) lusiferaasiaktiivisuus (λmaks. = 580 nm), jota säätelee IL-8:n promoottori.

Ind-IL8LA: nIL8LA:n induktiokerroin. Se saadaan jakamalla kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA-arvo stimuloimattomien THP-G8-solujen vastaavalla arvolla, ja se kertoo kemikaalien aiheuttamasta IL-8:n promoottorin aktivoitumisesta.

Inh-GAPLA: GAPLA:n inhibitio. Se saadaan jakamalla kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLA-arvo käsittelemättömien THP-G8-solujen vastaavalla arvolla, ja se kertoo kemikaalien sytotoksisuudesta.

Vähimmäisinduktioraja: Pienin pitoisuus, jolla positiivisen tuloksen perusteet täyttyvät kemikaalin osalta.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

nIL8LA: SLO-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa IL-8:n promoottorin aktiivisuutta (IL8LA) normalisoituna SLR-lusiferaasiaktiivisuudella, joka kuvastaa GAPDH:n promoottorin aktiivisuutta (GAPLA). Se kuvastaa IL-8:n promoottorin aktiivisuutta solujen elinkyky tai solujen lukumäärä huomioon ottaen.

nSLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa nIL8LA-arvoa. Ks. nIL8LA:n määritelmä.

Positiivinen kontrolli: Rinnakkaisnäyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (16).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (16).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (16).

SLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa IL8LA-arvoa. Ks. IL8LA:n määritelmä.

SLR-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa GAPLA-arvoa. Ks. GAPLA:n määritelmä.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (16).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita. Tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena. (TG437)

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

THP-G8: IL-8-reportterisolulinja, jota käytetään IL-8 Luc -testissä. Ihmisen makrofagin kaltaiseen THP-1-solulinjaan transfektoitiin SLO- ja SLR-lusiferaasigeenit IL-8:n ja GAPDH:n promoottorien säätelemänä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (esimerkiksi työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (21).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testimenetelmä: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen.

Lisäys 3.2

LUSIFERAASIAKTIIVISUUDEN MITTAUSPERIAATE JA OPTISEN SUODATTIMEN TRANSMISSIOKERTOIMIEN MÄÄRITTÄMINEN SLO:TA JA SLR:ÄÄ VARTEN

MultiReporter-testijärjestelmää (Tripluc) voidaan käyttää sellaisen mikrolevytyyppisen luminometrin kanssa, jossa on monivärinen havaintojärjestelmä ja johon voidaan liittää optinen suodatin (esim. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Mittauksessa käytettävä optinen suodatin on 600–620 nm:n yli- tai alipäästösuodatin tai 600–700 nm:n kaistanpäästösuodatin.

Kaksiväristen lusiferaasien mittaaminen optisella suodattimella.

Tässä esimerkissä käytettävä laite on Phelios AB-2350 (ATTO). Tässä luminometrissä on 600 nm:n ylipäästösuodatin (R60 HOYA Co. 600 nm:n ylipäästösuodatin 1) SLO:n (λmaks. = 580 nm) ja SLR:n (λmaks. = 630 nm) luminesenssin jaottelemiseen.

Jotta voidaan määrittää 600 nm:n ylipäästösuodattimen transmissiokertoimet, mitataan puhdistettuja SLO- ja SLR-lusiferaasientsyymejä käyttämällä i) SLO:n ja SLR:n bioluminesenssin intensiteetti ilman suodatinta (F0), ii) SLO:n ja SLR:n bioluminesenssin intensiteetti, joka läpäisi 600 nm:n ylipäästösuodattimen (suodatin 1) ja iii) lasketaan 600 nm:n ylipäästösuodattimen transmissiokertoimet SLO:lle ja SLR:lle jäljempänä selostetun mukaisesti.

Transmissiokerroin		Lyhenne	Määritelmä
SLO	Suodatin 1Transmissiokerroin	$=\kappa O_{R60}$	Suodattimen transmissiokerroin SLO:lle
SLR	Suodatin 1Transmissiokerroin	κR_{R60}	Suodattimen transmissiokerroin SLR:lle

Jos testinäytteen SLO:n ja SLR:n intensiteetti määritetään kirjaimilla O ja R, i) valon intensiteetti ilman suodatinta (optinen) F0 ja ii) valon intensiteetti, joka siirtyy 600 nm:n ylipäästösuodattimen läpi (suodatin 1) F1, kuvataan jäljempänä selostetun mukaisesti.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Nämä kaavat voidaan ilmaista myös näin:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

O- ja R-arvo lasketaan käyttämällä laskettuja transmissiokertoimia (κO_{R60} ja κR_{R60}) ja mitattuja F0- ja F1-arvoja seuraavasti:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Transmissiokertoimen määrittämisessä tarvittavat materiaalit ja käytettävät menetelmät

1) *Reagenssit*

Yksittäiset puhdistetut lusiferaasientsyymit:

Kylmäkuivattu puhdistettu SLO-entsyymi

Kylmäkuivattu puhdistettu SLR-entsyymi

(joille on saatu validointitiedot GPC Lab. Co. Ltd:ltä Tottorista Japanista THP-G8-solulinjan kanssa)

Testireagenssi:

Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssi (toimittaja esimerkiksi TOYOBO, luettelonro MRA-301)

Kasvatusliuos: Lusiferaasitestille (30 ml, säilytys 2–8 °C)

Reagenssi	Pit.	Loppupit. kasvatusliuoksessa	Tarvittava määrä
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) *Entsyymiliuoksen valmistus*

Liuota kylmäkuivattu puhdistettu lusiferaasientsyymi putkessa lisäämällä 200 µl Tris/HCl:ää (10 ~ 100 mM) tai Hepes/HCl:ää (pH 7,5 ~ 8,0), jota on täydennetty 10 prosentilla (paino/tilavuus) glyserolia. Jaa entsyymiliuos 10 µl:n alikvootteihin 1,5 ml:n kertakäyttöputkiin ja laita ne pakastimeen -80 °C:seen. Pakastettua entsyymiliuosta voidaan käyttää enintään kuusi kuukautta. Kun liuosta tarvitaan, lisää jokaiseen entsyymiliuosta (laimennettu entsyymiliuos) sisältävään putkeen 1 ml lusiferaasitestin kasvatusliuosta (RPMI-1640, sis. 10 % FBS:ää) ja laita ne jäähauteeseen deaktivoitumisen estämiseksi.

3) *Bioluminesenssin mittaaminen*

Sulata Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssi (Tripluc) ja säilytä sitä huoneenlämpötilassa joko vesihauteessa tai ympäröivän ilman lämpötilassa. Kytke luminometriin virta 30 minuuttia ennen mittauksen aloittamista, jotta valomonistin ehtii stabiloitua. Laita 100 µl laimennettua entsyymiliuosta mustalle 96-kuoppaiselle levylle (tasapohja) (SLO-vertailunäyte kuoppiin B1, B2, B3 ja SLR-vertailunäyte kuoppiin D1, D2, D3). Laita sen jälkeen pipetillä 100 µl esilämmitettyä Triplucia levyn jokaiseen kuoppaan, joka sisältää laimennettua entsyymiliuosta. Ravista levyä noin 10 minuuttia huoneenlämpötilassa (noin 25 °C) levyravistelijaa käyttäen. Poista kuplat, jos niitä ilmaantuu kuopissa oleviin liuoksiin. Aseta levy luminometriin ja mittaa lusiferaasiaktiivisuus. Bioluminesenssia mitataan 3 sekuntia sekä optista suodatinta käyttämättä (F0) että sitä käyttäen (F1).

Optisen suodattimen transmissiokerroin laskettiin näin:

Transmissiokerroin (SLO (κO_{R60}))= (F1:n B1 + F1:n B2 + F1:n B3) / (F0:n B1+ F0:n B2 + F0:n B3)

Transmissiokerroin (SLR (κO_{R60}))= (F1:n D1 + F1:n D2 + F1:n D3) / (F0:n D1+ F0:n D2 + F0:n D3)

Laskettuja transmissiokertoimia käytetään kaikkiin mittauksiin, jotka tehdään samalla luminometrillä.

Laitteiden laadunvalvonta

IL-8 Luc -protokollassa kuvattuja menettelyjä on käytettävä (18).

Lisäys 3.3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen ennuste IL-8 Luc -testistä yhdeksälle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle yhdeksästä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta (jotka on valittu edustamaan ihon herkistymisvaarojen vastealuetta). Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu IL-8 Luc -testillä. Myös IL-8 Luc -testistä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (6) (1).

Taulukko 1

Suositellut aineet IL-8 Luc -testiä koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Olomuoto	Liukoisuus X-VIVO15:ssä, pit. 20 mg/ml	*In vivo* -ennuste [1]	IL-8 Luc -ennuste [2]	Viitealue (µg/ml) [3]	
						CV05 [4]	IL-8 Luc MIT [5]
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Liukenematon	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehydi	50-00-0	Neste	Liukoinen	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	9-30	4-9
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Liukenematon	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	250-290	60-250
Etyleenidiamiini	107-15-3	Neste	Liukoinen	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	500-700	0,1-0,4
Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Neste	Liukenematon	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	>2 000	0,04-0,1
4-allyylianisoli (estragoli)	140-67-0	Neste	Liukenematon	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	>2 000	0,01-0,07
Streptomysiinisulfaatti	3810-74-0	Kiinteä	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000
Glyseroli	56-81-5	Neste	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000
Isopropanoli	67-63-0	Neste	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.
(1) *In vivo* potenssi on saatu käyttämällä ECETOC:n esittämiä kriteerejä (19).
(2) Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (1) (6).
(3) CV_{05} ja IL-8 Luc MIT laskettiin käyttämällä EPI Suite™:llä saatua vesiliukoisuutta.
(4) CV_{05}: pienin pitoisuus, jolla kemikaalien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05.
(5) MIT: pienin pitoisuus, jolla positiivisen tuloksen perusteet täyttyvät kemikaalin osalta.

Lisäys 3.4

SUHDELUVUT JA ARVIOINTIPERUSTEET

nIL8LA (nSLO-LA)

I-pitoisuuden (i = 0–11) j:s toisto (j = 1–4) mitataan IL8LA-arvolle (SLO-LA) ja GAPLA-arvolle (SLR-LA). Normalisoitu IL8LA, josta käytetään lyhennettä nIL8LA (nSLO-LA), määritetään näin:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Tämä on mittauksen perusyksikkö tässä testissä.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Keskimääräisen nIL8LA:n (nSLO-LA) induktiokerroin, joka koskee i:nnen pitoisuuden toistoa verrattuna siihen 0-pitoisuuden yhteydessä (Ind-IL8LA), on tärkein luku tässä testissä. Tämä suhde saadaan seuraavalla kaavalla:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_j \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Johtava laboratorio on ehdottanut, että arvo 1,4 vastaa positiivista tulosta testatulle kemikaalille. Tämä arvo perustuu johtavan laboratorion aikaisempien tietojen tarkasteluun. Aineistonhallintaryhmä käytti tätä arvoa sittemmin kaikissa validointitutkimuksen vaiheissa. Tärkein tulos, Ind-IL8LA, on kahden aritmeettisen keskiarvon suhde, kuten yhtälö osoittaa.

95 prosentin luottamusväli (95 % CI)

Suhdelukuun perustuvalla 95 prosentin luottamusvälillä (95 % CI) voidaan arvioida tämän tärkeimmän tulosluvun tarkkuutta. Jos 95 prosentin luottamusvälin alaraja on ≥ 1, se osoittaa, että i:nnenteen pitoisuuteen liittyvä nIL8LA on huomattavasti suurempi kuin liuotinkontrollilla saatu arvo. On monia tapoja laskea 95 prosentin luottamusväli. Tässä tutkimuksessa olemme käyttäneet Fiellerin teoreema -nimistä menetelmää. Tämä 95 prosentin luottamusväli -teoreema saadaan seuraavalla kaavalla:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

jossa

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$ on keskeisen t-jakauman 97,5-persentiili ja ν on vapausaste, jossa

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA on keskimääräisen GAPLA-arvon (SLR-LA) suhde i:nnen pitoisuuden toistoon verrattuna liuotinkontrollin arvoon, ja se lasketaan näin:

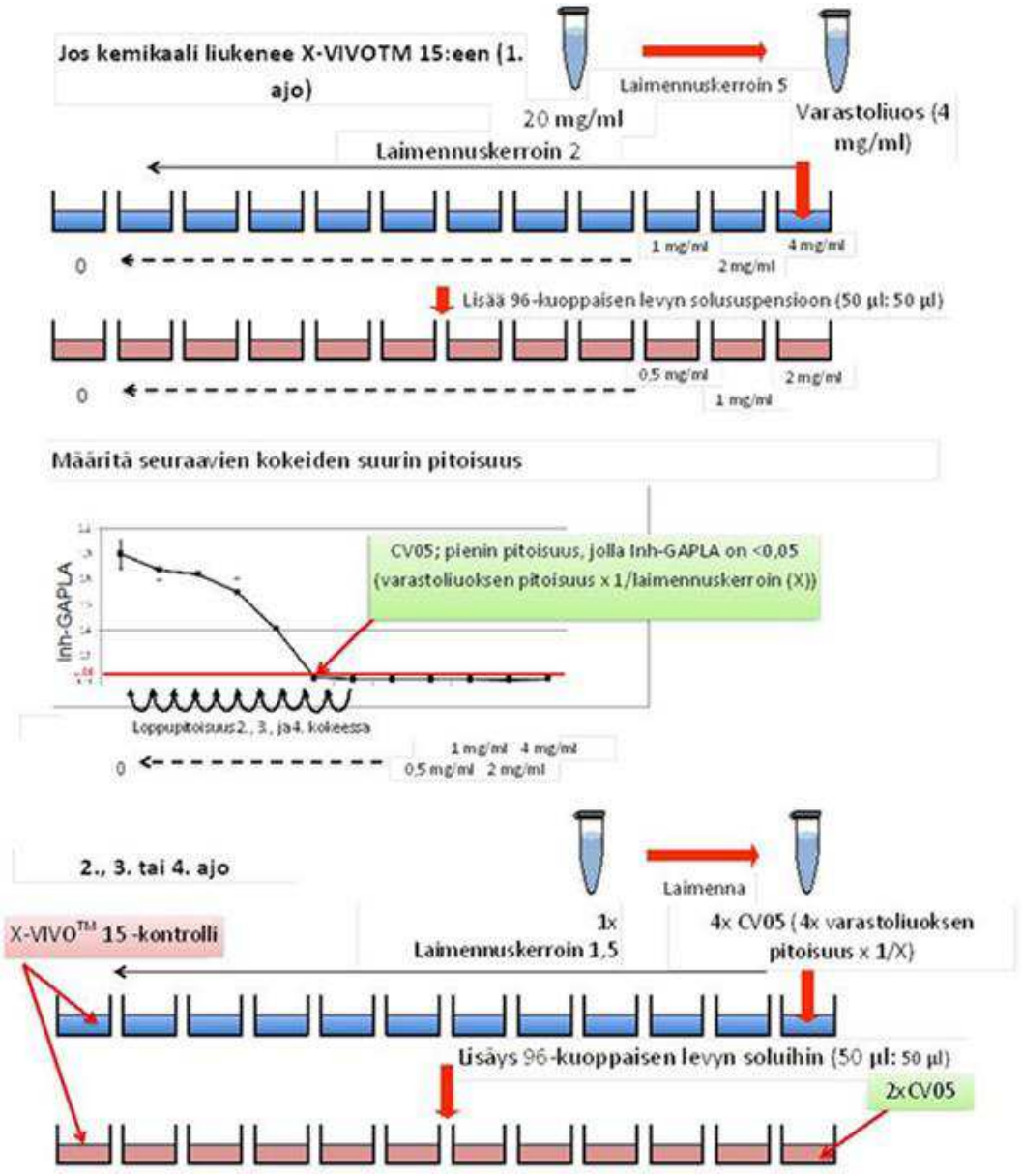
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Koska GAPLA on nIL8LA:n nimittäjä, erittäin pieni arvo aiheuttaa suurta vaihtelua nIL8LA-arvoissa. Sen vuoksi Ind-IL8LA-arvot, joihin liittyy erittäin pieni Inh-GAPLA-arvo (alle 0,05), on syytä tulkita huonoksi tarkkuudeksi.

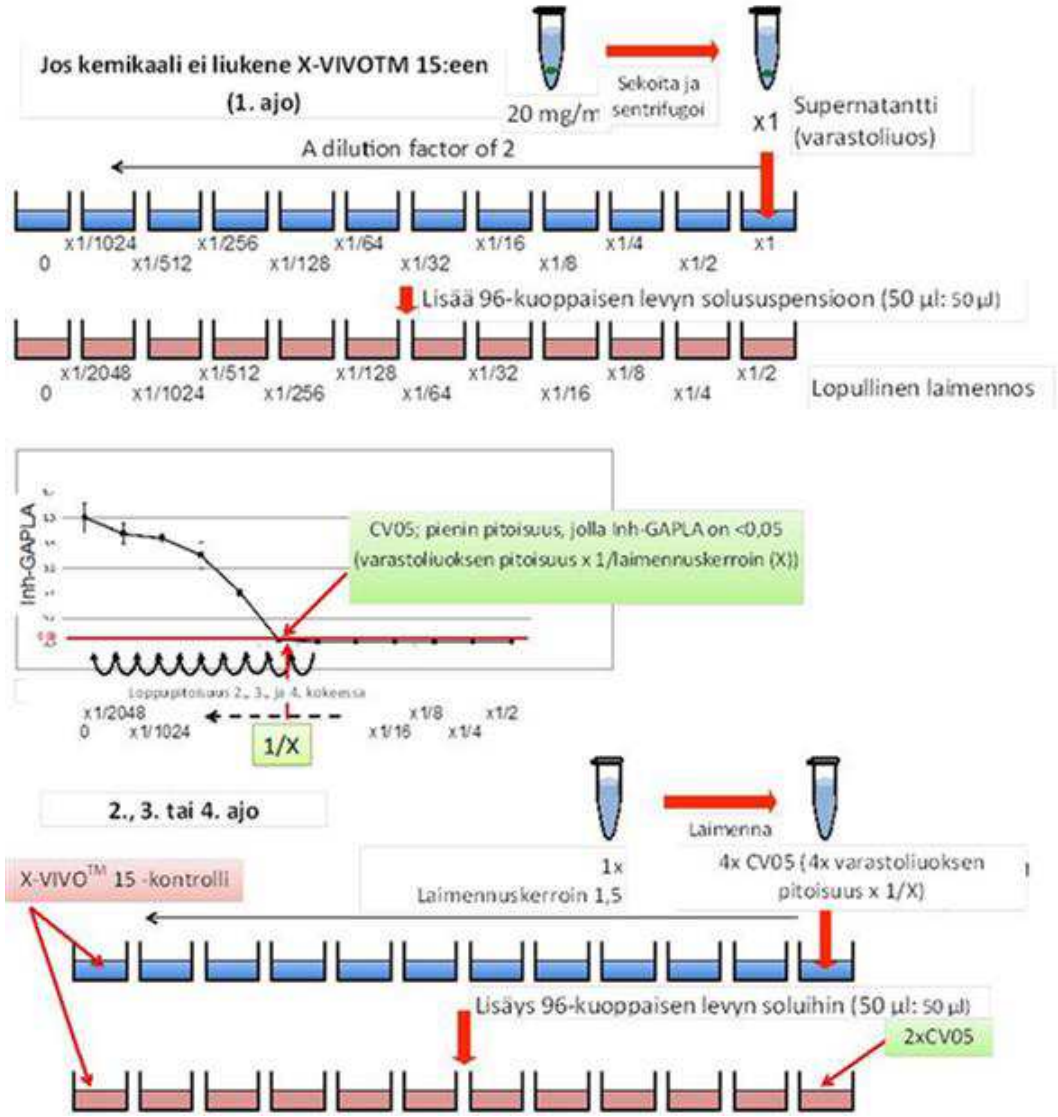
Lisäys 3.5

KEMIKAALIEN LIUOTTAMISMENETELMÄT IL-8 LUC -TESTISSÄ.

a) Kemikaalit, jotka liukenevat X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml

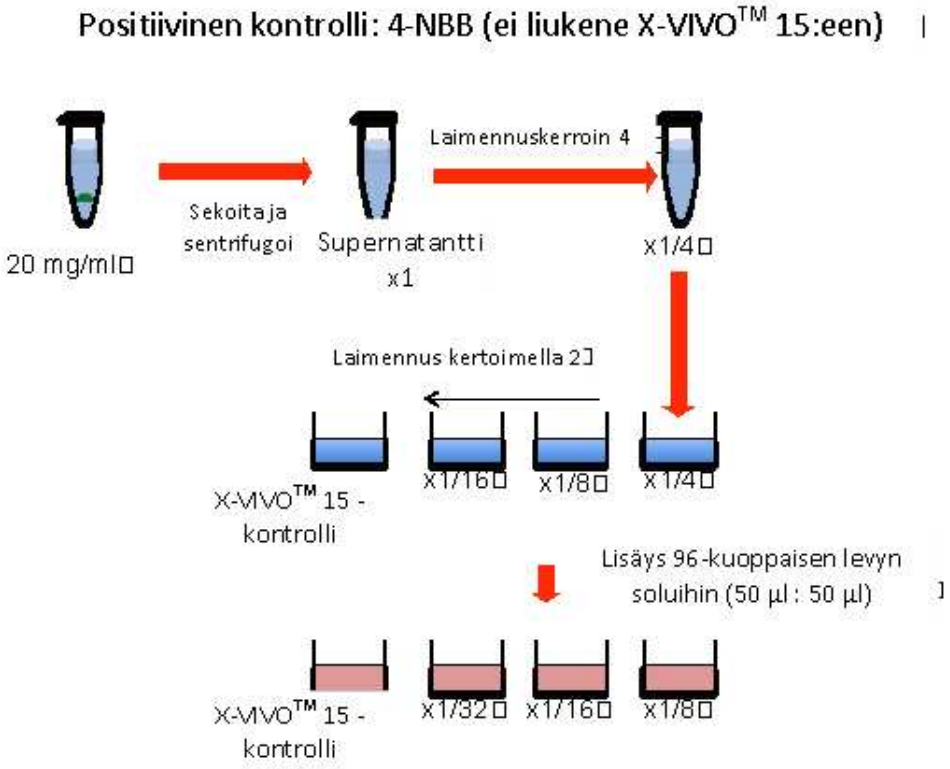


b) Kemikaalit, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml



Lisäys 3.6

4-NBB:N LIUOTTAMISMENETELMÄ IL-8 LUC -TESTIN POSITIIVISTA KONTROLLIA VARTEN.



9) Lisätään C osaan seuraavat luvut:

"C.52 **MEDAKALLA TEHTÄVÄ PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTESTI**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 240 (2015). Medakalla tehtävässä pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistestissä (MEORG-testi) kuvataan laaja testimenetelmä, joka perustuu kalojen altistamiseen useiden sukupolvien ajan. Testistä saadaan oleellista tietoa kemikaalien aiheuttamien ympäristöriskien ja muiden riskien arviointiin, myös hormonaalisten haitta-aineiden osalta. Medakalla tehtävässä pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistestissä altistusta jatketaan kuoriutumiseen (kaksi viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) saakka toisessa sukupolvessa (F2). Lisää tutkimusta tarvitaan sen hyödyllisyyden perustelemiseksi, että F2-sukupolven tutkimusta jatkettaisiin kuoriutumisen jälkeen; tällä hetkellä tietoa on liian vähän, jotta voitaisiin laatia asianmukaiset ehdot tai perusteet F2-sukupolven tutkimuksen pidentämiselle. Tätä testimenetelmää voidaan kuitenkin päivittää uusien tietojen ja tutkimustulosten myötä. Ohjeet esimerkiksi F2-sukupolven tutkimuksen pidentämisestä lisääntymisen osalta voivat olla hyödyllisiä tietyissä olosuhteissa (esimerkiksi kemikaalit, joiden biokertyvyyspotentiaali on suuri tai jos on merkkejä sukupolvien välisistä vaikutuksista muissa taksoneissa). Tätä testimenetelmää voidaan käyttää kemikaalien ja myös mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden mahdollisten pitkäaikaisten, kaloihin kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa. Menetelmässä keskitytään ensisijaisesti mahdollisiin populaation kannalta merkityksellisiin vaikutuksiin (ts. eloonjäämiseen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiseen kohdistuviin haittavaikutuksiin), jotta voidaan laskea NOEC-arvo (No Observed Effect Concentration, pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) tai ECx-arvo (Effect Concentration, vaikuttava pitoisuus). On kuitenkin syytä todeta, että ECx-arvoon perustuvat lähestymistavat soveltuvat vain harvoin tämäntyyppisiin laajoihin tutkimuksiin, joissa testipitoisuuksien määrän lisääminen halutun ECx-arvon määrittämiseksi voi olla epäkäytännöllistä, ja se voi aiheuttaa myös merkittäviä huolenaiheita eläinten hyvinvoinnista, koska niissä tarvitaan paljon koe-eläimiä. Muut testimenetelmät voivat olla sopivampia sellaisille kemikaaleille, jotka eivät edellytä usean sukupolven mittaista arviointia tai jotka eivät ole mahdollisia hormonaalisia haitta-aineita (1), Medaka on tarkoituksenmukainen laji käytettäväksi tässä testimenetelmässä, koska sen elinkaari on lyhyt ja koska on mahdollista määrittää sen geneettinen sukupuoli (2), jota pidetään tärkeänä seikkana tässä testimenetelmässä. Tässä menetelmässä kuvatut menettelyt ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään medakaa. Muut pienet kalalajit (esimerkiksi seeprakala) voivat soveltua käytettäväksi samanlaisen testiprotokollan yhteydessä.

2. Tässä testimenetelmässä mitataan useita biologisia päätetapahtumia. Pääpainopiste on mahdollisissa populaation kannalta merkityksellisissä parametreissa, joita ovat esimerkiksi eloonjääminen, kokonaiskehitys, kasvu ja lisääntyminen. Jotta saadaan mekanistista tietoa ja voidaan todeta yhteys muiden kenttä- ja laboratoriotutkimusten tulosten välillä, kun kemikaalin mahdollisesta hormonitoimintaa häiritsevästä vaikutuksesta (kuten androgeenisesta tai estrogeenisesta aktiivisuudesta muissa testeissä ja määrityksissä) on *a posteriori* -näyttöä, hankitaan myös muuta hyödyllistä tietoa mittaamalla *vitellogeniinin* (*vtg)* mRNA (tai vitellogeniiniproteiini, VTG) sekä geneettiseen sukupuoleen liittyvät fenotyyppiset sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja arvioidaan histopatologiaa. Jos testikemikaalin tai sen metaboliittien ei oleteta olevan hormonaalisia haitta-aineita, näitä toissijaisia päätetapahtumia ei välttämättä ole tarpeen mitata, ja sellaiset tutkimukset, joissa tarvitaan vähemmän resursseja ja koe-eläimiä, voivat olla tarkoituksenmukaisempia (1). Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on selostettu lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

3. Tämän melko monimutkaisen testin validoinnissa testattiin vähän kemikaaleja, ja validointiin osallistui vain muutama laboratorio. Sen vuoksi on oletettavaa, että kun saatavilla on riittävä määrä tutkimuksia, joilla voidaan vahvistaa tämän rakenteeltaan uudenlaisen tutkimuksen vaikutus, tämä testimenetelmä arvioidaan ja sitä muutetaan tarvittaessa kertyneen kokemuksen perusteella. Tietoja voidaan käyttää OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasolla 5 (3). Testin alussa sukukypsät kalat (sukupolvi F0) altistetaan testikemikaalille lisääntymisvaiheessa. Altistusta jatketaan F1-sukupolven osalta kehitys- ja lisääntymisvaiheeseen ja F2-sukupolven osalta kuoriutumisvaiheeseen. Näin testissä voidaan arvioida sekä rakenteellisia että aktivaatioon perustuvia endokriinisiä reittejä. Endokriinisten päätetapahtumien tulkinnassa voidaan soveltaa näyttöön perustuvaa lähestymistapaa.

4. Testissä on oltava riittävä määrä yksilöitä, jotta lisääntymisen kannalta merkityksellisten päätetapahtumien arvioinnin voima on riittävä (ks. lisäys 3). Samalla on kuitenkin huolehdittava siitä, että testissä käytetään mahdollisimman vähän koe-eläimiä eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Käytettävien koe-eläinten suuren määrän vuoksi on tärkeää arvioida testin tarpeellisuus huolellisesti siihen nähden, että olemassa olevat tutkimustulokset voivat jo sisältää oleellista tietoa monista tämän MEORG-testin päätetapahtumista. Tältä osin OECD:n kaloihin kohdistuvan myrkyllisyyden testausta koskevista toimintaohjeista (1) voi olla apua.

5. Testimenetelmä on suunniteltu ensisijaisesti erottelemaan yhdestä ainesosasta koostuvan aineen vaikutukset. Jos seoksen testaaminen on kuitenkin tarpeen, on arvioitava, saadaanko testistä hyväksyttäviä tuloksia aiottuun sääntelytarkoitukseen.

6. Ennen testin aloittamista tutkimuksen tekijällä on oltava tietoa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. Tämä on tärkeää etenkin siksi, että voidaan valmistaa vakaita kemikaaliliuoksia. Lisäksi tarvitaan riittävän herkkä analyysimenetelmä testikemikaalien pitoisuuksien varmentamiseen.

TESTIN PERIAATE

7. Testi aloitetaan altistamalla sukukypsistä koiras- ja naaraskaloista (vähintään 12 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) koostuvat lisääntymisparit testikemikaalille kolmeksi viikoksi, jona aikana sitä annostellaan vanhemman sukupolven (F0) organismiin kemikaalin toksikokineettisen käyttäytymisen mukaisesti. Mahdollisimman lähellä neljännen viikon ensimmäistä päivää kerätään munat, joista syntyy F1-sukupolvi. F1-sukupolven kehittymisen aikana (yhteensä 15 viikkoa) arvioidaan kuoriutumista ja eloonjäämistä. Lisäksi kaloista otetaan näytteet 9–10 viikolla hedelmöittymisen jälkeen kehitykseen liittyvien päätetapahtumien tutkimiseksi, ja kutemista arvioidaan kolmen viikon ajan hedelmöittymisen jälkeisillä viikoilla 12–14. F2-sukupolvi luodaan kolmannen viikon jälkeen lisääntymisen arvioinnista, ja sitä kasvatetaan siihen saakka, kunnes kuoriutuminen on tapahtunut.

TESTIN VALIDITEETTIKRITEERIT

8. Testin validiteettiin sovelletaan seuraavia kriteerejä:

— Liuenneen hapen pitoisuus on oltava ≥ 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.

— Veden keskimääräisen lämpötilan on oltava 24–26 °C koko tutkimuksen ajan. Yksittäisten akvaarioiden lyhytaikaiset poikkeamat tästä keskiarvosta saavat olla enintään 2 °C.

— Kummankin sukupolven (F0 ja F1) kontrollien keskimääräisen fekunditeetin on oltava suurempi kuin 20 munaa paria kohti päivässä. Kaikkien arviointijakson aikana tuotettujen munien hedelmällisyyden on oltava enemmän kuin 80 prosenttia. Lisäksi 16 parin suositelluista 24 kontrolliparista (> 65 prosenttia) tulisi tuottaa enemmän kuin 20 munaa paria kohti päivässä.

— Kontrollipareilla munien kuoriutumisasteen on oltava ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) (kummassakin sukupolvessa, F1 ja F2).

— F1-sukupolven osalta kuoriutumisen jälkeisen eloonjääneisyyden kolmannelle hedelmöittymisen jälkeiselle viikolle ja siitä lähtien tutkimuksen päättymiseen saakka (ts. 15. viikko hedelmöittymisen jälkeen) on oltava ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) ja ≥ 90 prosenttia (keskiarvo) vastaavissa kontrolleissa (F1).

— Saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Veden lämpötilan osalta (vaikka se ei olekaan validiteettikriteeri) käsittelyn rinnakkaisnäytteet eivät saa erota toisistaan tilastollisesti, kuten eivät myöskään testin käsittelyryhmät (päivittäisten lämpötilamittausten perusteella ja hetkellisiä poikkeamia huomioon ottamatta).

9. Vaikka suuremmissa pitoisuusryhmissä voi olla havaittavissa lisääntymiskyvyn heikkenemistä, lisääntymisen on kuitenkin oltava riittävää vähintään kolmanneksi suurimman pitoisuuden ryhmässä ja kaikissa sitä pienemmän pitoisuuden ryhmissä F0-sukupolvessa, jotta kuoriutumisinkubaattorit olisivat tarpeeksi täysiä. Lisäksi F1-sukupolven kolmanneksi suurimman pitoisuuden ryhmässä ja sitä pienemmän pitoisuuden altistusryhmissä on oltava riittävästi eloonjääneitä alkioita, jotta päätetapahtumaa voidaan arvioida poikasvaiheen näytteenotossa (ks. 36 ja 38 kohta ja lisäys 9). F1-sukupolven toiseksi suurimman pitoisuuden ryhmässä kuoriutumisen jälkeisen eloonjääneisyyden on täytettävä vähimmäisvaatimus (~20 %). Nämä eivät ole varsinaisia validiteettikriteerejä, vaan suosituksia, jotta voidaan laskea pitävät NOEC-arvot.

10. Jos havaitaan poikkeama testin validiteettikriteereistä, sen vaikutukset testitulosten luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä poikkeamat ja niihin liittyvät näkökohdat on sisällytettävä testiraporttiin.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

11. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a) happi- ja pH-mittarit

b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen

c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan

d) kemiallisesti inertistä materiaalista valmistetut säiliöt, jotka ovat riittävän suuria suhteessa suositeltuun kalamäärään ja kalatiheyteen (ks. lisäys 3)

e) riittävän tarkka vaaka (tarkkuus ± 0,5 mg).

Vesi

12. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji elää ja kasvaa sopivan kauan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testikemikaalia) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, on otettava säännöllisin väliajoin näytteitä määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2}$), torjunta-aineet, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi kuuden kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään olevan suhteellisen vakio. Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin ± 0,5 pH-yksikköä.

Altistusjärjestelmä

13. Altistusjärjestelmän rakennetta ja käytettäviä materiaaleja ei ole määritetty tarkasti. Testijärjestelmän rakentamisessa on käytettävä lasia, ruostumatonta terästä tai muita kemiallisesti inerttejä materiaaleja, eikä järjestelmä ole saanut kontaminoitua edellisissä testeissä. Tähän testiin hyvin sopiva altistusjärjestelmä voi olla esimerkiksi laitteisto, jossa on jatkuva läpivirtaus (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testiliuokset

14. Testikemikaalin varastoliuosta on laitettava altistusjärjestelmään asianmukaisella pumpulla. Varastoliuoksen virtausnopeus on kalibroitava testiliuosten analyyttisten vahvistusten perusteella ennen altistumisen aloittamista, ja se on tarkistettava volymetrisesti säännöllisin väliajoin testin aikana. Kunkin kammion testiliuoksen on vaihduttava asianmukaisesti (esim. tilavuuden on vaihduttava vähintään 5 ja enintään 16 kertaa päivässä tai virtauksen on oltava vähintään 20 ml/min) sen mukaan, millainen on testikemikaalin stabiilius ja veden laatu.

15. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksesta laimentamalla. Varastoliuos tulee valmistaa mieluiten vain sekoittamalla tai ravistamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisin menetelmin (ts. sekoittamalla ja/tai ultraäänellä). Saturaatiopylväitä/-järjestelmiä tai passiivisia annostelumenetelmiä (14) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimien tai kantaja-aineiden käyttöä on pyrittävä välttämään kaikin keinoin, koska 1) tietyt liuottimet voivat aiheuttaa toksisuutta ja/tai ei-toivottuja tai odottamattomia vasteita, 2) kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden ylittävänä määränä (kuten voi usein olla liuottimien käytön yhteydessä) voi johtaa vaikuttavien pitoisuuksien epätarkkoihin määrityksiin, 3) liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi johtaa huomattavaan biokalvon muodostumiseen, joka liittyy mikrobien toimintaan ja voi vaikuttaa ympäristöolosuhteisiin ja altistuspitoisuuksien säilymiseen, ja 4) jollei ole aikaisempia tietoja, jotka osoittavat, ettei liuotin vaikuta tutkimuksen tulokseen, liuottimien käyttö edellyttää liuotinkontrollikäsittelyä, millä on eläinten hyvinvointiin liittyviä seurauksia, koska testin tekemiseen tarvitaan lisää koe-eläimiä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan nro 23 (Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) perusteella. Liuotin valitaan testikemikaalin kemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, onko liuottimen käytöstä saatavana aikaisempia tietoja. Jos liuottimia käytetään kantaja-aineena, asianmukaiset liuotinkontrollit on arvioitava muiden (negatiivisten) kontrollien lisäksi, jotka eivät ole liuottimia (pelkkä laimennusvesi). Jos liuottimen käyttö on välttämätöntä ja mikrobitoimintaa (biokalvon muodostumista) ilmenee, on suositeltavaa kirjata/ilmoittaa biokalvon muodostumista koskevat tiedot säiliötä kohti (vähintään viikoittain) koko testin ajan. Ihannetapauksessa liuotinpitoisuus olisi pidettävä vakiona liuotinkontrollissa ja kaikissa testikäsittelyissä. Jos liuottimen pitoisuus ei pysy vakiona, liuotinkontrollissa on käytettävä testikäsittelyn suurinta liuotinpitoisuutta. Jos käytetään liuotinta kantaja-aineena, suurin liuotinpitoisuus saa olla 100 µl/l tai 100 mg/l (15), mutta liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman pienenä (esim. < 20 µl/l), jotta vältetään liuottimen mahdollinen vaikutus mitattuihin päätetapahtumiin (16).

Koe-eläimet

Kalojen valinta ja hoito

16. Testilajiksi on valittu medaka (*Oryzias latipes*) sen lyhyen elinkaaren ja geneettisen sukupuolen määrittämismahdollisuuden vuoksi. Vaikka muut pienet kalalajit voivat soveltua käytettäväksi samanlaisen testiprotokollan yhteydessä, tässä testimenetelmässä selostetut menetelmät ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään medakaa (ks. 1 kohta). Medakan on jo osoitettu lisääntyvän vankeudessa; sen kasvattamismenetelmiä on julkaistu (17) (18) (19), ja saatavana on tietoja lyhyen aikavälin kuolleisuutta sekä elinkaaren alkuvaihetta ja koko elinkaarta käsittelevistä testeistä (5) (6) (8) (9) (20). Kaloja on pidettävä olosuhteissa, joissa on 16 h valoisaa ja 8 h pimeää. Kaloja ruokitaan elävillä suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) naupliusasteen toukilla, ja tarvittaessa ruokintaa voidaan täydentää kaupallisesti saatavalla hiutaleruoalla. Kaupallisesti saatava hiutaleruoka on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta.

17. Kunhan noudatetaan asianmukaisia eläintenhoitokäytäntöjä, erityistä kasvatusprotokollaa ei tarvita. Medakaa voidaan kasvattaa esimerkiksi kahden litran säiliöissä siten, että yhdessä säiliössä on 240 kalanpoikasta neljänteen hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon saakka. Sen jälkeen niitä kasvatetaan 10 kalan erissä kahden litran säiliötä kohti kahdeksanteen hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon saakka, jolloin ne siirretään lisääntymispareiksi kahden litran säiliöihin.

Totuttautumisvaihe ja kalojen valinta

18. Testikalat on valittava yhdestä laboratoriokannasta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä (huom. tämä totuttautumisvaihe ei ole altistusta edeltävä vaihe *in situ*). Testikalat on suositeltavaa hankkia laboratorion omasta kasvattamosta, koska sukukypsien kalojen kuljettaminen on kaloille stressaavaa ja voi vaikuttaa kutemiseen haitallisesti. Kaloja on ruokittava suolalehtijalkaisten nauplisasteen toukilla kahdesti päivässä tarkkailujakson ja altistusjakson ajan. Tarvittaessa ruokintaa voi täydentää kaupallisesti saatavalla hiutaleruoalla. Tämän testin aloittamiseksi tarvitaan vähintään 42 lisääntyvää paria (54 paria, jos testissä tarvitaan liuotinkontrolli osin sen vuoksi, ettei pelkän liuotittoma nkontrollin käyttöä tukevia aikaisempia tietoja ole), jotta rinnakkaisnäytteitä saadaan riittävästi. Lisäksi jokaisen F0-sukupolven lisääntyvästä parista on varmistettava, että ne ovat XX–XY (ts. että kummallakin sukupuolella on normaali määrä sukupuolikromosomeja), jotta testiin ei vahingossa oteta spontaanisti XX-tyypin koiraita (ks. 39 kohta).

19. Totuttautumisvaiheessa kuolleiden kalojen määrä on kirjattava ylös, ja 48 tunnin asettautumisajan jälkeen on noudatettava seuraavia kriteerejä:

— Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: totuttautumista jatketaan vielä seitsemän päivää kahden viikon totuttautumisvaiheen jälkeen. Jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia näiden seuraavien seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: erä hyväksytään.

20. Kaloille ei tule antaa hoitoa sairauteen testiä edeltävän kahden viikon totuttautumisajan eikä altistusjakson aikana, ja sairauden hoitoa tulee välttää kokonaan, mikäli se on mahdollista. Tutkimuksessa ei tule käyttää kaloja, joilla on merkkejä jostakin sairaudesta. Tiedot havainnoista ja mahdollisista profylaktisista käsittelyistä ja sairauden hoidoista testiä edeltävän kasvatusvaiheen aikana on säilytettävä.

21. Altistusjakso on aloitettava sukupuolisesti dimorfisilla täysikasvuisilla kaloilla, joiden geneettinen sukupuoli on määritetty ja jotka ovat peräisin laboratorion sukukypsien eläinten kannasta, joita on kasvatettu 25 ± 2 °C:ssa. Kalojen on oltava sellaisia, joiden on osoitettu tuottaneen (elinkykyisiä) jälkeläisiä altistusta edeltäneellä viikolla. Testissä käytettävien kalojen koko ryhmän osalta yksittäisten kalojen sukupuolen mukaisen painon on oltava testin alussa ± 20 prosentin sisällä saman sukupuolen aritmeettisesta keskiarvopainosta. Osa kaloista on punnittava ennen testiä keskimääräisen painon arvioimiseksi. Valittujen kalojen on oltava iältään vähintään 12 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen, ja niiden painon on oltava ≥ 300 mg (naaraat) ja ≥ 250 mg (koiraat).

TESTISUUNNITELMA

Testipitoisuudet

22. Testissä on suositeltavaa käyttää viittä kemikaalipitoisuutta ja kontrollia (kontrolleja). Testipitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon kaikki tiedonlähteet, kuten kvantitatiiviset rakenne-aktiivisuussuhteet (QSAR-mallit), vertailutiedot analogeista, tulokset esimerkiksi kalatesteistä akuutti myrkyllisyys kalalle (tämän liitteen luku C.1), kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus (tämän liitteen luku C.48) tai muut testimenetelmät esimerkiksi tämän liitteen luvuissa C.15, C.37, C.41, C.47 tai C.49 (21) (22) (23) (24) (25) (26), mikäli ne ovat saatavilla, tai tarvittaessa tulokset annoksenmääritystestissä, joka sisältää mahdollisesti myös lisääntymisvaiheen. Tarvittaessa voidaan tehdä annoksenmääritystesti samanlaisissa olosuhteissa kuin lopullinen testi (veden laatu, testijärjestelmä, eläinten lukumäärä). Jos liuottimen käyttö on tarpeen ja jos aikaisempia tietoja ei ole saatavilla, annoksenmääritystesti voidaan tehdä liuottimen sopivuuden selvittämiseksi. Suurin testipitoisuus ei saa ylittää 96h-LC50:een liittyvää vesiliukoisuutta 10 mg/l tai 1/10 (27). Pienimmän pitoisuuden on oltava 10–100 kertaa pienempi kuin suurimman pitoisuuden. Viiden pitoisuuden käyttäminen tässä testissä mahdollistaa annos-vastesuhteiden mittaamisen mutta myös LOEC- ja NOEC-arvojen määrittämisen; niitä tarvitaan tietyissä sääntelyohjelmissa tai tietyillä lainkäyttöalueilla riskinarviointiin. Yleensä testikemikaalin nimellispitoisuuksien välinen porrastuskerroin vierekkäisten käsittelytasojen välillä on ≤ 3,2.

Rinnakkaisnäytteet käsittelyryhmissä ja kontrolleissa

23. Yhtä testipitoisuutta kohti on käytettävä vähintään kuusi rinnakkaistestauskammiota (ks. lisäys 7). Lisääntymisvaiheen aikana (F0-sukupolvea lukuun ottamatta) rinnakkaisnäyterakenne kaksinkertaistetaan fekunditeetin arviointia varten, ja jokaisessa rinnakkaisnäytteessä on vain yksi lisääntyvä pari (ks. 42 kohta).

24. Testipitoisuuksien lisäksi on tehtävä laimennusvesikontrolli ja tarvittaessa liuotinkontrolli. Kontrolleissa on käytettävä kaksinkertaista määrää rinnakkaisnäytekammioita, jotta varmistetaan riittävä tilastollinen voima (ts. kontrolleissa on oltava vähintään 12 rinnakkaisnäytettä). Lisääntymisvaiheessa kontrollien rinnakkaisnäytteiden määrä kaksinkertaistetaan (ts. vähintään 24 rinnakkaisnäytettä, ja jokaisessa rinnakkaisnäytteessä on vain yksi kuteva pari). Lisääntymisen jälkeen kontrollirinnakkaisnäytteissä saa olla enintään 20 alkiota (kalaa).

MENETTELY

Testin aloittaminen

25. Ne lisääntymisaktiiviset aikuiset kalat, joita käytetään testin F0-sukupolven luomisessa, valitaan kahdella kriteerillä, jotka ovat ikä (yleensä yli 12 viikkoa mutta ei mielellään yli 16:ta viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) ja paino (pitää olla naarailla ≥ 300 mg ja koirailla ≥ 250 mg).

26. Nämä spesifikaatiot täyttävät naaras-koirasparit siirretään yksittäisinä pareina kuhunkin rinnakkaisnäytteenä toimivaan säiliöön. Testin alkaessa kontrolleissa on oltava 12 rinnakkaisnäytettä ja kemikaalikäsittelyissä kuusi. Nämä säiliöt jaetaan satunnaisesti käsittelyyn (ts. T1–T5 ja kontrolli) ja rinnakkaisnäytteisiin (ts. kontrollit A–L ja altistukset A–F), ja ne liitetään altistusjärjestelmään, jossa on asianmukainen virtaus jokaiseen säiliöön.

Altistumisolosuhteet

27. Perusteellinen yhteenveto testiparametreista ja -olosuhteista on lisäyksessä 3. Kun näitä spesifikaatioita noudatetaan, kontrollikalojen osalta päätetapahtumien arvojen tulisi olla lisäyksessä 4 lueteltujen mukaiset.

28. Testin aikana on mitattava liuennut happi, pH ja lämpötila vähintään yhdestä testiastiasta jokaisessa käsittelyryhmässä ja kontrollissa. Lämpötilaa lukuun ottamatta nämä mittaukset on tehtävä vähintään kerran viikossa altistusjakson ajan. Keskimääräinen veden lämpötila on oltava 24–26 °C testin ajan ja koko tutkimuksen keston ajan. Altistusjaksolla lämpötila on mitattava joka päivä. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin ± 0,5 pH-yksikköä. Käsittelyn rinnakkaisnäytteet eivät saa erota toisistaan tilastollisesti, kuten eivät myöskään testin käsittelyryhmät (päivittäisten lämpötilamittausten perusteella ja hetkellisiä poikkeamia huomioon ottamatta).

Altistusaika

29. Testissä altistetaan sukukypsät kalat F0-sukupolvesta kolmen viikon ajaksi. Viikolla 4, suurin piirtein testipäivänä 24, luodaan sukupolvi F1 ja F0-sukupolven lisääntymisparit lopetetaan humaanisti ja niiden paino ja pituus merkitään muistiin (ks. 34 kohta). Tämän jälkeen F1-sukupolvi altistetaan vielä 14 viikon ajaksi (F1-sukupolven altistusaika on siis yhteensä 15 viikkoa) ja F2-sukupolvi kahdeksi viikoksi kuoriutumiseen saakka. Testin kokonaiskesto on yleensä 19 viikkoa (ts. F2-sukupolven kuoriutumiseen saakka). Testin aikajanat ovat taulukossa 2, ja niitä on selostettu tarkemmin lisäyksessä 9.

Ruokinta

30. Kaloja voidaan ruokkia suolalehtijalkaisilla (*Artemia* spp.) (24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla) *ad libitum*, ja lisäksi niille voidaan antaa kaupallisesti saatavilla olevaa hiutaleruokaa tarvittaessa. Kaupallisesti saatava hiutaleruoka on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta (esimerkiksi orgaanisia klooriyhdisteitä sisältävät torjunta-aineet, polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH-yhdisteet), polyklorinoidut bifenyylit (PCB-yhdisteet)). Sellaista ruokaa, joka sisältää tavallista enemmän endokriinisesti aktiivisia aineita (kuten fytoestrogeeneja), on vältettävä, koska ne voivat vaarantaa testin vasteen. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet on poistettava testiastioista tarvittaessa; kunkin säiliön pohja on puhdistettava huolellisesti esimerkiksi käyttämällä lappoa. Myös kunkin säiliön seinät ja pohja on puhdistettava kerran tai kahdesti viikossa (esimerkiksi lastalla pyyhkimällä). Lisäyksessä 5 on esimerkki ruokinta-aikataulusta. Ruokintatiheys määräytyy sen mukaan, montako kalaa kussakin rinnakkaisnäytteessä on. Näin ollen ruokintatiheyttä harvennetaan, jos rinnakkaisnäytteestä kuolee kaloja.

Analyyttiset määritykset ja mittaukset

31. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti. Kaikki analyysimenetelmät on määritettävä, ja kemikaalin stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin, mieluiten vähintään joka viikko jokaisen käsittelyryhmän yhdestä rinnakkaisnäytteestä siten, että saman käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteissä vuorotellaan joka viikko.

32. Lisäksi testin aikana on seurattava laimennus- ja varastoliuoksen virtausnopeutta sopivin väliajoin (kuitenkin vähintään kolme kertaa viikossa). Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus liuoksessa on kuitenkin hyväksyttävästi ±20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia. Jos kemikaalit ovat sellaisia, että ne kertyvät kaloihin selvästi, testipitoisuuksia voidaan pienentää kalojen kasvaessa. Tällöin on myös suositeltavaa mukauttaa testiliuoksen vaihtumisnopeutta jokaisessa kammiossa, jotta testipitoisuudet pysyvät mahdollisimman vakaina.

Havainnot ja mitattavat päätetapahtumat

33. Mitattavia päätetapahtumia ovat fekunditeetti, hedelmällisyys, kuoriutuminen, kasvu ja eloonjääneisyys, ja niiden avulla arvioidaan mahdollisia populaatiotason vaikutuksia. Myös käyttäytymistä tulee havainnoida päivittäin, ja poikkeava käyttäytyminen on merkittävä muistiin. Muita mekanistisia päätetapahtumia ovat maksan vitellogeniinin mRNA:n tai vitellogeniiniproteiinin arvot, jotka mitataan immunomäärityksellä (28), fenotyyppisen sukupuolen tunnusmerkit, kuten koiraille tunnusomaiset peräevän papillit, sukurauhasten histologinen arviointi sekä munuaisten, maksan ja sukurauhasten histopatologinen arviointi (ks. päätetapahtumaluettelo taulukosta 1). Kaikki nämä päätetapahtumat arvioidaan kalayksilön geneettisen sukupuolen määrittämisen valossa sen perusteella, onko kalalla medakan koirassukupuolen määrittävä geeni *dmy* vai ei (ks. 41 kohta). Myös kutemisaika arvioidaan. Lisäksi voidaan johtaa yksinkertaiset fenotyyppisen sukupuolen osuudet peräevapapillien määrää koskevien tietojen perusteella: näin yksittäinen medaka voidaan määrittää fenotyypiltään joko koiraaksi tai naaraaksi. Tällä testimenetelmällä ei havaita vähäisiä poikkeamia odotuksenmukaisesta sukupuolten suhteesta: kalojen määrä rinnakkaisnäytteissä on melko pieni, eikä siitä saada riittävästi tilastollista voimaa. Histopatologisen arvioinnin aikana tutkitaan myös sukurauhaset ja tehdään tavallista paljon todistusvoimaisempia analyyseja sukurauhasten fenotyypin arviointia varten geneettisen sukupuolen valossa.

34. Tämän testimenetelmän ensisijainen tarkoitus on arvioida, onko testikemikaalilla mahdollisia populaation kannalta merkityksellisiä vaikutuksia. Mekanistisista päätetapahtumista (VTG, sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja tietyt sukurauhasiin kohdistuvat histopatologiset vaikutukset) voi olla apua sen määrittämisessä, välittyykö jokin vaikutus mahdollisesti hormonitoiminnan kautta. Systeemiset ja muunlaiset toksisuudet voivat kuitenkin vaikuttaa mekanistisiin päätetapahtumiin. Siksi maksan ja munuaisten histopatologiaa voidaan arvioida tavallista tarkemmin, jotta mekanistisiin päätetapahtumiin liittyviä vasteita ymmärrettäisiin paremmin. Jos näitä tarkkoja arviointeja ei tehdä, histopatologisen tutkimuksen aikana sattumalta havaitut selvät poikkeavuudet on kuitenkin merkittävä muistiin ja raportoitava.

Kalojen humaani lopettaminen

35. Kun F0- ja F1-sukupolvien altistus on päättynyt ja kun poikasista on otettu näytteet, kalat on lopetettava riittävällä määrällä nukutusliuosta (esimerkiksi trikaiinimetaanisulfonaatilla (MS-222, CAS-nro 886-86-2), 100–500 mg/l), joka on puskuroitu $NaHCO_3$:lla (300 mg/l) (natriumbikarbonaatti, CAS-nro 144-55-8) limakalvoärsytyksen vähentämiseksi. Jos kaloissa on merkkejä huomattavasta kärsimyksestä (hyvin vakavasta ja kuolemaa selvästi ennakoivasta) ja jos ne ovat kuolemaisillaan, ne on nukutettava ja lopetettava. Aineiston analyysissa niitä on käsiteltävänä kuolemantapauksina. Jos kala lopetetaan sairauden vuoksi, se on merkittävä muistiin ja raportoitava. Sen mukaan, missä vaiheessa tutkimusta kala lopetetaan, se voidaan säilyttää histopatologista analyysia varten (jolloin se käsitellään kiinnitysaineella mahdollista histopatologista tutkimusta varten).

Mätimunien ja kalanpoikasten käsittely

Mätimunien kerääminen lisääntyviltä pareilta seuraavan sukupolven luomista varten

36. Munat kerätään testiviikon 4 ensimmäisenä päivänä (tai tarvittaessa kahtena ensimmäisenä päivänä), jolloin F0-sukupolvi vaihtuu F1-sukupolveksi, ja testiviikon 18 ensimmäisenä päivänä, jolloin F1-sukupolvi vaihtuu F2-sukupolveksi. Testiviikko 18 vastaa F1-sukupolvella aikuista kalaa, jonka ikä on 15 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen. On tärkeää, että kaikki munat poistetaan kaikista säiliöistä päivää ennen kuin munat kerätään, jotta varmistetaan, että kaikki lisääntyvältä parilta kerättävät munat ovat peräisin yhdestä kudusta. Kutemisen jälkeen naarasmedaka kantaa muniaan joskus sukupuoliaukon lähellä, kunnes se voi laskea munat substraattiin. Jos säiliössä ei ole substraattia, munat ovat joko naaraaseen kiinnittyneinä tai säiliön pohjalla. Munien sijainnin mukaan ne joko irrotetaan naaraasta varovasti tai kerätään säiliön pohjalta lapolla F0-sukupolven osalta testiviikolla 4 ja F1-sukupolven osalta testiviikolla 18. Kaikki käsittelysäiliöistä kerätyt munat yhdistetään, ennen kuin ne jaetaan inkubaatiokammioihin.

37. Mätimunia yhdistävät rihmat on poistettava. Jokaiselta lisääntyvältä parilta (1 pari rinnakkaisnäytettä kohti) kerätään hedelmöittyneitä munia (enintään 20), jotka yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti sopiviin inkubaatiokammioihin (lisäys 6, 7). Laadukkaalla dissektiomikroskoopilla voidaan nähdä merkkejä varhaisesta hedelmöittymisestä/kehityksestä. Niitä ovat esimerkiksi korionin muodostuminen, meneillään oleva solun jakautuminen tai rakkulan muodostuminen. Inkubaatiokammiot voidaan laittaa kullekin käsittelylle tarkoitettuihin erillisiin inkubaattoriakvaarioihin (jolloin veden laadun parametrit ja testikemikaalien pitoisuudet on mitattava niissä) tai rinnakkaisakvaarioon, jossa säilytetään kuoriutuneita kalanpoikasia (ns. vapaasti liikkuvia alkioita). Jos tarvitaan toinen keräyspäivä (testipäivä 23), kaikki mätimunat kummaltakin päivältä on yhdistettävä ja jaettava sen jälkeen järjestelmällisesti kuhunkin käsittelyrinnakkaisnäytteeseen.

Mätimunien kasvatus kuoriutumiseen saakka

38. Hedelmöittyneitä munia ravistellaan munainkubaattorissa koko ajan esimerkiksi ilmakuplilla tai keinuttamalla inkubaattoria pystysuunnassa. Kuolleet hedelmöittyneet munat (alkiot) tarkistetaan ja kirjataan päivittäin. Kuolleet munat poistetaan inkubaattoreista (lisäys 9). Ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään seitsemäntenä päivänä hedelmöittymisen jälkeen, jotta hedelmöittyneet munat pääsevät laskeutumaan inkubaattorin pohjalle. Tämä edistää kuoriutumista, joka tapahtuu yleensä parin seuraavan päivän aikana. Jokaisesta käsittely- ja kontrollisäiliöstä lasketaan kuoriutuneet (nuoret kalanpoikaset; vapaasti liikkuvat alkiot) (yhdistetyt rinnakkaisnäytteet). Hedelmöittyneet munat, jotka eivät ole kuoriutuneet, kun kontrollin kuoriutumisen mediaanipäivästä on kulunut kaksi kertaa niin pitkä aika (yleensä 16 tai 18 päivää hedelmöittymisen jälkeen), katsotaan elinkyvyttömiksi ja hävitetään.

39. Jokaiseen rinnakkaisnäytesäiliöön siirretään 12 kalanpoikasta. Inkubaatiokammioiden kalanpoikaset yhdistetään ja jaetaan järjestelmällisesti rinnakkaisnäytesäiliöihin (lisäys 7). Tämä voidaan tehdä valitsemalla käsittelyryhmästä kalanpoikanen satunnaisesti ja lisäämällä sen jälkeen rinnakkaisakvaarioon kalanpoikanen sattumanvaraisesti. Jokaisessa säiliössä on oltava yhtä monta (n=12) kuoriutunutta kalanpoikasta (enintään 20 poikasta / säiliö). Jos kalanpoikasia ei ole tarpeeksi täyttämään kaikki käsittelyrinnakkaisnäytteet, kalanpoikaset kannattaa jakaa niin, että mahdollisimman monessa näytteessä on 12 poikasta. Kalanpoikasia voidaan käsitellä turvallisesti isoilla lasipipeteillä. Mahdolliset ylimääräiset kalanpoikaset lopetetaan humaanisti nukutusaineella. Lisääntyvien parien muodostamista edeltävän muutaman viikon aikana päivä, jona ensimmäinen kututapahtuma huomataan kussakin rinnakkaisnäytteessä, on merkittävä muistiin.

Lisääntyvien parien lajitteleminen

Evien leikkaaminen ja genotyyppisen sukupuolen määrittäminen

40. Genotyyppinen sukupuoli määritetään eväleikkeistä viikolla 9–10 hedelmöittymisen jälkeen (ts. F1-sukupolven osalta testiviikoilla 12–13). Kaikki säiliössä olevat kalat nukutetaan (käyttämällä hyväksyttyjä menetelmiä, kuten IACUCia), ja jokaiselta kalalta otetaan pyrstöevän selän- tai vatsanpuoleisesta kärjestä pieni kudosnäyte kyseisen yksilön genotyyppisen sukupuolen määrittämistä varten (29). Rinnakkaisnäytteen kalat voidaan laittaa pieniin häkkeihin (jos mahdollista, yksi kala yhteen häkkiin) rinnakkaisnäytesäiliöön. Kuhunkin häkkiin voidaan laittaa myös kaksi kalaa, jos ne ovat selvästi erotettavissa toisistaan. Yksi keino siihen on leikata pyrstöevä (ts. selän- tai vatsanpuoleinen kärki) eri tavalla kudosnäytettä otettaessa.

41. Medakan genotyyppinen sukupuoli määritetään tunnistetun ja sekvensoidun, Y-kromosomissa sijaitsevan geenin (*dmy*) perusteella. Jos kalalla on *dmy*-geeni, kyseessä on XY-yksilö, fenotyypistä riippumatta, ja jos *dmy*-geeniä ei ole, kyseessä on XX-yksilö, fenotyypistä riippumatta (30); (31). Jokaisesta eväleikkeestä uutetaan deoksiribonukleiinihappo (DNA), ja dmy-geenin olemassaolo tai sen puuttuminen voidaan määrittää polymeraasiketjureaktiomenetelmillä (PCR) (ks. tämän liitteen C.41 luvussa oleva lisäys 9 tai lisäykset 3 ja 4 lähdeviitteessä (29)).

Lisääntyvien parien muodostaminen

42. Genotyyppistä sukupuolta koskevia tietoja käytetään lisääntyvien XX-XY-parien muodostamiseen riippumatta niiden ulkoisesta fenotyypistä, jota testikemikaalille altistuminen voi muuttaa. Sinä päivänä, jona kunkin kalan genotyyppinen sukupuoli määritetään, jokaisesta rinnakkaisnäytteestä valitaan kaksi XX-kalaa ja kaksi XY-kalaa satunnaisesti, ja niistä muodostetaan kaksi lisääntyvää XX-XY-paria. Jos rinnakkaisnäytteessä ei ole kahta XX-kalaa tai kahta XY-kalaa, tarvittava kala on otettava muista kemikaalikäsittelyn rinnakkaisnäytteistä. Tärkeintä on, että kaikissa käsittelynäytteissä ja kontrolleissa on suositeltu määrä (12 kpl) lisääntyviä pareja (24). Kaloja, joilla on selviä poikkeavuuksia (uimarakkoon liittyviä ongelmia, epämuodostunut selkäranka, suuria koonvaihteluita jne.), ei tule valita lisääntyviin pareihin. F1-sukupolven lisääntymisvaiheessa kussakin rinnakkaissäiliössä tulee olla vain yksi lisääntyvä pari.

Poikasvaiheen näytteenotto ja päätetapahtumien arviointi

Näytteenotto kaloilta, joita ei käytetä lisääntyvissä pareissa

43. Kun lisääntyvät parit on lajiteltu, kalat, joita ei käytetä lisääntymiseen, lopetetaan humaanisti, ja niiltä mitataan poikasvaiheen päätetapahtumat testiviikoilla 12–13 (F1). On hyvin tärkeää, että kaloja käsitellään siten, että lisääntyvien parien valinnassa määritetty kunkin kalayksilön genotyyppinen sukupuoli voidaan aina jäljittää. Kaikki kerättävät tiedot analysoidaan tietyn kalan genotyyppisen sukupuolen perusteella. Jokaiselta kalalta mitataan useita päätetapahtumia: kalanpoikasten eloonjäämisen määritys (testiviikot 7–12/13 (F1)), pituuskasvu (vakiopituusvoidaan

mitata, jos pyrstöevää on lyhennetty geneettisen sukupuolen analysointiin liittyvässä näytteenotossa). Kokonaispituus voidaan mitata, jos pyrstöevästä on otettu *dmy*-geenin määrittämistä varten näytteeksi vain osa selkä- tai vatsapuolelta. Lisäksi punnitaan paino (märkäpaino ja taputtelemalla kuivatun kalan paino) ja määritetään maksan *vtg*:n mRNA (tai VTG) ja peräevän papillit (ks. taulukot 1 ja 2). Lisääntyvien parien paino- ja pituustietoja tarvitaan myös käsittelyryhmän keskimääräisen kasvun laskemisessa.

Kudosnäytteet ja vitellogeniinin mittaus

44. Maksa dissekoidaan, ja se on säilytettävä ≤ −70 °C:ssa *vtg* mRNA- (tai VTG) -mittauksiin saakka. Kalan pyrstö, myös peräevä, säilötään asianmukaiseen kiinnitysaineeseen (esim. Davidsonin kiinnitysaine) tai valokuvataan siten, että peräevän papillit voidaan laskea myöhemmin. Haluttaessa näytteitä voidaan ottaa myös muista kudoksista (esim. sukurauhasista) ja säilöä samalla. Maksan VTG-pitoisuus on kvantifioitava homologisella ELISA-tekniikalla (ks. medakan osalta suositellut menettelyt tämän liitteen C.48 luvun lisäyksestä 6). Vaihtoehtoisesti vtg:n mRNA:n kvantifioinnissa (ts. *vtg I* -geenin mRNA:n uuttaminen maksanäytteestä ja sen kopioiden lukumäärän laskeminen (yksikössä ng kokonais-mRNA:sta) kvantitatiivisella PCR:llä) voidaan käyttää Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston EPA:n kehittämiä menetelmiä (29). Siihen nähden, että määritetään *vtg*-geenin kopioiden lukumäärä kontrolli- ja käsittelyryhmistä, vähemmän resursseja vievä ja teknisesti helpompi menetelmä on määrittää vtg I:n suhteellinen muutos (kerroin) kontrolli- ja käsittelyryhmissä.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

45. Normaaleissa olosuhteissa vain sukukypsillä koirasmedakoilla on papilleja, jotka kehittyvät peräevän tiettyjen ruotojen liitoslevyihin sekundaarisina sukupuoliominaisuuksina, ja ne ovat mahdollinen biomarkkeri hormonaalisille haittavaikutuksille. Peräeväpapillien (papillien lukumäärä liitoslevyineen) laskentamenetelmä esitetään lisäyksessä 8. Peräeväpapillien lukumäärää käytetään myös luokiteltaessa kyseinen yksilö ulkoisesti fenotyyppiseksi koiraaksi tai naaraaksi, kun lasketaan yksinkertainen sukupuolten välinen suhde yhtä rinnakkaisnäytettä kohti. Medaka, jolla on yksikin papilli (enemmän kuin 0), määritetään koiraaksi, kun taas medaka, jolla ei ole yhtään (0) peräeväpapillia, määritetään naaraaksi.

Fekunditeetin ja hedelmällisyyden arviointi

46. Fekunditeettia ja hedelmällisyyttä arvioidaan F0-sukupolven osalta testiviikoilla 1–3 ja F1-sukupolven osalta testiviikoilla 15–17. Kultakin lisääntyvältä parilta kerätään munat 21 peräkkäisenä päivänä. Munat otetaan haavissa olevilta naarailta varovasti ja/tai lapolla akvaarion pohjalta joka aamu. Tiedot jokaisen rinnakkaisnäytteen lisääntyvän parin fekunditeetista ja hedelmällisyydestä kirjataan päivittäin. Fekunditeetti määritellään kutuvaiheessa laskettujen mätimunien määräksi, ja hedelmällisyys määritellään toiminnallisesti hedelmöittyneiden ja elinkykyisten munien määräksi laskentahetkellä. Määrät on laskettava mahdollisimman pian munien keräämisen jälkeen.

47. Rinnakkaisnäytteen fekunditeetti kirjataan päivittäin yhden lisääntyvän parin munien määränä, ja se analysoidaan suositelluilla tilastomenetelmillä rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja käyttäen. Rinnakkaisnäytteen hedelmällisyys on lisääntyvän parin tuottamien hedelmöittyneiden munien määrän summa jaettuna kyseisen parin tuottaminen munien määrän summalla. Tilastollisesti hedelmällisyys analysoidaan rinnakkaisnäytteiden välisenä suhteena. Rinnakkaisnäytteiden kuoriutuvuus on kalanpoikasten lukumäärä jaettuna testiin otettujen alkioiden lukumäärällä (yleensä 20). Tilastollisesti kuoriutuvuutta analysoidaan rinnakkaisnäytteiden välisenä suhteena.

Näytteenotto täysikasvuisilta kaloilta ja päätetapahtumien arviointi

Näytteenotto lisääntyvien parien kaloilta

48. Testiviikon 17 jälkeen (kun F2-sukupolvi on saatu luotua onnistuneesti) F1-sukupolven täysikasvuiset kalat lopetetaan humaanisti, ja niiltä mitataan eri päätetapahtumat (ks. taulukot 1 ja 2). Peräevä kuvataan peräeväpapillien arviointia varten (ks. lisäys 8), ja/tai pyrstö poistetaan heti sukupuoliaukon takaa ja kiinnitetään kiinnitysaineella, jotta papillit voidaan laskea myöhemmin. Pyrstöevästä voidaan ottaa osa näytteeksi ja laittaa se talteen geneettisen sukupuolen (*dmy*) vahvistamista varten, jos se on tarpeen. Tarvittaessa voidaan ottaa kudosnäyte *dmy*-analyysin toistamista varten tietyn kalan geneettisen sukupuolen vahvistamiseksi. Kalan ruumiin ontelo avataan, jotta asianmukaiset kiinnitysaineet (esim. Davidsonin aine) pääsevät tunkeutumaan kudoksiin, ennen kuin koko kala upotetaan kiinnitysaineeseen. Jos ennen kiinnittämistä tehdään asianmukainen permeabilisointivaihe, ruumiin onteloa ei tarvitse avata.

Histopatologia

49. Jokaisesta kalasta tutkitaan histologisesti sukurauhaskudoksen patologia (30); (29). Kuten 33 kohdassa on todettu, systeemiset tai muunlaiset toksisuudet voivat vaikuttaa muihin tässä testissä arvioitaviin mekanistisiin päätetapahtumiin (ts. VTG, sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja tietyt sukurauhasten histopatologiset vaikutukset). Siksi maksan ja munuaisten histopatologiaa voidaan arvioida tavallista tarkemmin, jotta mekanistisiin päätetapahtumiin liittyviä vasteita ymmärrettäisiin paremmin. Jos näitä tarkkoja arviointeja ei tehdä, histopatologisen tutkimuksen aikana sattumalta havaitut selvät poikkeavuudet on kuitenkin merkittävä muistiin ja raportoitava. Suurimman pitoisuuden käsittelyryhmän (kontrolliin verrattuna) ja sen ryhmän välinen vertailu, jossa vaikutuksia ei havaittu, voidaan tehdä, mutta sen osalta suositellaan tutustumaan histopatologisia tutkimuksia koskeviin ohjeisiin (29). Yleensä kaikki näytteet käsitellään/valmistellaan ensin, minkä jälkeen patologi tutkii ne. Jos käytetään vertailuun perustuvaa lähestymistapaa, on muistettava, että Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) -menettelyssä oletetaan, että kun annoksen suuruus kasvaa, myös biologinen vaikutus (patologia) voimistuu. Testin selitysvoima siis heikkenee, jos siinä tarkastellaan vain yhtä suurta annosta eikä ollenkaan keskisuuria annoksia. Jos tilastoanalyysia ei tarvita sen määrittämiseksi, ettei suurella annoksella ole vaikutusta, tämä lähestymistapa voi olla hyväksyttävä. Sukurauhasten fenotyyppi johdetaan myös tämän arvioinnin perusteella.

Muut havainnot

50. Tästä tutkimuksesta saadaan tietoja, joita voidaan käyttää (esimerkiksi näyttöön perustuvassa lähestymistavassa) vähintään näiden kahden, lisääntymiskyvyn heikentymiseen johtavan yleisen haittavaikutusreitin samanaikaisessa arvioinnissa: a) hormonivälitteiset reitit, joihin liittyy hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakselin häiriintyminen, ja b) reitit, jotka lyhentävät elinaikaa ja vähentävät kasvua (pituus ja paino). Lisäksi voidaan arvioida muun kuin hormonivälitteisen toksisuuden vaikutuksia lisääntymiseen. Tähän testiin sisältyy myös päätetapahtumia, joita yleensä arvioidaan pitkäaikaisissa toksisuustesteissä (täyden elinkaaren testi ja varhaisen elinvaiheen testi), ja niiden avulla voidaan arvioida vaaroja, joita aiheuttavat sekä muut kuin hormonivälitteiset toksiset vaikutustavat että hormonivälitteisen toksisuuden reitit. Testin aikana myös käyttäytymistä tulee havainnoida päivittäin, ja poikkeava käyttäytyminen on merkittävä muistiin. Lisäksi on kirjattava kaikki kuolleet ja eloonjääneet kalat niiden karsintaan saakka (testiviikko 6/7), elossa olevat kalat karsinnan jälkeen poikasvaiheen näytteenottoon saakka (hedelmöittymisen jälkeinen viikko 9–10) ja elossa olevat kalat kutemisesta täysikasvuisten kalojen näytteenottoon saakka on laskettava.

Taulukko 1

Yhteenveto MEOGRT-testin päätetapahtumista (*)

Elinkaaren vaihe	Päätetapahtuma	Sukupolvi
Alkio (hjv 2)	Kuoriutuminen (% ja kuoriutumisaika)	F1, F2
Juveniili (hjv 4)	Eloonjääneisyys	F1
Poikanen (hjv 9 tai 10)	Eloonjääneisyys	F1
	Kasvu (pituus ja paino)	
	Vitellogeniini (mRNA tai proteiini)	
	Sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit)	
	Ulkoisen sukupuolen suhde	
	Aika ensimmäiseen kutuun	
Aikuinen (hjv 12–14)	Lisääntyminen (fekunditeetti ja hedelmällisyys)	F0, F1
Aikuinen (hjv 15)	Eloonjääneisyys	F1
	Kasvu (pituus ja paino)	
	Sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit)	
	Histopatologia (sukurauhaset, maksa, munuaiset)	

(*) Nämä päätetapahtumat on analysoitavat tilastollisesti.

AIKAJANA

51. Taulukossa 2 on MEORGT-testin aikajana. MEOGRT-testissä F0-sukupolven aikuisten altistus kestää neljä viikkoa. F1-sukupolven altistus kestää 15 viikkoa, ja F2-sukupolven altistusaika kestää kuoriutumiseen saakka (hjv 2). Lisäyksessä 9 on yhteenveto MEORGT-testin aikana tehtävistä toimista.

Taulukko 2

MEORGT-testin altistusajat ja päätetapahtumien mittaamisen aikajana

MEORGT-testin altistusajat ja päätetapahtumien aikajana

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Testiviikko	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Elinkaaren tunniste					**Alkio**					**Ruskuaispussipoikaset**					**Juveniili**			**Poikanen**	**Aikuinen**
Päätetapahtumat																			
Fekunditeetti	F_0														F_1				
Hedelmällisyys	F_0														F_1				
Kuoriutuminen					F_1														F_2
Eloonjääneisyys						F_1						F_1						F_1	
Kasvu				F_0								F_1						F_1	
Vitellogeniini												F_1							
Sekundaarinen sukupuoli												F_1						F_1	
Histopatologia																		F_1	
Testiviikko	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Testissä on 7 rinnakkaisnäyteryhmää
  - 5 ryhmää testikemikaalikäsittelyille
  - 2 ryhmää kontrollikäsittelyille (4, jos käytetään liuotinta)
- Ryhmän rakenne
  - 12 rinnakkaisnäytettä lisääntymisen, aikuisten patologian ja SSO:n tutkimiseen (vkt 10–18)
  - 6 rinnakkaisnäytettä kuoriutumisen, eloonjäämisen, vtg:n ja poikasten SSO:n ja kasvun tutkimiseen (vkt 1–9)

SSO: sekundaariset sukupuolisominaisuudet; vkt: viikot; vtg: vitellogeniini

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tilastoanalyysi

52. Koska genotyyppinen sukupuoli määritetään kaikilta testikaloilta, tiedot on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen (ts. XY: koiraat ja XX: naaraat). Jos näin ei tehdä, kaikkien analyysien tilastollinen voima heikkenee tuntuvasti. Aineiston tilastollisissa analyyseissa on noudatettava mieluiten menettelyjä, jotka on kuvattu OECD:n julkaisussa Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (32). Lisäyksessä 10 on muita ohjeita tilastollisista analyyseista.

53. Testin rakenteen ja tilastollisten testien valinnan tulisi mahdollistaa riittävä voima, jotta havaitaan biologisesti tärkeät muutokset sellaisissa päätetapahtumissa, joista on ilmoitettava NOEC-arvo (32). Se, miten oleelliset vaikuttavat pitoisuudet ja parametrit pitää ilmoittaa, voi vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Jokaisesta päätetapahtumasta on määritettävä prosentuaalinen muutos, joka on tärkeää havaita tai arvioida. Koesuunnitelma on mukautettava siten, että se on mahdollista. Ei ole todennäköistä, että sama prosentuaalinen muutos koskisi kaikkia päätetapahtumia. Ei ole myöskään todennäköistä, että voitaisiin suunnitella toteutuskelpoinen testi, joka täyttäisi nämä kriteerit kaikkien päätetapahtumien osalta, joten on tärkeää keskittyä niihin päätetapahtumiin, jotka ovat kussakin kokeessa tärkeitä, jotta se voidaan suunnitella asianmukaisesti. Lisäyksessä 10 on malli tilastollisesta vuokaaviosta ja ohjeet, jotka on tarkoitettu avuksi aineiston käsittelyyn ja sopivimman tilastollisen testin tai mallin valintaan. Muitakin tilastomenetelmiä saa käyttää, jos ne ovat tieteellisesti perusteltavissa.

54. Variaatiot on analysoitava kussakin rinnakkaisnäytesarjassa varianssianalyysillä tai kontingenssitaulukkomenetelmillä, ja analyysiin perustuvia riittävän asianmukaisia tilastollisia analyysimenetelmiä on käytettävä. Jotta voidaan tehdä useita vertailuja yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien tulosten välillä, jatkuvien vasteiden osalta on suositeltavaa käyttää askeltavaa menetelmää (esimerkiksi Jonckheere-Terpstran testiä). Jos tiedot eivät ole yhdenmukaiset monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa, tulee käyttää Dunnettin testiä tai Dunnin testiä (tarvittaessa tietojen asianmukaisen muuntamisen jälkeen).

55. Fekunditeetin osalta mätimunien määrä lasketaan päivittäin, mutta ne voidaan analysoida kokonaismäärinä tai toistuvana mittauksena. Lisäyksessä 10 on tarkempia tietoja siitä, miten tämä päätetapahtuma analysoidaan. Sellaisia histopatologisia tietoja varten, jotka esitetään vakavuuspisteinä, on kehitetty uusi tilastollinen testi, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Kaikki kemikaalikäsittelyissä havaitut päätetapahtumat, jotka poikkeavat asianmukaisista kontrolleista huomattavasti, on ilmoitettava.

Tietojen analysointiin liittyviä näkökohtia

Vaarantuneiden käsittelytasojen käyttö

57. Useita tekijöitä otetaan huomioon, kun määritetään, esiintyykö rinnakkaisnäytteessä tai koko käsittelyssä selvää toksisuutta, jolloin ne tulisi poistaa analyysista. Selväksi toksisuudeksi määritellään > 4 kuolemantapausta missä tahansa näytteessä kolmannen ja yhdeksännen hjv:n välillä, kun niitä ei voida selittää teknisellä virheellä. Muita selvän toksisuuden merkkejä ovat verenvuoto, epänormaali käyttäytyminen, epänormaalit uintikuviot, ruokahaluttomuus ja muut sairaudesta kertovat kliiniset merkit. Subletaalin toksisuuden merkkien osalta laadulliset arvioinnit voivat olla tarpeen, ja niissä on otettava aina huomioon laimennusveden kontrolliryhmä (pelkkä puhdas vesi). Jos suurimman pitoisuuden käsittelyssä (käsittelyissä) esiintyy selvää toksisuutta, on suositeltavaa jättää nämä käsittelyt pois analyysista.

Liuotinkontrollit

58. Liuottimen käyttöä on harkittava vasta viimesijaisena keinona, kun kaikki muut kemikaalin annosteluvaihtoehdot on kokeiltu. Jos liuotinta käytetään, sen kanssa on käytettävä laimennusvesikontrollia. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset. Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja laimennusvesikontrolliryhmää tilastollisesti. Tärkeimmät tässä analyysissa huomioon otettavat päätetapahtumat ovat kasvuparametrit (paino), koska yleistyneet toksisuusvaikutukset saattavat vaikuttaa niihin. Jos laimennusvesikontrollin ja liuotinkontrollin ryhmien välillä havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja näissä päätetapahtumissa, sen määrittämisessä, onko testin validiteetti vaarantunut, on käytettävä parasta tieteellistä asiantuntemusta. Jos kahden kontrollin välillä on eroja, kemikaalille altistettuja käsittelyjä on verrattava liuotinkontrolliin, ellei tiedetä, että laimennusvesikontrolliin vertaaminen on parempi vaihtoehto. Jos näiden kahden kontrolliryhmän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, suositellaan, että testikemikaalille altistettuja käsittelyjä verrataan yhdistettyihin (liuotin- ja laimennusvesi-)kontrolliryhmiin, ellei tiedetä, että vain jompaankumpaan vertaaminen on parempi vaihtoehto.

Testiraportti

59. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali: fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— kemialliset tunnistetiedot.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne. (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi ainesosien kemiallinen koostumus (ks. edellä), esiintymistiheys ja olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta (jos se tiedetään), hedelmöittyneiden munien lähde ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

Testiolosuhteet:

— valoisa aikajakso (valoisat aikajaksot)

— testin rakenne (esimerkiksi kammion koko, materiaali ja veden määrä, testikammioiden ja rinnakkaisnäytteiden lukumäärä, kuoriutuneiden munien määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtoväli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)

— testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumput, laimennusjärjestelmät)

— menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia aidossa liuoksessa

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspendoituneet kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testimediumin suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset

— nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat

— testiastioissa olevan veden laatu, pH, lämpötila (päivittäin) ja liuenneen hapen pitoisuus

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. ruoan tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotiheys).

Tulokset:

— todisteet siitä, että kontrollit täyttävät yleiset validiteettikriteerit

— seuraavat tiedot kontrolliryhmistä (myös liuotinkontrollista, jos se oli käytössä) ja käsittelyryhmistä: F1- ja F2-sukupolven kuoriutuminen (kuoriutuvuus ja kuoriutumisaika); F1-sukupolvelta kuoriutumisen jälkeinen eloonjääneisyys, kasvu (pituus ja paino), genotyyppinen sukupuoli ja sukupuolten erottelu (esim. sekundaariset sukupuoliominaisuudet peräeväpapillien ja sukurauhasten histologian perusteella), fenotyyppinen sukupuoli, sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit), vtg:n mRNA (tai VTG-proteiini), histopatologinen tutkimus (sukurauhaset, maksa ja munuaiset); F0- ja F1-sukupolvelta lisääntymistiedot (fekunditeetti ja hedelmällisyys); (ks. taulukot 1 ja 2).

— tilastollinen analyysimenetelmä (regressio- tai varianssianalyysi) ja tietojen käsittelymenetelmä (käytetyt tilastolliset testit tai mallit)

— pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä

— pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä (p = 0,05) tarvittaessa EC_x kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut malliparametrit ja niiden vakiovirheet

— mahdolliset poikkeamat tästä testimenetelmästä ja hyväksymisperusteista sekä pohdinta niiden mahdollisista vaikutuksista testin tulokseen.

60. Päätetapahtumien mittaustuloksista on esitettävä keskiarvot ja keskihajonnat (sekä rinnakkaisnäytteiden että pitoisuuksien perusteella, mikäli mahdollista).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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-*Tert*-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. (2006a). 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. Saatavana osoitteessa 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) Tämän liitteen C.15 luku Kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasilla tehtävä lyhytaikainen myrkyllisyystesti

(22) Tämän liitteen luku C.37, 21 päivän mittainen seulontatutkimus kaloilla: Lyhytaikainen estrogeeni- ja androgeeniaktiivisuuteen sekä aromataasin estoon kohdistuva seulonta

(23) Tämän liitteen luku C.41, Kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi

(24) Tämän liitteen luku C.48, Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus

(25) Tämän liitteen C.47 luku, Toksisuustesti kaloilla niiden varhaiskehitysvaiheessa

(26) Tämän liitteen luku C.49, Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (fet-testi)

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067–1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301–308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). 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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali: Aine tai seos.

ELISA: Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

Fekunditeetti = mätimunien lukumäärä

Hedelmällisyys = elinkykyisten mätimunien lukumäärä / fekunditeetti

Lovipituus tarkoittaa kalan pituutta leuan kärjestä pyrstöevän keskimmäisten ruotojen kärkeen, ja sitä käytetään kaloilla, joilta on vaikea määrittää selkärangan päättymiskohtaa (www.fishbase.org)

Kuoriutuvuus = kuoriutuneet kalanpoikaset / inkubaattoriin laitettujen alkioiden määrä

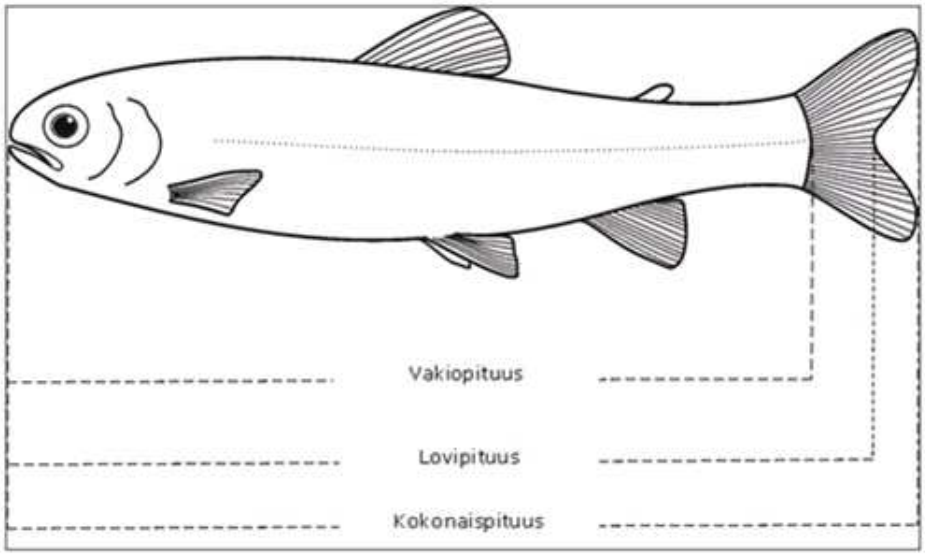
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee, eläinten hoitoa ja käyttöä käsittelevä komitea

Vakiopituus tarkoittaa kalan pituutta mitattuna leuan kärjestä viimeisen nikaman takareunaan tai pyrstönikamien keskiosan takareunaan. Yksinkertaistettuna tästä mittauksesta jätetään pyrstöevän pituus pois. (www.fishbase.org)

Kokonaispituus tarkoittaa pituutta leuan kärjestä pyrstöevän pitemmän lohkon kärkeen; mitataan yleensä siten, että lohkot on puristettu keskilinjaa vasten. Kyseessä on suoran viivan mittaus, ruumiin kaarevuutta ei oteta mukaan (www.fishbase.org).

Kuva 1

Kuvaus käytetyistä eri pituuksista



ECx: (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC50 on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan päätetapahtumaan altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

Läpivirtauskoe on testi, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistuksen keston ajan.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto

Kalatiheys: Kalojen märkäpaino suhteessa vesimäärään.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalilla havaitaan olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Lisäyksissä 5 ja 6 on ohjeita tästä.

Mediaani tappava pitoisuus (LC50): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden testiorganismeissa testin aikana.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Lastaustiheys: Kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

UVCB: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

VTG: Vitellogeniini on fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisproteiinin esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

VHJ: Viikkoa hedelmöittymisen jälkeen

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/l
Arseeni	1 µg/l
Kromi	1 µg/l
Koboltti	1 µg/l
Kupari	1 µg/l
Rauta	1 µg/l
Lyijy	1 µg/l
Nikkeli	1 µg/l
Sinkki	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

Lisäys 3

MEOGRT-TESTIN TESTIOLOSUHTEET

1. Suositeltu laji	Medaka (*Oryzias latipes*)
2. Testityyppi	Jatkuva läpivirtaus
3. Veden lämpötila	Testin nimellislämpötila on 25°C. Keskimääräisen lämpötilan on oltava jokaisessa säiliössä 24–26°C koko testin ajan.
4. Valaistus	Loisteputket (laajakirjoiset ja ~150 luumenia / m^2) (~150 luksia).
5. Valojakso	16 h valoisaa: 8 h pimeää
6. Lastaustiheys	F0: 2 aikuista / rinnakkaisnäyte; F1: aloitus enintään 20 munalla (alkiolla) / rinnakkaisnäyte; vähennetään 12 alkioon / rinnakkaisnäyte kuoriutumisen yhteydessä ja sen jälkeen kahteen aikuiseen (lisääntyvä XX–XY-pari) hedelmöittymisen jälkeisillä viikoilla 9–10 lisääntymisvaihetta varten
7. Testikammion käytettävissä oleva vähimmäistilavuus	1,8 l (testikammion koko esimerkiksi: 18 x 9 x 15 cm)
8. Testiliuosten vaihto	Vähintään 5 ja enintään 16 vaihtoa päivässä (tai virtaus 20 ml/min)
9. Testiorganismien ikä testin alkaessa	F0: > 12 vhj, ei kuitenkaan yli 16 vhj
10.Organismien lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä	F0: 2 kalaa (1 pari, koiras ja naaras) F1: Enintään 20 kalaa (munaa) / rinnakkaisnäyte (F0- ja F1-sukupolven lisääntyvien parien tuottamia)
11. Käsittelyjen lukumäärä	5 testikemikaalikäsittelyä + tarvittava(t) kontrolli(t)
12.Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä	Vähintään 6 rinnakkaisnäytettä kussakin testikemikaalikäsittelyssä ja vähintään 12 rinnakkaisnäytettä kontrollissa ja liuotinkontrollissa, jos sitä käytetään (rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kaksinkertaistetaan F1-sukupolven lisääntymisvaiheessa)
13.Organismien lukumäärä kussakin testissä	F0: vähintään 84 kalaa, F1: 504 kalaa (Jos liuotinkontrollia käytetään: F0:ssa 108 kalaa ja F1:ssä 648 kalaa.) Laskettava yksikkö on vapaasti liikkumisvaiheen jälkeinen alkio.
14. Ruokinta	Kaloja ruokitaan suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) 24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla *ad libitum*. Tarvittaessa kaloille voidaan antaa lisäksi kaupallisesti saatavaa hiutaleruokaa. (Lisäyksessä 5 on esimerkki ruokinta-aikataulusta, jolla taataan varmaa lisääntymistä tukeva riittävä kasvu ja kehitys.)
15. Ilmastus	Ei tarvita, ellei liuennen hapen pitoisuus ilman kyllästysarvosta ole < 60 %
16. Laimennusvesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi.

17. Altistusaika	Ensisijaisesti 19 viikkoa (F0:sta F2:n kuoriutumiseen)
18. Biologiset päätetapahtumat(ensisijaiset)	Kuoriutuvuus (F1 ja F2); eloonjääneisyys (F1, kuoriutumisesta hjv 4 (ruskuaispussipoikasvaiheen loppu/juveniilivaiheen alku), 4–9 (tai 10) hjv (juveniilivaiheen ja poikasvaiheen alku) ja 9–15 hjv (poikasesta aikuisen lopettamiseen asti)); kasvu (F1, pituus ja paino hjv:lla 9 ja 15); sekundaariset sukupuoliominaisuudet (FI, peräeväpapillit hjv:lla 9 ja 15); vitellogeniini (F1, *vtg* mRNA tai VTG-proteiini hjv:lla 15); fenotyyppinen sukupuoli (F1, sukurauhasten histologian perusteella hjv:lla 15) lisääntyminen (F0 ja F1, fekunditeetti ja hedelmällisyys 21 päivän ajan); kutemisaika (F1); ja histopatologia (F1, sukurauhaset, maksa ja munuaiset hjv:lla 15).
19. Testin validiteettikriteerit	Liuenneen hapen pitoisuus ≥ 60 % ilman kyllästysarvosta; keskimääräinen veden lämpötila 24–26 °C koko testin ajan; onnistunut lisääntyminen ≥ 65 %:lla naaraista kontrollissa (kontrolleissa); päivittäinen fekunditeetti keskimäärin ≥ 20 munaa kontrollissa (kontrolleissa); kuoriutuvuus ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) kontrolleissa (kummassakin sukupolvessa, F1 ja F2); eloonjääneisyys kuoriutumisen jälkeen hjv:lle 3 ≥ 80 % (keskiarvo) ja siitä eteenpäin sukupolven lopettamiseen saakka hjv:lle 3 ≥ 90 % (keskiarvo) kontrolleissa (F1); testikemikaalin pitoisuuksien liuoksessa olisi oltava hyväksyttävästi ± 20 % keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Lisäys 4

KONTROLLIEN TYYPILLISIÄ ARVOJA KOSKEVIA OHJEITA

On syytä todeta, että nämä kontrolliarvot perustuvat vain muutamaan validointitutkimukseen, ja niitä mahdollisesti muutetaan myöhemmin kokemuksen karttuessa.

Kasvu

Kaikilta kaloilta, joilta otetaan näytteet 9 (tai 10) ja 15 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen (hjv), mitataan paino ja pituus. Tämän protokollan mukaan odotuksenmukaiset märkäpainot hjv:lla 9 ovat koirailla 85–145 mg ja naarailla 95–150 mg. Odotuksenmukaiset märkäpainot hjv:lla 15 ovat koirailla 250–330 mg ja naarailla 280–350 mg. Vaikka yksittäisen kalan paino voi poiketa näistä viitearvoista huomattavasti, kontrollikalojen keskimääräiset painot, jotka ovat selvästi näiden arvojen ulkopuolella ja etenkin alarajaa pienempiä, viittaavat kuitenkin ruokintaan, lämpötilan hallintaan, vedenlaatuun tai sairauksiin liittyviin ongelmiin tai näiden seikkojen yhdistelmään.

Kuoriutuminen

Kontrolleissa normaali kuoriutuvuus on yleensä noin 90 prosenttia, mutta niinkään pieni arvo kuin 80 prosenttia ei ole epätavallinen. Jos kuoriutuvuus on alle 75 prosenttia, se voi olla merkki siitä, että kehittyvien munien ravistelu on ollut riittämätöntä tai että munien käsittely on ollut huolimatonta (esimerkiksi kuolleet munat on voitu poistaa liian myöhään, mikä on aiheuttanut sieni-infektion).

Eloonjääneisyys

Eloonjääneisyys kuoriutumisesta hjv:lle 3 ja sen jälkeen on kontrolleissa yleensä vähintään 90 prosenttia, mutta edes 80 prosentin eloonjääneisyys elinkaaren varhaisvaiheessa ei ole vielä hälyttävää kontrolleissa. Sen sijaan on huolestuttavaa, jos eloonjääneisyys on kontrolleissa alle 80 prosenttia. Se voi viitata akvaarioiden riittämättömään puhdistukseen, jolloin ruskuaispussipoikaset ovat menehtyneet sairauteen tai ne ovat tukehtuneet, koska liuenneen hapen pitoisuus on ollut liian pieni. Kuolleisuus voi johtua myös säiliön puhdistuksen aikana tapahtuneen vaurioitumisen takia, ja ruskuaispussipoikaset ovat voineet myös joutua sen aikana säiliön vedenpoistojärjestelmään.

Vitellogeniinigeeni

Vaikka *vitellogeniini* (*vtg*) -geenin absoluuttiset pitoisuudet, jotka ilmaistaan yksikössä kopiota/ng mRNA:n kokonaismäärästä, voivat vaihdella laboratorioiden välillä paljonkin käytettyjen menettelyjen tai laitteiden vuoksi, *vtg*-pitoisuuden on oltava noin 200 kertaa suurempi kontrolliryhmän naarailla kuin kontrolliryhmän koirailla. Ei ole epätavallista, jos tämä suhde on 1 000–2 000, mutta alle 200:n oleva suhdeluku on epäilyttävä ja voi viitata näytteen kontaminoitumiseen tai menettelyihin ja/tai käytettyihin reagensseihin liittyviin ongelmiin.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

Koirailla sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien normaalialue, joka määritellään peräeväpapillien eväruotojen segmenttien kokonaismääränä, on 40–80 segmenttiä hjv:lla 9–10. Hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 15 mennessä normaalialue kontrolliryhmän koirailla tulisi olla noin 80–120 ja kontrolliryhmän naarailla 0. Selittämättömistä syistä joskus harvoin on koiraita, joilla ei ole yhtään papillia hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 9 mennessä, mutta koska papillit kehittyvät kaikille kontrolliryhmän koiraille hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 15 mennessä, tämä johtuu mitä todennäköisimmin kehityksen viivästymisestä. Jos kontrolliryhmän naarailla havaitaan papilleja, se osoittaa, että populaatiossa on XX-koiraita.

XX-koiraat

XX-koiraiden normaali taustaesiintyvyys viljelmässä on noin 4 prosenttia tai vähemmän 25 ^{0}C:n lämpötilassa. Esiintyvyys kuitenkin kasvaa lämpötilan noustessa. On syytä huolehtia siitä, että XX-koiraiden osuus populaatiossa pysyy mahdollisimman pienenä. Koska XX-koiraiden esiintyvyydessä vaikuttaa olevan geneettinen komponentti, jonka takia se on periytyvää, kantaviljelmän valvonta ja sen varmistaminen, ettei XX-koiraita käytetä kantaviljelmän kasvattamiseen, ovat tehokkaita keinoja vähentää XX-koiraiden esiintyvyyttä populaatiossa.

Kuteminen

Kontrollirinnakkaisnäytteistä on seurattava kutemista päivittäin ennen fekunditeetin arvioimista. Kontrollipareista voidaan arvioida laadullisesti, onko kutemisesta merkkejä. Arviointi voidaan tehdä silmämääräisesti. Useimpien kontrolliparien pitäisi kutea hjv:lle 12–14 mennessä. Jos kutevia pareja on noina viikkoina vähän, kaloilla voi olla mahdollisia terveyteen, kypsyyteen tai hyvinvointiin liittyviä ongelmia.

Fekunditeetti

Terveet ja hyvin ruokitut 12–14 hjv:n ikäiset medakat kutevat yleensä päivittäin ja tuottavat 15–50 mätimunaa päivässä. Lisääntyvien kontrolliparien suositeltu määrä on 24, ja tästä määrästä 16 parin (> 65 %) pitäisi tuottaa yli 20 munaa päivässä paria kohti (mutta ne voivat kuitenkin tuottaa jopa 40 munaa päivässä). Jos munien määrä on tätä pienempi, kutevat parit saattavat olla epäkypsiä, aliravittuja tai sairaita.

Hedelmällisyys

Kutevien kontrolliparien hedelmöittyneiden munien prosentuaalinen osuus on yleensä 90 prosentin luokkaa, eivätkä myöskään 95 prosentin paikkeilla olevat tai sitä suuremmat arvot ole epätavallisia. Jos kontrolliparien hedelmöittyneiden munien osuus on alle 80 prosenttia, on aihetta epäillä, että kalayksilöt eivät ole terveitä tai että kasvatusolosuhteet eivät ole ihanteelliset.

Lisäys 5

ESIMERKKI RUOKINTA-AIKATAULUSTA

Taulukossa 1 on esimerkki ruokinta-aikataulusta, jolla taataan varmaa lisääntymistä tukeva riittävä kasvu ja kehitys. Tästä aikataulusta saa tarvittaessa poiketa, mutta on suositeltavaa, että poikkeavien aikataulujen yhteydessä varmistetaan, että hyväksyttävää kasvua ja lisääntymistä on havaittavissa. Jotta ehdotettua ruokinta-aikataulua voidaan noudattaa, suolalehtijalkaisten kuivapaino niiden liemen tilavuuteen nähden on määritettävä ennen testin aloittamista. Se voidaan tehdä punnitsemalla tietty määrä suolalehtijalkaisten lientä, jota on kuivattu 24 tunnin ajan 60 °C:ssa ennalta punnituissa astioissa. Jotta voidaan ottaa huomioon liemessä olevien suolojen paino, on kuivattava ja punnittava sama määrä suolaliuosta kuin liemessä on käytetty, ja paino on vähennettävä kuivatun suolalehtijalkaisliemen painosta. Vaihtoehtoisesti suolalehtijalkaisliemi voidaan suodattaa ja huuhdella tislatulla vedellä ennen kuivaamista, jolloin ei tarvitse punnita ”pelkän suolan” painoa. Näitä tietoja käytetään taulukon tietojen muuntamisessa suolalehtijalkaisliemen kuivapainosta siihen suolalehtijalkaisliemen määrään, joka kullekin kalalle on annettava. Lisäksi suositellaan, että suolalehtijalkaisliemestä punnitaan alikvootit viikoittain, jotta varmistetaan, että kaloille annetaan kuivapainoltaan oikea määrä suolalehtijalkaisia.

Taulukko 1

Esimerkki ruokinta-aikataulusta

Aika (kuoriutumisen jälkeen)	Suolalehtijalkaisia (mg kuivapainoa / kala / päivä)
Päivä 1	0,5
Päivä 2	0,5
Päivä 3	0,6
Päivä 4	0,7
Päivä 5	0,8
Päivä 6	1,0
Päivä 7	1,3
Päivä 8	1,7
Päivä 9	2,2
Päivä 10	2,8
Päivä 11	3,5
Päivä 12	4,2
Päivä 13	4,5

Aika (kuoriutumisen jälkeen)	Suolalehtijalkaisia (mg kuivapainoa / kala / päivä)
Päivä 14	4,8
Päivä 15	5,2
Päivät 16–21	5,6
Viikko 4	7,7
Viikko 5	9,0
Viikko 6	11,0
Viikko 7	13,5
Viikko 8 – lopetus	22,5

Lisäys 6

ESIMERKKEJÄ MUNIEN INKUBOINTIKAMMIOSTA

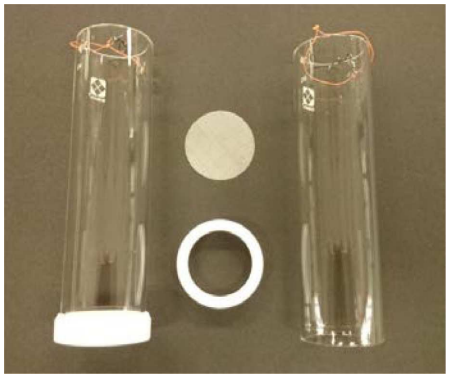
Esimerkki A





Tämä inkubaattori koostuu katkaistusta lasisesta sentrifugiputkesta, jossa on ruostumatonta terästä oleva holkki ja joka pysyy paikallaan sentrifugin ruuvitulpalla. Tulpan läpi menee ohut lasinen tai ruostumatonta terästä oleva putki, joka ulottuu melkein pyöristettyyn pohjaan asti. Putki puhaltaa varovasti ilmakuplia, joiden tarkoituksena on suspendoida munat, vähentää saprotrofisten sieni-infektioiden kulkeutumista munien välillä ja mahdollistaa kemikaalin virtaus inkubaattorin ja varastosäiliön välillä.

Esimerkki B





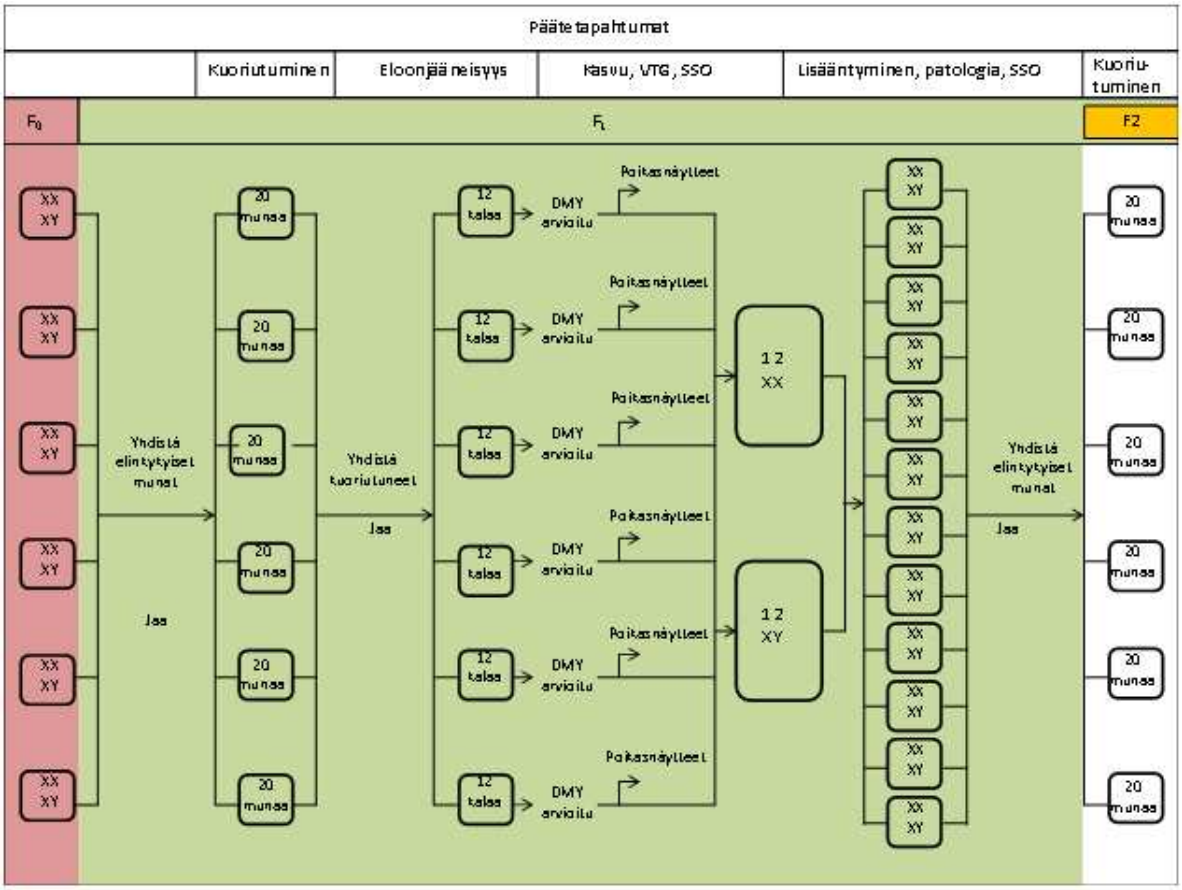
Tämä inkubaattori koostuu lasisesta lieriöstä (halkaisija 5 cm ja korkeus 10 cm) ja ruostumatonta terästä olevasta verkosta (φ 0,25, silmäkoko 32), joka on kiinnitetty lieriön pohjaan PFTE-renkaalla. Inkubaattorit ripustetaan säiliöihin nostorivasta, ja niitä ravistellaan pystysuunnassa (heilahdustaajuus noin 5 cm) medakan munille sopivassa syklissä (yleensä neljän sekunnin välein).

Lisäys 7

KAAVIO RINNAKKAISNÄYTTEIDEN YHDISTÄMISESTÄ JA TÄYTTÄMISESTÄ MEORGT-TESTIMENETELMÄN YHTEYDESSÄ

Kuva 1

Rinnakkaisnäytteiden yhdistäminen ja täyttäminen MEOGRT-testissä Kuvassa esitetään yksi käsittely tai puolikas kontrollista. Yhdistämisen takia rinnakkaisnäytteen identiteetti ei ole sama koko testin ajan. Ilmauksella ”munat” tarkoitetaan elinkykyisiä hedelmöittyneitä munia (eli alkioita).



Käsittelyt ja rinnakkaisnäytteet

Testimenetelmässä suositellaan viittä testikemikaalikäsittelyä, joissa käytetään teknisen laadun kriteerit täyttävää materiaalia, ja negatiivista kontrollia. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä ei pysy samana koko MEOGRT-testin ajan, ja kontrollikäsittelyssä on kaksinkertainen määrä rinnakkaisnäytteitä yhteen testikemikaalikäsittelyyn verrattuna. F0-sukupolvessa jokaisessa testikemikaalikäsittelyssä on kuusi rinnakkaisnäytettä, ja negatiivisessa kontrollikäsittelyssä on 12 rinnakkaisnäytettä. Liuottimien käyttöä ei suositella, mutta jos niitä käytetään, MEORGT-testiraportissa on esitettävä perustelut sekä liuottimen käytölle että tietyn liuottimen valinnalle. Lisäksi tarvitaan kahdenlaisia kontrolleja, jos liuotinta käytetään: a) liuotinkontrolli ja b) negatiivinen kontrolli. Kummankin näistä kahdesta kontrolliryhmästä on koostuttava täydestä määrästä rinnakkaisnäytteitä kaikissa tämän testin aikajanan pisteissä. Tämä rinnakkaisnäyterakenne pysyy samana testiorganismin kehittyessä F1-sukupolvessa (ja F2-sukupolvessa kuoriutumiseen saakka). Aikuisvaiheessa, kun F1-sukupolven lisääntyvät parit on muodostettu, lisääntymisparien rinnakkaisnäytteiden määrä käsittelyä kohti tulisi mieluiten kaksinkertaistaa. Tällöin jokaisessa testikemikaalikäsittelyssä on enintään 12 rinnakkaisnäyteparia ja kontrolliryhmässä 24 paria (ja tarvittaessa toiset 24 rinnakkaisnäyteparia liuotinkontrollissa). F1-parien kudusta peräisin olevien alkioiden kuoriutuminen määritetään samalla rinnakkaisnäyterakenteella kuin F0-parien kudusta peräisin olevien alkioiden yhteydessä, eli testikemikaalikäsittelyä kohti on aluksi kuusi rinnakkaisnäytettä ja kontrolliryhmässä (-ryhmissä) 12.

Lisäys 8

PERÄEVÄPAPILLIEN LASKEMINEN

Tärkeimmät materiaalit ja reagenssit

— Dissektiomikroskooppi (jossa voi olla kamera liitettynä)

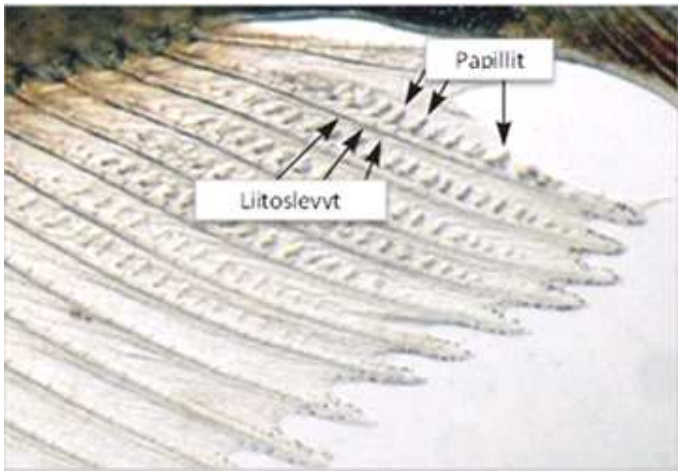
— Kiinnitysaine (esimerkiksi Davidsonin aine, Bouinin ainetta ei suositella), jos laskentaa ei tehdä kuvasta

Menettelyt

Ruumiinavauksen jälkeen peräevä on kuvattava, jotta peräeväpapillit voidaan laskea helposti. Kuvantaminen on suositeltu menetelmä, mutta peräevä voidaan myös kiinnittää Davidsonin kiinnitysaineella tai muulla sopivalla kiinnitysaineella (noin minuutin ajan). Kiinnityksen ajan peräevä on tärkeä pitää litteänä, jotta papillien laskeminen on helpompaa. Ruumis ja peräevä voidaan säilöä Davidsonin kiinnitysaineeseen tai muuhun sopivaan aineeseen siihen asti, kun ne analysoidaan. Laske niiden liitoslevyjen lukumäärä (ks. **kuva 1**), joissa on levyn takareunasta esiin työntyviä papilleja.

Kuva 1

Peräeväpapillit



Lisäys 9

MEORGT-TESTIN TARKKA AIKAJANA

Testiviikot 1–3 (F0)

F0-sukupolven kutevat kalat, jotka täyttävät valintaperusteet (ks. 16–20 kohta), altistetaan kolmen viikon ajaksi, jotta kehittyvät gameetit ja sukurauhaskudokset altistuvat testikemikaalille. Jokaisessa rinnakkaisnäytesäiliössä on yksi lisääntyvä kalapari (XX-naaraasta ja XY-koiraasta muodostuva pari). Mätimunat kerätään ja lasketaan, ja niistä arvioidaan hedelmällisyys 21 peräkkäisen päivän ajan testipäivästä 1 aloittaen.

Testiviikko 4 (F0 ja F1)

Hedelmöittyneet ja elinkykyiset munat (alkiot) kerätään mieluiten yhtenä päivänä. Jos alkioita ei kuitenkaan ole tarpeeksi, niitä voidaan kerätä kahtena päivänä. Jos niitä kerätään kahtena päivänä, kaikki käsittelyistä ensimmäisenä päivänä kerätyt alkiot yhdistetään niihin, jotka kerätään toisena päivänä. Kaikki kustakin käsittelystä yhdistetyt alkiot jaetaan satunnaisesti rinnakkaisnäyteinkubaattoreihin (20 alkiota yhteen inkubaattoriin). Kuolleet hedelmöittyneet munat (alkiot) tarkistetaan ja kirjataan päivittäin. Kuolleet munat poistetaan inkubaattoreista (hedelmöittyneiden munien kuoleman voi havaita erityisesti varhaisvaiheissa: läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys, OECD 2010).

Huom. Jos yhdestä käsittelystä on kerättävä munia toisena päivänä, kaikkiin käsittelyihin (ja kontrolleihin) on sovellettava tätä menettelyä. Jos toisen keruupäivän jälkeen yhdessä käsittelyssä on edelleen liian vähän alkioita siihen nähden, että yhteen inkubaattoriin pitää saada 20 alkiota, kyseisen käsittelyn alkioiden määrää vähennetään 15 alkioon yhtä inkubaattoria kohti. Jos alkioita ei ole edelleenkään tarpeeksi, jotta yhteen inkubaattoriin saataisiin 15 alkiota, rinnakkaisnäyteinkubaattorien määrää vähennetään siten, että jokaiseen inkubaattoriin saadaan 15 alkiota. Lisäksi F0-sukupolveen voidaan lisätä lisääntyviä pareja jokaiseen käsittelyyn ja kontrolliin, jotta munien tuotanto lisääntyisi siten, että suositus 20 munasta rinnakkaisnäytettä kohti täyttyisi.

Testipäivänä 24 F0-sukupolven lisääntymisparit lopetetaan humaanisti ja niiden paino ja pituus merkitään muistiin. Tarvittaessa F0-sukupolven lisääntyviä pareja voidaan pitää elossa vielä yksi tai kaksi päivää, jotta F1-sukupolven luonti voidaan aloittaa uudelleen.

Testiviikot 5–6 (F1)

Yksi tai kaksi päivää ennen kuoriutumisen oletettua alkamista inkuboitavien munien ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään kuoriutumisen jouduttamiseksi. Koska alkioita kuoriutuu joka päivä, kuoriutuneet kalanpoikaset yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti kuhunkin poikasten rinnakkaisnäytesäiliöön tietyn käsittelyn mukaisesti. Yhdessä säiliössä saa olla enintään 12 kuoriutunutta kalanpoikasta. Tämä tehdään valitsemalla kalanpoikaset satunnaisesti ja laittamalla yksi kalanpoikanen peräkkäisiin rinnakkaisnäytteisiin sattumanvaraisesti siirtymällä järjestyksessä tietyn käsittelyn rinnakkaisnäytteestä toiseen, kunnes kaikissa käsittelyn näytteissä on 12 kalanpoikasta. Jos kalanpoikasia ei ole tarpeeksi, jotta niitä riittäisi kaikkiin rinnakkaisnäytteisiin, on varmistettava, että mahdollisimman monessa näytteessä on 12 kalanpoikasta, jotta F1-vaihe voidaan aloittaa.

Munat, jotka eivät ole kuoriutuneet, kun kontrollin kuoriutumisen mediaanipäivästä on kulunut kaksi kertaa niin pitkä aika, katsotaan elinkyvyttömiksi ja hävitetään. Kalanpoikasten lukumäärä kirjataan, ja kuoriutuvuus lasketaan jokaisesta rinnakkaisnäytteestä.

Testiviikot 7–11 (F1)

Ruskuaispussipoikasten eloonjääminen tarkastetaan ja kirjataan päivittäin kaikista rinnakkaisnäytteistä. Testipäivänä 43 elossa olevien kalojen lukumäärä jokaisesta rinnakkaisnäytteestä kirjataan, kuten myös rinnakkaisnäytteeseen alun perin laitettujen kuoriutuneiden kalanpoikasten määrä (nimellislukumäärä 12). Tämän avulla voidaan laskea eloonjäämisen prosentuaalinen osuus kuoriutumisesta poikasvaiheeseen.

Testiviikko 12 (F1)

Testipäivänä 78–82 jokaisen kalan pyrstöevästä otetaan pieni näyte yksilön genotyyppisen sukupuolen määrittämiseksi (ts. eväleike) kaikkien kalojen osalta. Tämän tiedon perusteella muodostetaan lisääntyvät parit.

Kolmen päivän kuluessa siitä, kun jokaisen kalan genotyyppinen sukupuoli on määritetty, muodostetaan 12 lisääntyvää paria jokaiseen käsittelyyn ja 24 paria jokaiseen kontrolliin sattumanvaraisesti. Jokaisesta rinnakkaisnäytteestä valitaan satunnaisesti kaksi XX- ja XY-kalaa, jotka yhdistetään sukupuolittain, ja sen jälkeen niistä valitaan satunnaisesti kaksi kalaa lisääntyvän parin (eli XX–XY-parin) muodostamiseksi. Kuhunkin kemikaalikäsittelyyn tehdään vähintään 12 rinnakkaisnäytettä ja kuhunkin kontrolliin vähintään 24 näytettä, ja jokaiseen näytteeseen laitetaan yksi lisääntyvä pari. Jos rinnakkaisnäytteessä ei ole kahta XX-kalaa tai kahta XY-kalaa yhdistämistä varten, tarvittavan sukupuoligenotyypin mukainen kala on otettava muista käsittelyn rinnakkaisnäytteistä.

Loput kalat (enintään 8 kussakin rinnakkaisnäytteessä) lopetetaan humaanisti, ja niistä otetaan poikasvaiheen eri päätetapahtumien mukaiset näytteet. Kaikista poikasvaihenäytteistä säilytetään *dmy*-tiedot (XX vai XY), jotta voidaan varmistaa, että kaikki päätetapahtumatiedot voidaan liittää jokaisen yksittäisen kalan geneettiseen sukupuoleen.

Testiviikot 13–14 (F1)

Altistusta jatketaan, kun poikasvaiheen lisääntyvät parit kehittyvät aikuisiksi. Testipäivänä 98 (eli munien keräämistä edeltävänä päivänä) munat otetaan pois sekä akvaarioista että naaraista.

Testiviikot 15–17 (F1)

Kutemisen aikana lasketut mätimunat kerätään päivittäin 21 peräkkäisen päivän ajan kaikista rinnakkaisnäytteistä, ja niiden fekunditeetti ja hedelmällisyys arvioidaan.

Testiviikko 18 (testiviikon 4 toisto) (F1 ja F2)

Testipäivän 120 aamuna munat kerätään jokaisesta rinnakkaisnäytesäiliöstä. Kerätyt munat arvioidaan, ja jokaisen lisääntyvän parin hedelmöittyneet munat (joista on poistettu rihmat) yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti munien inkubointikammioihin (20 munaa yhteen inkubaattoriin). Inkubaattorit voidaan laittaa erillisiin ”inkubaattorisäiliöihin”, jotka on valmisteltu kutakin käsittelyä varten, tai rinnakkaisnäytesäiliöön, jotka sisältävät kuoriutumisen yhteydessä kuoriutuneet ruskuaispussipoikaset. Alkiot kerätään mieluiten yhtenä päivänä. Jos alkioita ei kuitenkaan ole tarpeeksi, niitä voidaan kerätä kahtena päivänä. Jos niitä kerätään kahtena päivänä, kaikki käsittelyistä ensimmäisenä päivänä kerätyt alkiot yhdistetään niihin, jotka kerätään toisena päivänä. Kaikki kustakin käsittelystä yhdistetyt alkiot jaetaan satunnaisesti rinnakkaisnäyteinkubaattoreihin (20 alkiota yhteen inkubaattoriin). Huom. Jos yhdestä käsittelystä on kerättävä munia toisena päivänä, kaikkiin käsittelyihin (ja kontrolleihin) on sovellettava tätä menettelyä. Jos toisen keruupäivän jälkeen yhdessä käsittelyssä on edelleen liian vähän alkioita siihen nähden, että yhteen inkubaattoriin pitää saada 20 alkiota, kyseisen käsittelyn alkioiden määrää vähennetään 15 alkioon yhtä inkubaattoria kohti. Jos alkioita ei ole edelleenkään tarpeeksi, jotta yhteen inkubaattoriin saataisiin 15 alkiota, rinnakkaisnäyteinkubaattorien määrää vähennetään siten, että jokaiseen inkubaattoriin saadaan 15 alkiota.

Testipäivänä 121 (tai testipäivänä 122, jotta varmistetaan, että F2-sukupolven luominen on alkanut hyvin) F1-sukupolven lisääntyvät parit lopetetaan humaanisti ja niistä analysoidaan aikuisten kalojen päätetapahtumat. Tarvittaessa F1-sukupolven lisääntyviä pareja voidaan pitää elossa vielä yksi tai kaksi päivää, jotta F2-sukupolven luonti voidaan aloittaa uudestaan.

Testiviikot 19–20 (F2)

Yksi tai kaksi päivää ennen kuoriutumisen oletettua alkamista inkuboitavien munien ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään kuoriutumisen jouduttamiseksi. Jos testi päättyy F2-sukupolven kuoriutumiseen, kuoriutuneet kalanpoikaset lasketaan joka päivä ja hävitetään sen jälkeen. (Alkiot, jotka eivät ole kuoriutuneet pidennetyn inkubointiajan (kaksi kertaa kontrollin kuoriutumispäivän mediaani) jälkeen, katsotaan elinkyvyttömiksi.)

Lisäys 10

TILASTOANALYYSI

MEORGT-testistä saadut biologisten tietojen tyypit eivät ole vain sille ominaisia. Patologisia tietoja lukuun ottamatta on kehitetty monia sopivia tilastomenetelmiä, joilla voidaan analysoida samanlaisia tietoja asianmukaisesti sen mukaan, millaisia piirteitä tiedoissa on (esimerkiksi normaalisuus, varianssin yhtenäisyys, se, sopiiko tutkimus rakenteeltaan hypoteesin testaamiseen tai regressioanalyysiin, parametriset vs. ei-parametriset testit jne.). Yleisperiaate on se, että ehdotetuissa tilastoanalyyseissa noudatetaan ekotoksisuustietoja koskevia OECD:n suosituksia (OECD 2006) ja MEORGT-testin aineistoanalyysia koskevaa päätöksenteon vuokaaviota (kuva 2).

Oletuksena on, että useimmiten tietueet kuvastavat monotonisia vasteita. Lisäksi on otettava huomioon kysymys yksisuuntaisen tilastollisen testin käyttämisestä verrattuna kaksisuuntaiseen tilastolliseen testiin. Ellei ole biologisia perusteita, joiden nojalla yksisuuntainen testi on epätarkoituksenmukainen, suositellaan käytettävän yksisuuntaisia testejä. Jäljempänä suositellaan tiettyjä tilastollisia testejä, mutta jos kehitetään tarkoituksenmukaisempia ja/tai selitysvoimaltaan parempia tilastomenetelmiä sovellettavaksi tiettyihin MEORGT-testissä saatuihin tietoihin, näitä tilastollisia testejä on syytä käyttää, jotta niistä koituvia etuja voidaan hyödyntää.

MEORGT-testistä saadut tiedot on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen. On kaksi strategiaa analysoida niiden kalojen tiedot, joiden sukupuoli on vaihtunut (joko XX-koiraat tai XY-naaraat): 1) sensuroidaan koko testistä kaikki tiedot kaloista, joiden sukupuoli on vaihtunut, lukuun ottamatta sukupuolen vaihtumisen esiintyvyyttä kussakin rinnakkaisnäytteessä; 2) säilytetään aineistossa tiedot kaikista kaloista, joiden sukupuoli on vaihtunut, ja analysoidaan ne genotyypin perusteella.

Histopatologiset tiedot

Histopatologiset tiedot raportoidaan vakavuuspisteinä, jotka arvioidaan hiljattain kehitetyllä tilastomenetelmällä nimeltä Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green ja muut, 2014). *Rao-Scottin* mukautus säilyttää testin toistamista koskevat tiedot; *by Slices* -menettely sisältää biologisen odotuksen, jonka mukaan vakavuuspisteillä on taipumus lisääntyä käsittelypitoisuuksien suurentuessa. RSCABS-menetelmällä saatu tulos määrittää jokaisen diagnoosin osalta, missä käsittelyissä patologisia löydöksiä esiintyy enemmän kuin kontrolleissa, ja näihin liittyvän vakavuusasteen.

Fekunditeettitiedot

Fekunditeettitietojen analyysi koostuu askeltavasta Jonckheere-Terpstran tai Williamsin testistä, jolla määritetään käsittelyn vaikutukset, jos tiedot ovat yhdenmukaiset monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa. Askeltavassa testissä kaikki vertailut tehdään 0,05:n merkitsevyystasolla, eikä siinä tehdä mukautusta vertailujen lukumäärään nähden. Tietojen oletetaan olevan yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa, mutta tämä voidaan varmentaa joko tarkastamalla tiedot silmämääräisesti tai tekemällä lineaariset ja kvadraattiset kontrastit käsittelyjen keskiarvoista tietojen arvojärjestysmuunnoksen jälkeen. Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti ei ole, tehdään trenditesti. Muussa tapauksessa käsittelyn vaikutusten määrittämiseen käytetään Dunnettin testiä, jos tiedot jakautuvat normaalisti ja jos varianssit ovat homogeenisia. Jos nämä vaatimukset eivät täyty, tehdään Dunnin testi Bonferonni-Holmin mukautuksella. Kaikki mainitut testit tehdään riippumatta mahdollisesta yleisestä F- tai Kruskal-Wallisin testistä. Tarkempia tietoja on julkaisussa OECD 2006.

Muitakin menetelmiä (munien määrän osalta vaikkapa yleistettyä lineaarista mallia Poissonin virheineen ilman muunnosta) voidaan käyttää, jos se on tilastollisesti perusteltua (Cameron ja Trividi, 2013). Tilastotieteellinen neuvonta on suositeltavaa, jos muita menetelmiä käytetään.

Päivittäinen munamäärä yhdessä sukupolvessa

ANOVA-mallissa käytetään kaavaa Y=Time*Time+Treatment + *Treatment + Time*Treatment + *Time*Treatment, satunnaisvaikutusten osalta Replicate(Generation*Treatment) ja Time*Replicate(Treatment). Näin saadaan kummankin tyypin erisuuren varianssin komponentit sukupolvista. Kaavassa ajalla (time) tarkoitetaan munienkeruun tiheyttä (päivä tai viikko). Tämä on toistettujen toimenpiteiden analyysi, jossa on myös korrelaatioita samoja rinnakkaisnäytteitä koskevien havaintojen välillä, koska tiedot siis liittyvät toistettuihin toimenpiteisiin.

Käsittelyn tärkeimmät vaikutukset testataan Dunnettin (tai Dunnett-Hsun) testillä, jossa käytetään vertailujen lukumäärän mukautusta. Mukautukset ovat tarpeen tarkasteltaessa sukupolvea tai aikaa tärkeimpänä vaikutuksena, koska näille kahdelle tekijälle ei ole kontrollitasoa ja jokaisella tasoparilla voi olla vertailun kannalta mahdollista merkitystä. Jos näiden kahden tärkeimmän vaikutuksen yhteydessä tärkeimmän vaikutuksen F-testi on merkitsevä 0,05:n tasolla, parittaiset vertailut tämän tekijän tasoilla voidaan testata 0,05:n tasolla ilman muuta mukautusta.

Malli sisältää kahden ja kolmen tekijän yhteisvaikutuksia, jolloin esimerkiksi aika tärkeimpänä vaikutuksena ei välttämättä ole merkitsevä, vaikka aika vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. Jos siis kahden tai kolmen tekijän yhteisvaikutus, johon sisältyy aika, on merkitsevä 0,05:n tasolla, ajan tasojen vertailut 0,05:n merkitsevyystasolla voidaan hyväksyä ilman muuta mukautusta.

Seuraavaksi tehdään F-testit käsittelyn merkitsevyydestä ajassa (eli ns. osat ANOVA-taulukossa). Jos esimerkiksi käsittelyä koskeva osa F1-sukupolven ja ajan 12 suhteen on merkitsevä 0,05:n tasolla, käsittelyn parittaiset vertailut F1-sukupolven ja ajan 12 osalta voidaan hyväksyä 0,05:n tasolla ilman muuta mukautusta. Samanlaisia lausekkeita sovelletaan testeihin, jotka koskevat aikaa F1:n ja sukupolven sisällä ja sukupolvea ajan ja käsittelyn sisällä.

Ne vertailut, jotka eivät kuulu mihinkään edellisiin luokkiin, on mukautettava käyttämällä Bonferroni-Holmin mukautusta p-arvoihin. Lisätietoja tällaisten mallien analyyseista on julkaisuissa Hocking (1985) sekä Hochberg ja Tamhane (1987).

Vaihtoehtoisesti voidaan tallentaa raakatiedot ja esittää ne tutkimusraportissa fekunditeettina (munien lukumäärä) rinnakkaisnäytettä kohti joka päivältä. Rinnakkaisnäytteiden raakatietojen keskiarvo on laskettava ja sen jälkeen siihen on sovellettava neliöjuurimuunnosta. Muunnettujen rinnakkaisnäytekeskiarvojen yksisuuntainen ANOVA on laskettava Dunnettin kontrastien avulla. Kunkin käsittelyn ja/tai rinnakkaisnäytteen fekunditeettitiedot kannattaa myös tarkastaa silmämääräisesti pistekaaviolla, joka näyttää tiedot ajan suhteen. Näin mahdollisia aikaan liittyviä vaikutuksia voidaan arvioida epävirallisesti.

Kaikki muut biologiset tiedot

Tilastolliset analyysit perustuvat oletukseen, että jos annos on valittu asianmukaisesti, aineisto on monotoninen. Aineiston oletetaan siis olevan monotoninen, ja sen monotonisuus arvioidaan virallisesti käyttämällä lineaarisia ja kvadraattisia kontrasteja. Jos aineisto on monotoninen, suositellaan Jonckheere-Terpstran trenditestiä rinnakkaisnäytteiden mediaaneille (julkaisussa OECD 2006 suositellun mukaisesti). Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti taas ei ole, aineiston katsotaan olevan ei-monotoninen.

Jos aineisto on ei-monotoninen etenkin siksi, että suurimman pitoisuuden tai kahden suurimman pitoisuuden osalta vaste on ollut pienempi, on syytä harkita näiden tietojen sensurointia, jolloin analyysi siis tehdään ilman näitä käsittelyitä. Päätös on tehtävä asiantuntijan harkinnan perusteella, ja siinä on otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, etenkin ne, joissa toksisuus on ollut selvää näillä pitoisuuksilla.

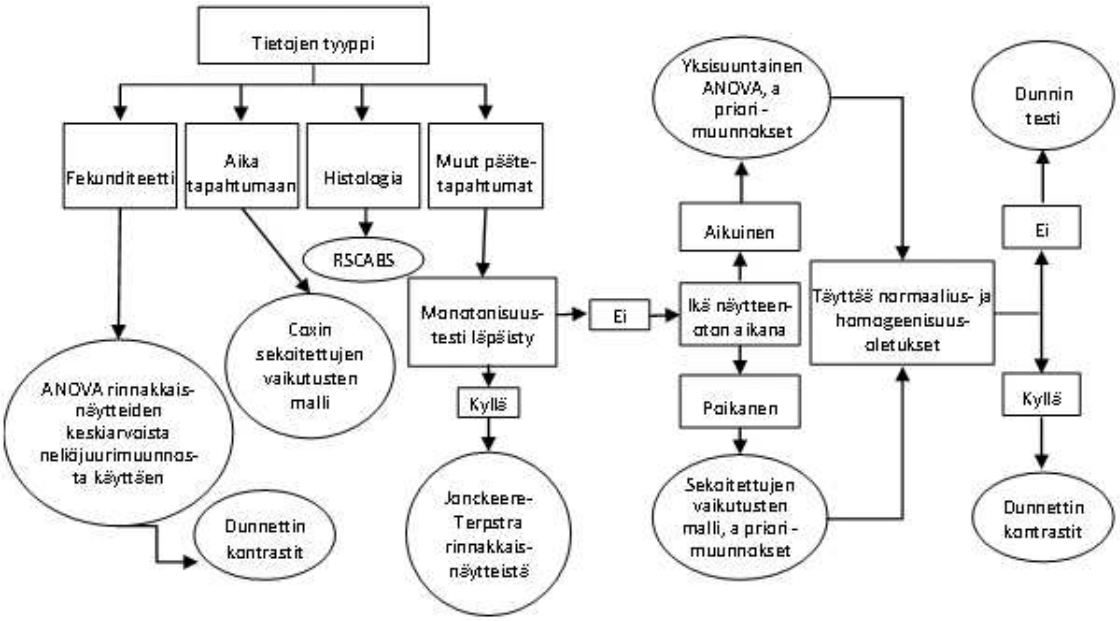
Paino- ja pituustietojen osalta muuntamista ei suositella, vaikka se voi toisinaan olla tarpeen. Vitellogeniinitiedoille suositellaan kuitenkin logaritmimuunnosta; sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia (peräeväpapillit) koskeville tiedoille suositellaan neliöjuurimuunnosta, ja arkussini-neliöjuurimuunnosta suositellaan kuoriutumisasteen, prosentuaalisen eloonjääneisyyden, sukupuolten suhteen ja hedelmöittyneiden munien prosenttiosuuden tiedoille. Kuoriutumisaikaa ja ensimmäisen kudun ajankohtaa on käsiteltävä tapahtumisaikatietoina, ja yksittäisiä alkioita, jotka eivät kuoriutuneet määritettynä aikana, tai rinnakkaisnäytteiden kaloja, jotka eivät kuteneet koskaan, on käsiteltävä oikealta sensuroituina tietoina. Kuoriutumisaika on laskettava kunkin rinnakkaisnäytteen kuoriutumispäivän mediaanista. Nämä päätetapahtumat on analysoitava käyttämällä sekoitettuja vaikutuksia koskevaa Coxin suhteellisen vaaran mallia.

Aikuisnäytteiden biologisten tietojen osalta tehdään yksi mittaus rinnakkaisnäytettä kohti eli yhdestä XX-kalasta ja yhdestä XY-kalasta rinnakkaisakvaariossa. Tämän vuoksi suositellaan, että rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista tehdään yksisuuntainen ANOVA-testi. Jos ANOVAn oletukset (normaalisuus ja varianssin homogeenisuus arvioituina ANOVAN jäännöksillä Shapiro-Wilksin testillä ja Levenen testillä) toteutuvat, ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista, on määritettävä Dunnettin kontrasteilla. Jos taas ANOVAn oletukset eivät toteutuneet, on tehtävä Dunnin testi, jotta voidaan määrittää ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista. Samanlaista menettelyä suositellaan prosenttiosuutena ilmoitettaville tiedoille (hedelmällisyys, kuoriutuminen ja eloonjääneisyys).

Poikasnäytteiden biologisten tietojen osalta tehdään 1–8 mittausta rinnakkaisnäytettä kohti. Niiden yksilöiden määrä voi siis vaihdella, jotka vaikuttavat rinnakkaisnäytteiden keskiarvoon kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta. Sen vuoksi on suositeltavaa käyttää sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallia ja sen jälkeen Dunnettin kontrasteja, jos normaalisuutta ja varianssin homogeenisuutta koskevat oletukset toteutuivat (sekoitettujen vaikutusten ANOVA-testin jäännöksillä). Jos oletukset eivät toteutuneet, on tehtävä Dunnin testi, jotta voidaan määrittää ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista.

Kuva 2

Vuokaavio MEORGT-testin aineiston analyysille suositelluista tilastomenettelyistä



LÄHDEKIRJALLISUUS

(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.

C.53 SAMMAKKOELÄINTEN TOUKKIEN KASVUA JA KEHITYSTÄ MITTAAVA TESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 241 (2015). Tarve kehittää ja validoida tutkimus, jolla pystytään havaitsemaan ja luonnehtimaan myrkyllisille kemikaaleille altistumisesta johtuvia haittavaikutuksia sammakkoeläimille, perustuu huolenaiheisiin, joiden mukaan kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille. Tässä sammakkoeläinten toukkien kasvua ja kehitystä mittaavaa testiä (Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)) koskevassa OECD:n testiohjeessa kuvataan sammakkoeläimillä tehtävä toksisuustesti, jossa tarkastellaan kasvua ja kehitystä hedelmöittymisestä varhaisen juveniilivaiheen ajan. Tässä testissä, joka kestää yleensä 16 viikkoa, arvioidaan varhaisvaiheen kehitystä, muodonvaihdosta, eloonjäämistä, kasvua ja osittain myös lisääntymiskypsyyttä. Testin avulla voidaan mitata myös joukko muita päätetapahtumia, joiden perusteella voidaan tehdä diagnostinen arviointi oletetuista hormonaalisista haitta-aineista tai muista kehitykseen ja lisääntymiseen vaikuttavista myrkyllisistä aineista. Tässä testimenetelmässä selostettu menetelmä perustuu afrikankynsisammakolla (*Xenopus laevis*) tehtyyn validointitutkimukseen, jonka on toteuttanut Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluvirasto EPA. Täydentäviä tutkimuksia on tehty Japanissa (1). Vaikka kasvua ja kehitystä arvioivaan testiprotokollaan voivat soveltua myös muut sammakkoeläinlajit, varsinkin sellaiset, joiden geneettinen sukupuoli voidaan määrittää, koska se on tärkeä osa testiä, tässä testimenetelmässä selostetut menetelmät ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään *Xenopus laevista*.

2. LAGDA on korkeamman tason testi, jossa sammakkoeläimistä voidaan kerätä haittavaikutuksista tavallista kattavampia pitoisuus-vastetietoja, joita voidaan käyttää vaarojen tunnistamisessa ja luonnehtimisessa sekä ympäristöriskien arvioinnissa. Testiä voidaan käyttää OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasolla 4, jolla *in vivo* -testeistä saadaan myös tietoa haittavaikutuksista hormonijärjestelmän kannalta oleellisten päätetapahtumien osalta (2). Pääpiirteissään testi koostuu Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaiheessa 8–10 olevien *X. laevis* -alkioiden altistamisesta vähintään neljälle pitoisuudelle testikemikaalia (porrastus yleensä enintään puolilogaritmisin välein) ja kontrolliainetta (-aineita). Altistus kestää 10 viikkoa kontrollieläinten NF-vaiheen 62 mediaaniajan jälkeen, ja NF-vaiheessa 62 otetaan yksi osaotos (≤ 45 päivää hedelmöittymisen jälkeen; yleensä noin 45 päivää (päivää hedelmöittymisen jälkeen, phj). Kustakin testipitoisuudesta on neljä rinnakkaisnäytettä, ja kontrollista niitä on kahdeksan. Altistumisen aikana arvioitavat päätetapahtumat (väliaikaisesta osaotoksesta ja lopullisesta otoksesta testin päättyessä) ovat sellaisia, jotka viittaavat yleistyneeseen toksisuuteen (kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen ja kasvuparametrit (pituus ja paino)), sekä sellaisia, joilla luonnehditaan tiettyjä endokriiniseen toksisuuteen viittaavia vaikutustapoja, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin fysiologisiin prosesseihin. Menetelmässä painotetaan ensisijaisesti mahdollisia populaation kannalta oleellisia vaikutuksia (eli eloonjääneisyyteen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiskehitykseen kohdistuvia haittavaikutuksia), kun lasketaan pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC-arvo), tai vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa × % muutoksia (ECx) mitattavassa päätetapahtumassa. On kuitenkin muistettava, etteivät ECx-arvoon perustuvat lähestymistavat useinkaan sovellu tämäntyyppisiin laajoihin tutkimuksiin, joissa testipitoisuuksien lukumäärän kasvattaminen halutun ECx-arvon määrittämiseksi saattaa olla epäkäytännöllistä. Lisäksi on muistettava, ettei menetelmä kata varsinaista lisääntymisvaihetta. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on selostettu lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

3. Tämän melko monimutkaisen testin validoinnissa testattiin vähän kemikaaleja, validointiin osallistui vain muutama laboratorio, eikä etenkään laboratorioiden välistä toistettavuutta ole vahvistettu kokeellisin tiedoin. Sen vuoksi on oletettavaa, että kun saatavilla on riittävä määrä tutkimuksia, joilla voidaan vahvistaa tämän rakenteeltaan uudenlaisen tutkimuksen vaikutus, OECD:n testiohjetta 241 tarkistetaan ja muutetaan tarvittaessa kertyneen kokemuksen perusteella. LAGDA on tärkeä tutkimus, jolla voidaan tarkastella sammakkoeläinpopulaation heikkenemiseen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä. Siinä arvioidaan kemikaalialtistuksen vaikutuksia herkän toukkavaiheen aikana, kun eloonjäämiseen ja kehitykseen, myös lisääntymiselinten normaaliin kehitykseen, kohdistuvat vaikutukset voivat vaikuttaa populaatioihin haitallisesti.

4. Testi on suunniteltu havaitsemaan sekä endokriinisista että muista kuin endokriinisista mekanismeista johtuva apikaalinen vaikutus (johtuvat vaikutukset), ja siihen sisältyy diagnostisia päätetapahtumia, jotka ovat osittain spesifejä keskeisille endokriinisille vaikutustavoille. Ennen kuin LAGDA-testi kehitettiin, ei ollut sellaista validoitua testiä, joka olisi täyttänyt tämän tehtävän sammakkoeläinten osalta.

5. Ennen testin aloittamista tutkimuksen tekijällä on oltava tietoa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. Tämä on tärkeää etenkin siksi, että voidaan valmistaa vakaita kemikaaliliuoksia. Lisäksi tarvitaan riittävän herkkä analyysimenetelmä testikemikaalien pitoisuuksien varmentamiseen. Testi kestää noin 16 viikkoa, ja sinä aikana tarvitaan yhteensä 480 koe-eläintä eli *X. laeviksen* alkiota (tai 640 alkiota, jos käytetään liuotinkontrollia), jotta voidaan varmistaa, että testin todistusvoima on riittävä populaation kannalta oleellisten päätetapahtumien, kuten kasvun, kehityksen ja lisääntymiskypsyyden, arvioinnissa.

6. Ennen kuin testimenetelmää käytetään sääntelyn edellyttämään seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset sääntelyn tavoitteen kannalta. Tässä testissä ei myöskään arvioida fekunditeettia suoraan, joten se ei välttämättä ole sovellettavissa OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasoa 4 ylemmällä tasolla.

TESTIMENETELMÄN TIETEELLINEN PERUSTA

7. Siitä, mitä nykyään tiedämme sammakkoeläinten biologiasta, suuri osa on hankittu käyttämällä koe-eläinlajina *X. laevista*. Tätä lajia voidaan kasvattaa laboratoriossa helposti, ja sen ovulaatio voidaan saada aikaan käyttämällä ihmisen koriongonadotropiinia (hCG). Lisäksi eläinkantoja saadaan nopeasti kaupallisilta kasvattajilta.

8. Kaikkien selkärankaisten tavoin sammakkoeläinten lisääntymistä säätelee hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli (HPG-akseli) (4). Tämä endokriinisen järjestelmän välittäjiä ovat estrogeenit ja androgeenit, jotka ohjaavat sukupuolisesti dimorfisten kudosten kehittymistä ja fysiologiaa. Sammakkoeläinten elinkaaressa on kolme erillistä vaihetta, joissa tämä akseli on erityisen aktiivinen: 1) sukurauhasten erilaistuminen toukkavaiheen aikana, 2) sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehittyminen ja sukurauhasten kypsyminen juveniilivaiheessa ja 3) aikuisten sammakkoeläinten toiminnallinen lisääntyminen. Kukin näistä kolmesta kehitysikkunasta on todennäköisesti altis tiettyjen kemikaalien, kuten estrogeenien ja androgeenien, aiheuttamalle hormonijärjestelmän häiriöille, mikä lopulta johtaa organismien lisääntymiskyvyn häviämiseen.

9. Sukurauhaset alkavat kehittyä NF-vaiheessa 43, kun bipotentiaalinen sukupuoliharjanne muodostuu. Sukurauhasten erilaistuminen alkaa NF-vaiheessa 52, kun varhaisvaiheen itusolut joko kulkeutuvat kehittyvien sukurauhasten medullaariseen kudokseen (koiraat) tai jäävät kortikaaliselle alueelle (naaraat) (3). *Xenopus*-lajilla tämän sukurauhasten sukupuolisen erilaistumisen prosessin raportoitiin jo 1950-luvulla olevan altis kemikaalien aiheuttamalle muutokselle (5) (6). Sammakonpoikasten altistaminen estradiolille tämän sukurauhasten erilaistumisen vaiheen aikana aiheutti sukupuolen vaihtumisen koirailla, jotka olivat täysikasvuisina täysin toimintakykyisiä naaraita (7) (8). Toiminnallinen sukupuolen vaihtuminen naaraasta koiraaksi on myös mahdollista, ja sitä on raportoitututkimuksista,

joissa sammakonpoikasiin on istutettu kiveskudosta (9). Vaikka myös aromataasin estäjälle altistuminen aiheuttaa toiminnallisen sukupuolen vaihtumisen *X. tropicalis* -lajilla (10), tämän ei ole osoitettu tapahtuvan *X. laeviksella*. Aikaisemmin myrkyllisten aineiden vaikutusta sukurauhasten erilaistumiseen on arvioitu sukurauhasten histologisilla tutkimuksilla muodonvaihdosvaiheessa, ja sukupuolen vaihtuminen on voitu määrittää vain sukupuolten suhteita määrittämällä. Viime aikoihin saakka ei ole ollut keinoja määrittää *Xenopus*-lajin sammakoiden geneettistä sukupuolta suoraan. Hiljattain X. laevikselta on kuitenkin löydetty sukupuoleen liittyviä markkereita, joiden avulla geneettisen sukupuolen määrittäminen ja niiden eläinten tunnistaminen, joiden sukupuoli on vaihtunut, ovat tulleet mahdollisiksi (11).

10. Koirailla juveniilivaiheen kehittyminen etenee, kun testosteronin pitoisuus veressä kasvaa sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien ja kivesten kehittymistä vastaavasti. Naarailla munasarjat alkavat tuottaa estradiolia, jolloin plasmassa on havaittavissa vitellogeniiniä (VTG), munasarjoissa vitellogeenioosyyttejä, ja munanjohtimet alkavat kehittyä (12). Munanjohtimet ovat sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, joilla on tehtävä oosyyttien kypsymisessä lisääntymisen aikana. Oosyyttien pintaan muodostuu hyytelömäinen kuori, kun ne kulkevat munanjohtimen läpi ja kerääntyvät munapussiin valmiina hedelmöittymistä varten. Estrogeenit vaikuttavat säätelevän munanjohtimien kehittymistä, koska *X. laevuksella* (13) ja *X. tropicaliksella* (12) se korreloi veren estradiolipitoisuuden kanssa. Koirailla on raportoitu munanjohtimien kehittymistä polyklooratuille bifenyyliyhdisteille (14) ja 4-*tert*-oktyylifenolille (15) altistumisen jälkeen.

TESTIN PERIAATE

11. Testissä NF-vaiheessa 8–10 olevat *X. laevis* -alkiot altistetaan vesireittiä neljälle pitoisuudelle testikemikaalia ja kontrolliainetta (-aineita). Altistus kestää 10 viikkoa kontrollin NF-vaiheen 62 mediaaniajan jälkeen, ja NF-vaiheessa 62 otetaan yksi osaotos. Vaikka voi olla mahdollista annostella erittäin hydrofobisia kemikaaleja ruoan seassa, tämän altistusreitin käyttämisestä on tähän mennessä niukalti kokemusta. Kustakin testipitoisuudesta on neljä rinnakkaisnäytettä, ja kustakin käytettävästä kontrollista niitä on kahdeksan. Altistumisen aikana arvioitavat päätetapahtumat ovat sellaisia, jotka viittaavat yleistyneeseen toksisuuteen (ts. kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen ja kasvuparametrit (pituus ja paino)), sekä sellaisia, joilla luonnehditaan tiettyjä endokriiniseen toksisuuteen viittaavia vaikutustapoja, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin fysiologisiin prosesseihin (ts. kilpirauhasen histopatologia, sukurauhasten ja sukujohtimien histopatologia, epänormaali kehittyminen, plasman vitellogeniinipitoisuus (valinnainen) ja genotyyppisen/fenotyyppisen sukupuolen suhteet).

TESTIN VALIDITEETTIKRITEERIT

12. Testin validiteettiin sovelletaan seuraavia kriteerejä:

— Liuenneen hapen pitoisuus on oltava ≥ 40 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.

— Veden lämpötilan on oltava alueella 21 ± 1 °C, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 1,0 °C.

— Testiliuoksen pH-arvon on pysyttävä välillä 6,5–8,5, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5.

— Saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

— Altistusaikana kuolleisuuden tulee olla ≤ 20 prosenttia jokaisessa kontrollirinnakkaisnäytteessä.

— Elinkyvyn on oltava ≥ 70 prosenttia tutkimuksen aloittamiseen valitussa kudussa.

— Kontrolleissa NF-vaiheen 62 alkamisajan mediaanin on oltava ≤ 45 päivää.

— Testiorganismien keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulee olla kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa (jos käytössä) 1,0 ± 0,2 g ja testin lopettamisvaiheessa 11,5 ± 3 g.

13. Lisäksi suositellaan, että analyysiin on käytettävissä vähintään kolme käsittelypitoisuutta ja kolme vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä, vaikka tämä ei olekaan validiteettiperuste. Liiallinen kuolleisuus, joka vaarantaa tietyn käsittelyn, määritellään näin: > 4 kuollutta eläintä (> 20 %) kahdessa tai useammassa rinnakkaisnäytteessä, kun niitä ei voida selittää teknisellä virheellä. Analyysia varten saatavilla on oltava vähintään kolme käsittelypitoisuutta, joissa ei ole merkkejä selvästä toksisuudesta. Selvän toksisuuden merkkejä ovat esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjalla makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen, ärsykkeisiin reagoimattomuus, morfologiset poikkeavuudet (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), verta vuotavat leesiot ja vatsan turvotus.

14. Jos havaitaan poikkeama testin validiteettikriteereistä, sen vaikutukset testitulosten luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä poikkeamat ja niihin liittyvät näkökohdat on sisällytettävä testiraporttiin.

MENETELMIEN KUVAUS

Laitteisto

15. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a) lämpötilan valvontalaitteet (ts. lämmittimet tai jäähdyttimet, säädettävä lämpötila 21 ± 1 °C)

b) lämpömittari

c) kaksiokulaarinen dissektiomikroskooppi ja dissektiovälineet

d) digitaalikamera, jonka tarkkuus on vähintään neljä megapikseliä ja jossa on mikrotoiminto (tarvittaessa)

e) analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,001 mg tai 1 µg

f) liuenneen hapen mittari ja pH-mittari

g) valotehon mittari, jossa mittayksikkönä luksi.

Vesi

Lähde ja laatu

16. Mitä tahansa paikallisesti saatavilla olevaa laimennusvettä (esim. lähdevettä tai aktiivihiilisuodatettua hanavettä), jossa *X. laevis* voi kasvaa ja kehittyä normaalisti, voidaan käyttää. Todisteet normaalista kasvusta tässä vedessä on esitettävä. Koska paikallisen veden laatu voi vaihdella huomattavasti alueelta toiselle, veden laatu on analysoitava etenkin silloin, jos saatavilla ei ole aiempia tietoja veden käyttökelpoisuudesta sammakkoeläinten toukkien kasvattamisessa. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), torjunta-aineet, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava ennen testin aloittamista ja/tai esimerkiksi kuuden kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään olevan suhteellisen vakio. Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia.

Testiveden jodipitoisuus

17. Jotta kilpirauhanen voi syntetisoida tyroksiinihormonia normaalin muodonvaihdoksen tukemiseksi, toukkien on saatava vedestä ja ravinnosta riittävästi jodia. Tällä hetkellä empiirisesti johdettuja ohjeita asianmukaisen kehityksen varmistavista vähimmäisjodipitoisuuksista ravinnossa tai vedessä ei ole. Jodin saatavuus voi kuitenkin vaikuttaa siihen, miten kilpirauhasjärjestelmä reagoi kilpirauhaseen vaikuttaviin aineisiin, ja sen tiedetään muokkaavan kilpirauhasen perustoimintaa. Tämä seikka on syytä ottaa huomioon kilpirauhasen histopatologisia tuloksia tulkittaessa. Aiempien tutkimusten perusteella testin on osoitettu toimivan hyvin, kun laimennusveden jodin (I^{-}) pitoisuus vaihteli välillä 0,5–10 µg/l. Ihannetapauksessa laimennusveden vähimmäisjodipitoisuuden tulisi olla 0,5 µg/l koko testin ajan (lisättynä natrium- tai kaliumsuolana). Jos testivesi valmistetaan deionisoidusta vedestä, jodia on lisättävä sen verran, että vähimmäispitoisuudeksi tulee 0,5 µg/l. Testivedestä (ts. laimennusvedestä) mitatut jodipitoisuudet ja testiveden täydentäminen jodilla tai muilla suoloilla (jos käytetty) on raportoitava. Jodipitoisuus voidaan mitata myös ravinnosta testiveden lisäksi.

Altistusjärjestelmä

18. Testin kehittämisessä käytettiin läpivirtauslaimenninjärjestelmää. Järjestelmän veden kanssa kosketuksiin joutuvien osien tulee olla lasia, ruostumatonta terästä ja/tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Altistussäiliöiden on oltava lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja akvaarioita, ja säiliön käyttötilavuuden tulee olla 4,0–10,0 litraa (veden vähimmäissyvyys 10–15 cm). Järjestelmässä on voitava käyttää kaikkia altistuspitoisuuksia, kontrollia ja tarvittaessa liuotinkontrollia sekä neljää rinnakkaisnäytettä käsittelyä kohti ja kahdeksaa rinnakkaisnäytettä kontrolleja kohti. Jokaisen säiliön virtausnopeuden on oltava tasainen, kun otetaan huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpitäminen että kemikaalialtistus. Virtausnopeuden on oltava riittävä (säiliön tilavuuden on vaihduttava vähintään 5 kertaa päivässä). Näin vältetään kemikaalipitoisuuden pienentyminen sekä testiorganismien että akvaarioissa olevien vesieliöiden metabolian tai abioottisten hajoamisreittien (hydrolyysi, fotolyysi) tai häviämisen (haihtuminen, sorptio) takia. Käsittelysäiliöt on laitettava altistusjärjestelmään sattumanvaraisiin paikkoihin, jotta mahdolliset sijainnista johtuvat vaikutukset sekä pienet lämpötilan, valotehon jne. vaihtelut voidaan minimoida. Lisätietoja läpivirtaukseen perustuvan altistusjärjestelmän rakentamisesta on ASTM:n oppaassa ”Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians” (16).

Kemikaalin annostelu: testiliuosten valmistaminen

19. Altistusjärjestelmän testiliuokset valmistetaan annostelemalla testikemikaalin varastoliuosta altistusjärjestelmään asianmukaisella pumpulla tai muulla laitteella. Varastoliuoksen virtausnopeus on kalibroitava testiliuosten analyyttisten vahvistusten perusteella ennen altistumisen aloittamista, ja se on tarkistettava volymetrisesti säännöllisin väliajoin testin aikana. Jokaisen kammion testiliuoksen on vaihduttava vähintään viisi kertaa päivässä.

20. Menetelmä, jolla testikemikaali annostellaan järjestelmään, voi vaihdella kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Ennen testiä on siksi hankittava kemikaalista perustiedot, joilla on merkitystä sen testattavuuden kannalta. Hyödyllisiä tietoja testikemikaalin ominaisuuksista ovat rakennekaava, molekyylipaino, puhtaus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a ja K_{ow}, vesiliukoisuus (mieluiten testimediumissa) ja höyrynpaine sekä tulokset nopean biohajoavuuden testistä (testimenetelmä C.4 (17) tai C.29 (18)). Liukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää haihtumisen vuoksi testin aikana. Tämän testin tekemistä ilman edellä lueteltuja tietoja on syytä harkita tarkkaan, koska testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikuttavat tutkimuksen rakenteeseen ja ilman näitä tietoja testin tuloksia voi olla vaikea tulkita tai ne voivat olla merkityksettömiä. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja havaitsemisrajaltaan tunnettu luotettava analyysimenetelmä, jolla testikemikaali voidaan määrittää kvantitatiivisesti testiliuoksissa. Vesiliukoiset testikemikaalit voidaan liuottaa laimennusveden alikvootteihin sellaisena pitoisuutena, jolla saadaan aikaiseksi testin tavoitepitoisuus läpivirtausjärjestelmässä. Huoneenlämmössä nestemäisten tai kiinteiden tai veteen kohtalaisesti liukenevien kemikaalien yhteydessä voidaan tarvita neste:neste- tai neste:kiinteä aine (esim. lasivillakolonni) -saturaattoreita (19). Vaikka voi olla mahdollista annostella erittäin hydrofobisia kemikaaleja ruoan seassa, tämän altistusreitin käyttämisestä tässä testissä on tähän mennessä niukalti kokemusta.

21. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos tulee valmistaa mieluiten vain sekoittamalla tai ravistamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisin menetelmin (ts. sekoittamalla ja/tai ultraäänellä). Saturaatiopylväitä/-järjestelmiä tai passiivisia annostelumenetelmiä (20) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Ensisijaisesti tulee käyttää liuotinvapaata testijärjestelmää. Koska eri testikemikaaleilla on erilaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kemikaalialtistusveden valmistamisessa on ehkä käytettävä erilaisia lähestymistapoja. Liuottimien tai kantaja-aineiden käyttöä on pyrittävä välttämään kaikin keinoin, koska 1) tietyt liuottimet voivat aiheuttaa toksisuutta ja/tai ei-toivottuja tai odottamattomia vasteita, 2) kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden ylittävänä määränä (kuten voi usein olla liuottimien käytön yhteydessä) voi johtaa vaikuttavien pitoisuuksien epätarkkoihin määrityksiin, 3) liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi johtaa huomattavaan biokalvon muodostumiseen, joka liittyy mikrobien toimintaan ja voi vaikuttaa ympäristöolosuhteisiin ja altistuspitoisuuksien säilymiseen, ja 4) jollei ole aikaisempia tietoja, jotka osoittavat, ettei liuotin vaikuta tutkimuksen tulokseen, liuottimien käyttö edellyttää liuotinkontrollikäsittelyä, millä on merkittäviä vaikutuksia eläinten hyvinvointiin, koska testin tekemiseen tarvitaan lisää koe-eläimiä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (21) perusteella. Liuotin valitaan testikemikaalin kemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, onko liuottimen käytöstä saatavana aikaisempia tietoja. Jollei aikaisempia tietoja ole, liuottimen sopivuus on määritettävä ennen lopullisen tutkimuksen tekemistä. Jos liuottimen käyttö on välttämätöntä ja mikrobitoimintaa (biokalvon muodostumista) ilmenee, on suositeltavaa kirjata/ilmoittaa biokalvon muodostumista koskevat tiedot säiliötä kohti (vähintään viikoittain) koko testin ajan. Ihannetapauksessa liuotinpitoisuus olisi pidettävä vakiona liuotinkontrollissa ja kaikissa testikäsittelyissä. Jos liuottimen pitoisuus ei pysy vakiona, liuotinkontrollissa on käytettävä testikäsittelyn suurinta liuotinpitoisuutta. Jos käytetään liuotinta kantaja-aineena, suurin liuotinpitoisuus saa olla 100 µl/l tai 100 mg/l (21), mutta liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman pienenä (esim. < 20 µl/l), jotta vältetään liuottimen mahdolliset vaikutukset mitattaviin päätetapahtumiin (22).

Koe-eläimet

Testilajit

22. Testilaji on *X. laevis*, koska sitä 1) kasvatetaan yleisesti laboratorioissa kautta maailman, 3) on saatavana helposti kaupallisilta toimittajilta ja 3) sen geneettinen sukupuoli voidaan määrittää.

Aikuisten eläinten hoito ja lisääntyminen

23. *X. laeviksen* asianmukaista hoitoa ja lisääntymistä kuvataan vakio-ohjeissa (23). Myös Read (24) on kuvannut sen elinolosuhteita ja hoitoa. Lisääntymisprosessi käynnistetään injektoimalla 3–5 parille aikuisia naaraita ja koiraita ihmisen koriongonadotropiinia (hCG:tä) intraperitoneaalisesti. Naaraille injektoidaan 800–1 000 IU ja koiraille 500–800 IU 0,6–0,9-prosenttiseen suolaliuokseen liuotettua hCG:tä (joka voidaan liuottaa myös sammakoiden Ringerin liuokseen eli sammakkoeläimille käytettävään isotoniseen suolaliuokseen). Injektiotilavuuden tulee olla noin 10 µl painogrammaa kohti (~1 000 µl). Parit, joiden on määrä lisääntyä, pidetään suurissa säiliöissä häiriöittä ja staattisissa olosuhteissa, jotta eläimet hakeutuvat paritteluasentoon helpommin. Jokaisessalisääntymissäiliössä

tulee olla ruostumattomasta teräsverkosta valmistettu valepohja (silmäkoko 1,25 cm), jotta munat laskeutuvat säiliön pohjalle. Sammakot, joille hCG-injektio annetaan myöhään iltapäivällä, laskevat valtaosan munistaan yleensä seuraavan aamupäivän puolivälissä. Kun munia on laskettu riittävästi ja kun ne on hedelmöitetty, aikuiset eläimet on otettava pois lisääntymissäiliöistä. Sen jälkeen munat kerätään ja hyytelömäiset kuoret poistetaan L-kysteiinikäsittelyllä (23). Sitä varten on valmistettava 2-prosenttinen L-kysteiiniliuos, ja sen pH-arvoksi on säädettävä 8,1, mikä tehdään 1 M:lla NaOH:ta. Tämä liuos, jonka lämpötila on 21 °C, lisätään 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää yhden kudun munat. Pulloa sekoitetaan varovasti 1–2 minuuttia ja sen jälkeen se huuhdellaan perusteellisesti 6–8 kertaa 21-asteisella kasvatusvedellä. Tämän jälkeen munat siirretään kiteytysmaljaan ja tutkitaan, onko niistä > 70 prosenttia elinkykyisiä; alkioissa, joiden solujen todetaan jakautuvan, voi olla pieniä poikkeavuuksia.

TESTIN RAKENNE

Testipitoisuudet

24. On suositeltavaa käyttää vähintään neljää kemikaalipitoisuutta ja asianmukaisia kontrolleja (myös liuotinkontrolleja tarvittaessa). Pitoisuuksien porrastuskerroin voi olla 3,2; sitä suurempia kertoimia ei yleensä suositella.

25. Mikäli mahdollista, tässä testissä tulisi käyttää olemassa olevien sammakkoeläintutkimusten tuloksia suurimman testipitoisuuden määrittämisessä, jotta selvästi toksiset pitoisuudet voidaan välttää. Tämän pitoisuuden määrittämisessä apua voi olla esimerkiksi kvantitatiivisiin rakenne-aktiivisuussuhteisiin ja vertailuun perustuvista tiedoista sekä muiden sammakkoeläintutkimusten tuloksista. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi sammakkoeläinten muodonvaihdostutkimus, testimenetelmä C.38 (25) ja sammakon alkion teratogeneesitesti – *Xenopus* (23) ja/tai esimerkiksi testimenetelmien C.48, C.41 ja C.49 kaltaiset kalatestit (26) (27) (28). Ennen LAGDA-testin tekemistä voidaan tehdä pitoisuusalueen määritystesti. Pitoisuusalueen määrittämistä koskeva altistus suositellaan aloitettavaksi 24 tunnin kuluessa hedelmöittymisestä, ja sitä pitää jatkaa 7–14 päivää (tarvittaessa kauemminkin). Testipitoisuudet pitää asettaa niin, että testipitoisuuksien välinen kerroin on enintään 10. Pitoisuusalueen määritystestin tarkoituksena on määrittää suurin LADGA-testissä käytettävä pitoisuus. Jos on käytettävä liuotinta, liuottimen sopivuus (eli se, voiko se vaikuttaa tutkimuksen tulokseen) voidaan selvittää osana pitoisuusalueen määritystestiä.

Rinnakkaisnäytteet käsittelyryhmissä ja kontrolleissa

26. Testissä on käytettävä vähintään neljää rinnakkaisnäytesäiliötä testipitoisuutta kohti ja vähintään kahdeksaa rinnakkaisnäytettä kontrolleja (ja tarvittaessa liuotinkontrollia) kohti (ts. kontrollien ja mahdollisen liuotinkontrollin rinnakkaisnäytteiden määrä tulee olla kaksi kertaa niin suuri kuin kunkin käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteiden lukumäärän. Näin varmistetaan riittävä tilastollinen voima). Kussakin rinnakkaisnäytteessä saa olla enintään 20 eläintä. Käsiteltävien eläinten vähimmäismäärä on 15 (5 eläintä NF-vaiheen 62 osaotokseen ja 10 juveniilia). Jokaisen rinnakkaisnäytteen mahdolliset kuolleet eläimet kuitenkin korvataan lisäämällä näytteeseen eläimiä, jotta säilytetään kriittinen määrä eli 15.

MENETTELY

Testin yleiskuvaus

27. Testi aloitetaan hiljattain muodostuneilla alkioilla (NF-vaihe 8–10), ja sitä jatketaan siihen saakka, kunnes alkiot ovat kehittyneet juveniileiksi. Eläimet tutkitaan päivittäin kuolleisuuden ja mahdollisten epänormaalin käyttäytymisen merkkien varalta. NF-vaiheessa 62 otetaan osaotos toukista (enintään 5 eläintä / rinnakkaisnäyte), ja niistä tutkitaan eri päätetapahtumia (taulukko 1). Kun kaikki eläimet ovat kehittyneet NF-vaiheeseen 66 eli kun muodonvaihdos on tapahtunut (tai 70 päivän kuluttua testin aloittamisesta sen mukaan, kumpi tapahtuu ensin), tehdään satunnainen karsinta (ilman osaotosta) eläinten määrän vähentämiseksi (10 eläintä / säiliö) (ks. 43 kohta). Muiden eläinten altistusta jatketaan siihen asti, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaanista kontrollissa. Testin päättyessä (näytteenotto juveniileista) tehdään lisää mittauksia (taulukko 1).

Altistusolosuhteet

28. Perusteellinen yhteenveto testiparametreista on lisäyksessä 3. Altistusjakson aikana liuennut happi, lämpötila ja testiliuosten pH-arvo on mitattava päivittäin. Johtavuus, emäksisyys ja kovuus mitataan kerran kuukaudessa. Testiliuosten lämpötilan osalta rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen väliset erot (yhtenä päivänä) saavat olla enintään 1,0 °C, ja testiliuosten pH-arvon ero rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välillä saa olla enintään 0,5.

29. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet voidaan poistaa säiliöistä lapolla päivittäin. Siinä on kuitenkin oltava huolellinen säiliöiden ristikontaminaation välttämiseksi. Myös stressin ja traumojen aiheuttaminen eläimille on pidettävä minimissään varsinkin niiden liikuttelun, akvaarioiden puhdistamisen ja käsittelyn aikana. Stressiä aiheuttavia olosuhteita/toimia (esimerkiksi kova ja/tai jatkuva melu, akvaarioihin koputtelu, säiliöön kohdistuva tärinä) on vältettävä.

Altistumisaika testikemikaalille

30. Altistuminen aloitetaan hiljattain muodostuneilla alkioilla (NF-vaihe 8–10), ja sitä jatketaan 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta (≤ 45 päivää testin aloittamisesta) kontrolliryhmässä. Yleensä LAGDA-testi kestää 16 viikkoa (ja enintään 17 viikkoa).

Testin aloittaminen

31. Testin aloittamisessa käytettyjen, poikasia saaneiden eläimien on täytynyt osoittaa aikaisemmin, että ne tuottavat jälkeläisiä, joiden geneettinen sukupuoli voidaan määrittää (lisäys 5). Aikuisten sammakoiden kutemisen jälkeen kerätään alkiot, joista poistetaan hyytelömäinen kuori kysteiinikäsittelyllä, ja ne seulotaan elinkyvyn perusteella (23). Kysteiinikäsittelyn ansiosta alkioita voidaan käsitellä seulonnan aikana ilman, että ne tarttuvat pintoihin. Seulonta tehdään dissektiomikroskoopilla, ja elinkyvyttömät alkiot poistetaan käyttämällä sopivankokoista tiputuspipettiä. Testissä suositellaan käytettävän yhdestä kutukerrasta peräisin olevia alkioita, joiden elinkyky on yli 70 prosenttia. NF-vaiheessa 8–10 olevat alkiot jaetaan satunnaisesti altistuskäsittelysäiliöihin, joissa on riittävästi laimennusvettä, kunnes jokaisessa säiliössä on 20 alkiota. Alkioita on käsiteltävä tämän siirron aikana varovasti, jotta käsittelystä aiheutuu mahdollisimman vähän stressiä ja jotta vältetään mahdolliset vammat. Kun hedelmöittymisestä on kulunut 96 tuntia, sammakonpoikasten olisi täytynyt siirtyä vesikolonnista ja alkaa tarttua säiliöiden seiniin.

Ruokinta

32. Ravinto ja ruokintatiheyden muutos *X. laeviksen* elinkaaren eri vaiheissa on hyvin tärkeä osa LAGDA-testin protokollaa. Liiallinen ruokinta toukkavaiheen aikana johtaa yleensä siihen, että skolioosin ilmaantuvuus ja sen vakavuus (lisäys 8) kasvaa, ja tätä pitäisi välttää. Vastaavasti liian vähäinen ruokinta toukkavaiheessa johtaa suuresti vaihtelevaan kehitysnopeuteen kontrolleissa, mikä voi vaarantaa testin tilastollisen voiman tai aiheuttaa virheellisiä testituloksia. Lisäyksessä 4 on kerrottu *X. laevikselle* suositeltu toukka- ja juveniilivaiheen ruokavalio ja ruokinta-aikataulu läpivirtausolosuhteissa, mutta vaihtoehtoja saa käyttää, kunhan testiorganismit kasvavat ja kehittyvät asianmukaisesti. On tärkeää muistaa, että jos mitataan endokriinisiä päätetapahtumia, ravinnossa ei saa olla endokriinisesti vaikuttavia aineita, kuten soijarehua.

Toukkien ruokinta

33. Toukille suositeltu ruokavalio koostuu lohien kasvatusravinnosta, *Spirulina*-levätableteista ja kultakalan ruoasta (esim. TetraFin®-hiutaleet, Tetra, Saksa), jotka sekoitetaan kasvatus- (tai laimennus)veteen. Tätä sekoitusta annetaan kolme kertaa päivässä arkipäivisin ja kerran päivässä viikonloppuisin. Sammakonpoikasia ruokitaan myös elävillä suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) 24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla kahdesti päivässä arkipäivisin ja kerran päivässä viikonloppuisin alkaen päivästä 8 hedelmöittymisen jälkeen. Toukkien ruokinnan on oltava yhdenmukaista jokaisessa testiastiassa, ja sen on mahdollistettava testieläinten asianmukainen kasvu ja kehitys. Näin varmistetaan testintulosten toistettavuus ja siirrettävyys: 1) kontrolleissa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajan on oltava ≤ 45 päivää ja 2) ja kontrolleissa suositeltavan keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulisi olla 1,0 ± 0,2 g.

Juveniilien ruokinta

34. Kun muodonvaihdos on tapahtunut, ruokavalio koostuu laadukkaasta uppoavasta sammakonruoasta (esim. Sinking Frog Food -3/32, Xenopus Express, FL, Yhdysvallat) (lisäys 4). Sammakonpoikasille (varhaisvaiheen juveniileille) pelletit jauhetaan nopeasti kahvimyllyssä tai tehosekoittimessa tai murskataan huhmareessa survimella niiden koon pienentämiseksi. Kun juveniilit ovat tarpeeksi isoja voidakseen syödä kokonaisia pellettejä, jauhaminen tai murskaaminen ei ole enää tarpeen. Eläimiä tulee ruokkia kerran päivässä. Juveniilien ruokinnan on mahdollistettava eläinten asianmukainen kasvu ja kehitys: testin päättyessä kontrollien juveniilien suositeltava keskimääräinen paino on 11,5 ± 3 g.

Analyyttinen kemia

35. Ennen testin aloittamista testikemikaalin stabiilisuus (ts. liukoisuus, hajoavuus ja haihtuvuus) ja kaikki analyysimenetelmät on määritettävä esimerkiksi saatavilla olevien tietojen tai tietämyksen perusteella. Laimennusvettä annosteltaessa on suositeltavaa analysoida jokaisen rinnakkaisnäytesäiliön testiliuos ennen testin aloittamista järjestelmän toimintakyvyn varmistamiseksi. Altistusjaksolla testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin, mieluiten joka viikko vähintään yhdestä jokaisen käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteestä siten, että saman käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteissä vuorotellaan joka viikko. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus liuoksessa on kuitenkin hyväksyttävästi ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää joko nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia. Myös mitattujen testipitoisuuksien variaatiokertoimen (CV) on oltava 20 prosenttia tai vähemmän koko testin ajan tietyn käsittelyn jokaisen pitoisuuden osalta. Jos mitatut pitoisuudet eivät ole 80–120 prosenttia nimellispitoisuudesta (esimerkiksi testattaessa nopeasti biohajoavia tai adsorptiivisia kemikaaleja), vaikuttavat pitoisuudet on määritettävä ja ilmoitettava suhteessa läpivirtaustestien aritmeettiseen keskiarvopitoisuuteen.

36. Laimennusveden ja varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava sopivin väliajoin (esim. kolme kertaa viikossa) altistuksen koko keston ajan. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joita ei voida havaita kokonaan tai lainkaan nimellispitoisuuksina (esim. koska ne hajoavat tai adsorpoituvat testiastioissa nopeasti tai koska ne selvästi kertyvät altistettujen eläimien ruumiisiin), on suositeltavaa mukauttaa jokaisen kammion testiliuoksen vaihtumisnopeus siten, että testipitoisuudet saadaan pidettyä mahdollisimman vakioina.

Havainnot ja päätetapahtumien mittaukset

37. Altistumisen aikana arvioidaan päätetapahtumia, jotka viittaavat toksisuuteen (kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen, kuten sairauden ja/tai yleistyneen toksisuuden kliiniset merkit), ja kasvuparametreja (pituus ja paino). Lisäksi arvioidaan patologisia päätetapahtumia, jotka voivat liittyä sekä yleistyneeseen toksisuuteen että endokriinisiin vaikutustapoihin, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin reitteihin. Testin päättyessä voidaan lisäksi mitata plasman VTG-pitoisuus valinnaisesti. VTG:n mittaamisesta voi olla hyötyä tutkimustulosten ymmärtämisessä oletettujen hormonaalisten haitta-aineiden endokriinisten vaikutusmekanismien kannalta. Yhteenveto päätetapahtumista ja mittausajankohdista on taulukossa 1.

Taulukko 1

Yhteenveto LAGDA-testin päätetapahtumista

Päätetapahtumat (*)	Päivittäin	Välinäytteenotto (toukat)	Testin päättyessä (juveniilit)
Kuolleisuus ja poikkeavuudet	X		
Aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen		X	
Histo(pato)logia (kilpirauhanen)		X	
Morfometriikka (kasvu painon ja pituuden perusteella)		X	X
Maksan somaattinen indeksi (LSI)			X
Geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde			X
Histopatologia (sukurauhaset, lisääntymiselimet, munuaiset ja maksa)			X
Vitellogeniini (VTG) (valinnainen)			XX

(*) Kaikki päätetapahtumat analysoidaan tilastollisesti.

Kuolleisuus ja päivittäiset havainnot

38. Kaikki testisäiliöt on tarkastettava päivittäin kuolleiden eläinten varalta, ja kuolleiden määrä on kirjattava muistiin jokaisesta säiliöstä. Kuolleet eläimet on poistettava testisäiliöstä heti, kun ne havaitaan. Kuolleiden eläinten kehitysvaihe on luokiteltava joko NF-vaihetta 58 edeltäväksi (ennen eturaajan kehittymistä), NF-vaiheiden 58 ja 62 väliseksi, NF-vaiheen 63 ja 66 väliseksi (NF-vaiheen 62 ja pyrstön täydellisen surkastumisen välillä) tai NF-vaiheen 66 jälkeiseksi (toukkavaiheen jälkeinen vaihe). Jos kuolleisuus on yli 20 prosenttia, se saattaa olla merkki epätarkoituksenmukaisista testiolosuhteista tai testikemikaalin selvistä toksisista vaikutuksista. Eläimet ovat yleensä herkimpiä muista kuin kemikaaleista johtuville kuolleisuustapahtumille kehityksen muutaman ensimmäisen päivän aikana kudun jälkeen ja muodonvaihdoksen huippukohdan aikana. Tällainen kuolleisuus voi käydä selvästi ilmi kontrolliaineistosta.

39. Myös mahdolliset havainnot epänormaalista käyttäytymisestä, selvästi nähtävistä epämuodostumista (esim. skolioosi) tai leesioista on kirjattava. Skolioosihavainnot on laskettava (ilmaantuvuus) ja niiden vakavuus on arvioitava (esim. merkityksetön – 0, vähäinen – 1, kohtalainen – 2, vaikea – 3; lisäys 8). On pyrittävä varmistamaan, että kohtalaisen ja vaikean skolioosin esiintyvyys on vähäistä (esim. alle 10 prosenttia kontrolleissa) koko tutkimuksessa, joskaan se, että kontrolleissa esiintyy enemmän poikkeavuuksia, ei välttämättä ole syy lopettaa testiä. Vesikolonnissa olevien toukkavaiheen eläinten käyttäytyminen on normaalia, kun niiden pyrstö on päätä korkeammalla, niiden peräevän liike on säännöllisen rytmikästä, ne tulevat ajoittain pintaan, niiden kiduskannet toimivat ja ne reagoivat ärsykkeisiin. Epänormaalia käyttäytymistä on esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjassa makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen ja ärsykkeisiin reagoimattomuus. Muodonvaihdoksen tehneiden eläinten osalta on edellä mainitun epänormaalin käyttäytymisen lisäksi kirjattava myös selvät erot ravinnon kulutuksessa käsittelyjen välillä. Selviä epämuodostumia ja leesioita voivat olla esimerkiksi morfologiset poikkeamat (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), vatsan turvotus, verta vuotavat leesiot sekä bakteeri- tai sieni-infektiot. Juveniilien päässä heti sierainten takana olevat leesiot voivat olla merkki riittämättömästä kosteudesta. Nämä määritykset ovat laadullisia, ja ne on rinnastettava sairaudesta/stressistä kertoviin kliinisiin merkkeihin kontrollieläimiin vertaamalla. Jos näitä merkkejä esiintyy altistussäiliöissä enemmän kuin kontrollisäiliöissä, niitä on pidettävä osoituksena selvästä toksisuudesta.

Osaotos toukista

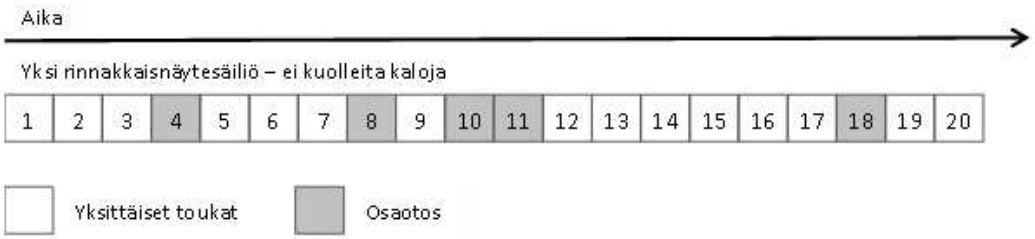
Osaotos toukista pääpiirteissään

40. NF-vaiheen 62 saavuttaneet sammakonpoikaset on otettava pois säiliöistä, ja niistä on joko otettava näytteet tai ne on siirrettävä altistuksen seuraavaan osaan uuteen säiliöön, tai ne on erotettava muista samassa säiliössä olevista sammakonpoikasista fyysisesti väliseinällä. Sammakonpoikaset tarkastetaan päivittäin, ja tutkimuksen se päivä, jona yksi sammakonpoikanen saavuttaa NF-vaiheen 62, kirjataan muistiin. Määräävä ominaisuus, jota tässä arvioinnissa käytetään, on pään muoto. Kun pään koko on pienentynyt siinä määrin, että se on silmämääräisesti yhtä leveä kuin sammakonpoikasen muu ruumis, ja kun eturaaja on sydämen keskipisteen tasolla, kyseisen yksilön katsotaan saavuttaneen NF-vaiheen 62.

41. Tavoitteena on ottaa näytteet yhteensä viidestä NF-vaiheen 62 saavuttaneesta sammakonpoikasesta yhtä rinnakkaisnäytesäiliötä kohti. Tämä tulee tehdä täysin satunnaisesti, mutta siitä on päätettävä etukäteen. Hypoteettinen esimerkki rinnakkaisnäytesäiliöstä on **kuvassa 1**. Jos tietyssä säiliössä on 20 elossa olevaa sammakonpoikasta, kun ensimmäinen yksilö saavuttaa NF-vaiheen 62, väliltä 1–20 on valittava viisi satunnaista numeroa. Sammakonpoikanen nro 1 on ensimmäinen yksilö, joka saavutti NF-vaiheen 62, ja sammakonpoikanen nro 20 on säiliön viimeinen yksilö, joka saavutti tämän vaiheen. Jos säiliössä on 18 elossa olevaa toukkaa, nämä viisi satunnaista numeroa valitaan väliltä 1–18. Tämä on tehtävä jokaiselle rinnakkaisnäytesäiliölle, kun testin ensimmäinen yksilö saavuttaa NF-vaiheen 62. Jos NF-vaiheen 62 näytteenoton aikana havaitaan kuolleita yksilöitä, loput näytteet on satunnaistettava uudelleen sen mukaan, montako toukkaa ei vielä ole NF-vaiheessa 62 ja montako lisänäytettä tarvitaan, jotta kyseisestä rinnakkaisnäytteestä saadaan yhteensä viisi näytettä. Sinä päivänä, jona yksi sammakonpoikanen saavuttaa NF-vaiheen 62, katsotaan tehdystä näytteenottokaaviosta, käytetäänkö tätä yksilöä näytteenotossa vai erotetaanko se fyysisesti muista sammakonpoikasista altistuksen jatkuessa. Annetussa esimerkissä (kuva 1) ensimmäinen NF-vaiheen 62 saavuttanut yksilö (ts. laatikko nro 1) erotetaan muista poikasista fyysisesti, sen altistusta jatketaan ja päivä, jona tämä yksilö saavutti NF-vaiheen 62, kirjataan. Yksilöitä nro 2 ja 3 käsitellään samalla tavalla kuin yksilöä nro 1. Yksilöltä nro 4 otetaan näytteet kasvua ja kilpirauhasen histologiaa varten (tässä esimerkissä). Tätä menettelyä jatketaan, kunnes 20. yksilö joko liittyy muihin NF-vaiheen 62 jälkeisessä vaiheessa oleviin yksilöihin tai sitä käytetään näytteenotossa. Tässä on käytettävä sellaista satunnaistamismenetelmää, että jokaisella testin organismilla on yhtäläinen todennäköisyys tulla valituksi. Tämä voidaan saavuttaa millä tahansa satunnaistavalla menetelmällä, mutta se edellyttää myös, että jokainen sammakonpoikanen joutuu haaviin jossakin kohtaa NF-vaiheen 62 osaotosjaksoa.

Kuva 1

Hypoteettinen esimerkki NF-vaiheen 62 näytteenotosta yhdestä rinnakkaisnäytesäiliöstä



42. Toukkaosaotoksesta tutkitaan seuraavat päätetapahtumat: 1) NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika (ts. hedelmöittymisen ja NF-vaiheen 62 välisten päivien lukumäärä), 2) ulkoiset poikkeavuudet, 3) morfometriikka (paino ja pituus) ja 4) kilpirauhasen histologia.

Sammakonpoikasten humaani lopettaminen

43. NF-vaiheen 62 saavuttaneista sammakonpoikasista (5 yksilöä rinnakkaisnäytesäiliötä kohti) koostuva osajoukko on lopetettava upottamalla ne 30 minuutiksi riittävään määrään (esim. 500 ml:aan) nukutusliuosta (esim. 0,3-prosenttinen MS-222-liuos, trikaiinimetaanisulfonaatti, CAS-nro 886-86-2). MS-222-liuos pitää puskuroida natriumbikarbonaatilla siten, että sen pH on noin 7,0, koska puskuroimaton MS-222-liuos on hapanta ja ärsyttää sammakon ihoa, jolloin se imeytyy huonosti ja aiheuttaa eläimille tarpeetonta lisästressiä.

44. Sammakonpoikanen nostetaan testikammiosta haavilla ja siirretään (asetetaan) lopetusliuokseen. Eläin on varmasti kuollut ja valmis ruumiinavaukseen, kun se ei reagoi ulkoisiin ärsykkeisiin, kuten takaraajan nipistämiseen pinseteillä.

Morfometriikka (paino ja pituus)

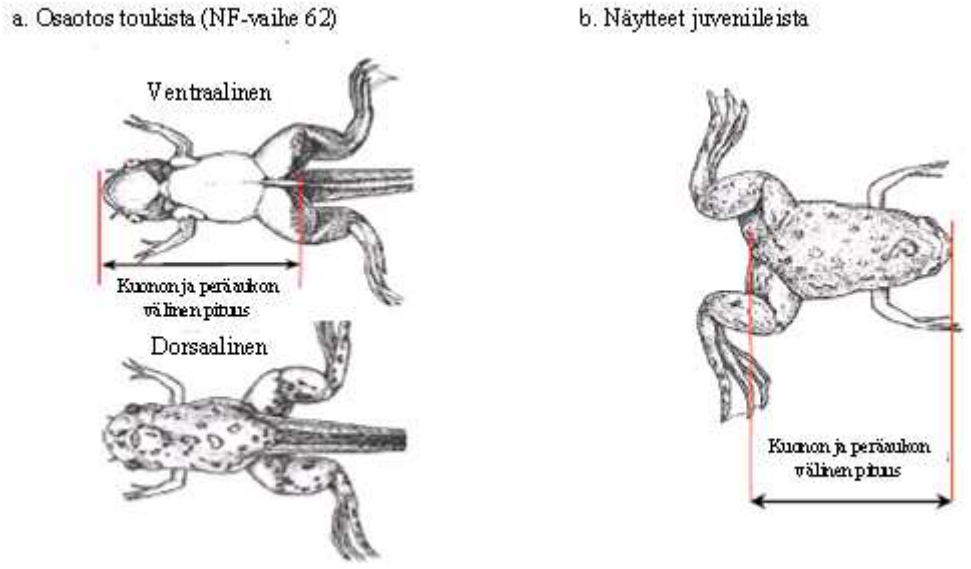
45. Jokaiselta sammakonpoikaselta on punnittava märkäpaino (pyöristys lähimpään milligrammaan) ja mitattava kuonon ja peräaukon välinen pituus (pyöristys lähimpään 0,1 mm:iin) heti, kun sen todetaan olevan reagoimaton nukutusliuoskäsittelyn jälkeen (kuva 2a). Kuonon ja peräaukon välinen pituus voidaan mitata myös valokuvasta kuvien analysointiohjelmalla. Ennen punnitsemista sammakonpoikasista on poistettava liiallinen vesi taputtelemalla ne kuiviksi. Kun koon mittaus (paino ja kuonon ja peräaukon välinen pituus) on tehty, kaikki selvät morfologiset poikkeamat ja/tai toksisuuden kliiniset merkit, kuten skolioosi (ks. lisäys 8), petekiat ja verenpurkaumat, on tallennettava tai kirjattava, ja digitaalista dokumentointia suositellaan. Petekiat ovat pieniä punaisia tai violetteja verenpurkaumia ihon hiussuonissa.

Kudosnäytteiden ottaminen ja kiinnittäminen

46. Osaotoksen toukkien kilpirauhasille tehdään histologinen arviointi. Eturaajojen jälkeinen alaruumis irrotetaan ja hävitetään. Siistitty muu osa ruumiista kiinnitetään Davidsonin kiinnitysaineella. Kiinnitysaineen tilavuuden säiliössä on oltava vähintään 10-kertainen kudosten arvioituun tilavuuteen nähden. Jotta tutkittavat kudokset kiinnittyvät asianmukaisesti, kiinnitysainetta sisältävää astiaa on sekoitettava tai ravistettava sopivalla tavalla. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa vähintään 48 mutta enintään 96 tuntia, minkä jälkeen ne huuhdellaan deionisoidulla vedellä ja säilötään 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (1) (29).

Kilpirauhasen histologia

47. Kunkin osaotokseen valitun toukan (kudokset kiinnitetty) kilpirauhanen tutkitaan histologisesti (diagnostinen ja vakavuusasteen arviointi) (29) (30).



Kuva 2: Kuonon ja peräaukon välisen pituuden mittauspisteet LAGDA-testissä NF-vaiheessa 62 (a) ja nuorilta sammakoilta (b). NF-vaiheen 62 määräävät ominaisuudet (a): Pää on yhtä leveä kuin muu ruumis, hajuhermon pituus on lyhyempi kuin hajurauhasen läpimitta (dorsaalisesti katsottuna), ja eturaajat ovat sydämen tasolla (ventraalisesti katsottuna). Kuvat muokattu teoksesta Nieuwkoop ja Faber (1994).

Toukkien altistuksen päättäminen

48. Kun otetaan huomioon sammakonpoikasten alkuperäinen määrä, on odotettavissa, että on todennäköisesti pieni prosenttiosuus yksilöitä, jotka eivät kehity normaalisti ja joiden osalta muodonvaihdos (NF-vaihe 66) ei tapahdu kokonaan kohtuullisen ajan kuluessa. Toukkavaiheen altistus saa kestää enintään 70 päivää. Kaikki tämän ajan jälkeen elossa olevat sammakonpoikaset on lopetettava (ks. 43 kohta). Niiltä on punnittava paino ja mitattava kuonon ja peräaukon välinen pituus. Lisäksi niiden kehitysvaihe on määritettävä Nieuwkoopin ja Faberin (1994) mukaisesti, ja mahdolliset kehitykselliset poikkeavuudet on merkittävä muistiin.

Karsinta NF-vaiheen 66 jälkeen

49. Jokaisesta säiliöstä kymmenen yksilön on jatkettava testiä NF-vaiheen 66 (pyrstön surkastuminen kokonaan) jälkeen altistuksen päättymiseen saakka. Siksi on tehtävä karsinta sen jälkeen, kun kaikki eläimet ovat saavuttaneet NF-vaiheen 66 tai kun 70 päivää on kulunut (sen mukaan, kumpi tapahtuu ensin). NF-vaiheen 66 jälkeiset eläimet, joiden altistusta ei jatketa, on valittava satunnaisesti.

50. Eläimet, joita ei valita altistuksen jatkamiseen, lopetetaan (ks. 43 kohta). Jokaisesta eläimestä määritetään kehitysvaihe, punnitaan märkäpaino ja mitataan kuonon ja peräaukon välinen pituus (kuva 2b), ja niille tehdään ruumiinavaus. Fenotyyppiseksi sukupuoleksi (sukurauhasten morfologian perusteella) kirjataan naaras, koiras tai määrittämätön.

Näytteenotto juveniileista

Näytteenotto juveniileista pääpiirteissään

51. Loppujen eläinten osalta altistusta jatketaan siihen saakka, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta laimennusvesikontrollissa (ja/tai liuotinkontrollissa, jos tarpeen). Altistusjakson päättyessä loput eläimet (enintään 10 sammakkoa rinnakkaisnäytettä kohti) lopetetaan, ja seuraavat päätetapahtumat mitataan tai arvioidaan ja niiden tiedot kirjataan: 1) morfometriikka (paino ja pituus), 2) fenotyyppisen/genotyyppisen sukupuolen suhde, 3) maksan paino (maksan somaattinen indeksi), 4) histopatologia (sukurauhaset, lisääntymiselimet, maksa ja munuaiset) ja valinnaisena 5) plasman VTG-pitoisuus.

Sammakoiden humaani lopettaminen

52. Juveniilit eläimet (muodonvaihdoksen tehneet sammakot) lopetetaan antamalla niille intraperitoneaalinen injektio nukutusainetta (esim. 10-prosenttinen MS-222) asianmukaisessa fosfaattipuskuroidussa liuoksessa. Sammakoilta voidaan ottaa näytteet, kun niistä on tullut reagoimattomia (yleensä noin kahden minuutin kuluttua injektiosta, jos 10-prosenttista MS-222-ainetta käytetään annoksella 0,01 ml/g sammakkoa kohden). Vaikka juveniilit sammakot voidaan upottaa pitoisuudeltaan voimakkaaseen nukutusaineeseen (MS-222), kokemus on osoittanut, että niiden lopettaminen tällä tavalla kestää kauemmin, ja sen kesto voi olla epätarkoituksenmukaista näytteenoton kannalta. Injektio on tehokas ja nopea lopettamiskeino ennen näytteenottoa. Näytteenottoa ei saa aloittaa, ennen kuin sammakoiden reagoimattomuus on varmistettu, jotta on varmaa, että ne ovat kuolleet. Jos sammakoissa on merkkejä huomattavasta kärsimyksestä (hyvin vakavasta ja kuolemaa selvästi ennakoivasta) ja jos ne ovat kuolemaisillaan, ne on nukutettava ja lopetettava. Aineiston analyysissa niitä on käsiteltävänä kuolemantapauksina. Jos sammakko lopetetaan sairauden vuoksi, se on merkittävä muistiin ja raportoitava. Sen mukaan, missä vaiheessa tutkimusta sammakko lopetetaan, se voidaan säilyttää histopatologista analyysia varten (jolloin se käsitellään kiinnitysaineella mahdollista histopatologista tutkimusta varten).

Morfometriikka (paino ja pituus)

53. Märkäpaino punnitaan ja kuonon ja peräaukon välinen pituus (kuva 2b) mitataan samalla tavalla kuin toukkaosaotoksessa.

Plasman VTG-pitoisuus (valinnainen)

54. VTG on laajalti hyväksytty biomarkkeri, joka on seurausta estrogeenisille kemikaaleille altistumisesta. LAGDA-testissä plasman VTG-pitoisuus voidaan mitata juveniilinäytteistä valinnaisesti (tällä voi olla erityistä merkitystä silloin, jos testikemikaalin oletetaan olevan estrogeenin tavoin vaikuttava).

55. Lopetetun juveniilin takaraajat leikataan ja verinäyte kerätään heparinisoituun kapillaariin (myös muita verenkeruumenetelmiä, kuten sydänpunktiota, voidaan käyttää). Veri siirretään mikrosentrifugiputkeen (tilavuus noin 1,5 ml), joka sentrifugoidaan plasman erottelemiseksi. Plasmanäytteet on säilytettävä -70 °C:ssa tai sitä kylmemmässä VTG-pitoisuuden määrittämiseen asti. Plasman VTG-pitoisuus voidaan mitata entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA) (lisäys 6) tai muulla menetelmällä, esimerkiksi massaspektrometrialla (31). Lajikohtaisten vasta-aineiden käyttöä suositellaan paremman herkkyyden vuoksi.

Geneettisen sukupuolen määrittäminen

56. Jokaisen juveniilin sammakon geneettinen sukupuoli määritetään Yoshimoton ja muiden (11) kehittämien markkereiden perusteella. Geneettisen sukupuolen määrittämistä varten otetaan osa yhdestä dissektion aikana irrotetusta takaraajasta (tai koko raaja) (tai osa muusta kudoksesta) ja laitetaan se mikrosentrifugiputkeen (sammakoiden kudosnäytteet voidaan ottaa mistä tahansa kudoksesta). Kudosta voidaan säilyttää – 20 °C:ssa tai sitä kylmemmässä deoksiribonukleiihinapon (DNA) eristämiseen saakka. DNA voidaan eristää kudoksista kaupallisesti saatavilla olevilla tarvikepaketeilla, ja markkerin olemassaolo tai puuttuminen analysoidaan polymeraasiketjureaktio (PCR) -menetelmällä (lisäys 5). Yleensä histologisen sukupuolen ja genotyypin välinen vastaavuus kontrollieläimillä juveniilivaiheen näytteenotossa kontrolliryhmissä on yli 95 prosenttia.

Kudosnäytteiden ottaminen ja kiinnittäminen histopatologisia tutkimuksia varten

57. Sukurauhaset, sukujohtimet, munuaiset ja maksat irrotetaan histologista analyysia varten lopullisessa näytteenotossa. Eläimen vatsaontelo avataan, ja maksa irrotetaan ja punnitaan. Seuraavaksi poistetaan ruoansulatuselimet (maha, suolet) varovasti vatsan alaosasta, jotta sukurauhaset, munuaiset ja sukujohtimet saadaan näkyviin. Sukurauhasten mahdolliset selvät morfologiset poikkeavuudet on kirjattava muistiin. Lopuksi on irrotettava vielä takaraajat, ellei niitä ole irrotettu jo aiemmin verinäytettä varten. Irrotetut maksat ja ruumiit, joihin sukurauhaset on jätetty paikalleen, on laitettava heti Davidsonin kiinnitysaineeseen. Kiinnitysaineen tilavuuden säiliössä on oltava vähintään 10-kertainen kudosten arvioituun tilavuuteen nähden. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa vähintään 48 mutta enintään 96 tuntia, minkä jälkeen ne huuhdellaan deionisoidulla vedellä ja säilötään 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (1) (29).

Histopatologia

58. Jokaiselle juveniilinäytteelle tehdään sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksakudoksen histopatologinen tutkimus (diagnoosi ja vaikeusasteen määritys) (32). Tämän tutkimuksen perusteella johdetaan myös sukurauhasten fenotyyppi (ts. munasarjat, kivekset, intersukupuolisuus), ja näitä havaintoja voidaan geneettisen sukupuolen yksilöllisten määritysten kanssa käyttää fenotyyppisten/genotyyppisten sukupuolten suhteen laskemiseen.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tilastoanalyysi

59. LAGDA-testistä saadaan kolmenlaisia tietoja, jotka voidaan analysoida tilastollisesti: 1) kvantitatiiviset jatkuvat tiedot (paino, kuonon ja peräaukon välinen pituus, maksan somaattinen indeksi, VTG), 2) tiettyyn tapahtumaan kulunut aika (time to event) kehitysnopeuden arviointia varten (esim. NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kuluneiden päivien määrä testin aloittamisesta) ja 3) histopatologisiin tutkimuksiin perustuvia numerotietoja poikkeavuuksien vaikeusasteista tai kehitysvaiheista.

60. Testin rakenteen ja tilastollisten testien valinnan tulisi mahdollistaa riittävä voima, jotta havaitaan biologisesti tärkeät muutokset sellaisissa päätetapahtumissa, joista on ilmoitettava NOEC- tai ECx-arvo. Aineiston tilastollisissa analyyseissa (yleensä rinnakkaisnäytteiden keskiarvon perusteella) on noudatettava mieluiten menettelyjä, jotka on kuvattu julkaisussa Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (33). Tämän testimenetelmän lisäyksessä 4 on suositeltua tilastoanalyysia kuvaava päätöksentekokaavio ja ohjeet aineiston käsittelystä sekä sopivimman tilastollisen testin tai mallin valinnasta LAGDA-testissä.

61. Juveniilien näytteenotosta saadut tiedot (esim. kasvu, maksan somaattinen indeksi) on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen, koska se määritetään kaikilta sammakoilta.

Tietojen analysointiin liittyviä näkökohtia

Vaarantuneiden rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen käyttö

62. Rinnakkaisnäytteet ja käsittelyt voivat vaarantua selvästä toksisuudesta johtuvan liiallisen kuolleisuuden, sairauksien tai teknisen virheen vuoksi. Jos käsittely vaarantuu sairauden tai teknisen virheen vuoksi, analyysia varten on oltava kolme vaarantumatonta käsittelyä ja kolme vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä. Jos selvää toksisuutta ilmenee suurten pitoisuuksien yhteydessä, analyysia varten on oltava mieluiten vähintään kolme käsittelypitoisuutta ja kolme vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä (OECD:n testiohjeissa noudatettavan suurin siedetty pitoisuus -lähestymistavan mukaisesti (34)). Kuolleisuuden lisäksi selvän toksisuuden merkkejä voivat olla käyttäytymiseen kohdistuvat vaikutukset (esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjalla makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen), morfologiset leesiot (esim. vertavuotavat leesiot, vatsan turvotus) tai normaalin ruokintavasteen estyminen, kun sitä verrataan laadullisesti kontrollieläimiin.

Liuotinkontrolli

63. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset (jos sitä on käytetty). Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja laimennusvesikontrolliryhmää tilastollisesti. Tärkeimmät tässä analyysissa huomioon otettavat päätetapahtumat ovat kasvuparametrit (paino ja pituus), koska yleistyneet toksisuusvaikutukset saattavat vaikuttaa niihin. Jos laimennusvesikontrollin ja liuotinkontrollin ryhmien välillä havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja näissä päätetapahtumissa, sen määrittämisessä, onko testin validiteetti vaarantunut, on käytettävä parasta tieteellistä asiantuntemusta. Jos kahden kontrollin välillä on eroja, kemikaalille altistettuja käsittelyjä on verrattava liuotinkontrolliin, ellei tiedetä, että laimennusvesikontrolliin vertaaminen on parempi vaihtoehto. Jos näiden kahden kontrolliryhmän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, suositellaan, että testikemikaalille altistettuja käsittelyjä verrataan yhdistettyihin (liuotin- ja laimennusvesi-)kontrolliryhmiin, ellei tiedetä, että vain jompaankumpaan vertaaminen on parempi vaihtoehto.

Testiraportti

64. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne. (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

— Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi ainesosien kemiallinen koostumus (ks. edellä), esiintymistiheys ja olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta (jos se tiedetään), hedelmöittyneiden munien lähde ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

— Tiedot skolioosin ilmaantuvuudesta aikaisemmissa kontrolleissa käytetyn varastoviljelmän osalta.

Testiolosuhteet:

— valoisa aikajakso (valoisat aikajaksot)

— testin rakenne (esimerkiksi kammion koko, materiaali ja veden määrä, testikammioiden ja rinnakkaisnäytteiden lukumäärä, testiorganismien määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtoväli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)

— testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumput, laimennusjärjestelmät)

— menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuutta aidossa liuoksessa

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännöskloori-pitoisuudet (jos ne on mitattu), kokonaisjodipitoisuus, orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspendoituneet kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testimediumin suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset

— nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat

— testiastioissa olevan veden laatu, pH, lämpötila (päivittäin) ja liuenneen hapen pitoisuus

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. ruoan tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotiheys).

Tulokset:

— todisteet siitä, että kontrollit täyttävät yleiset validiteettikriteerit

— seuraavat tiedot kontrolleista (myös liuotinkontrollista, jos sitä on käytetty) ja käsittelyryhmistä: havaittu kuolleisuus ja poikkeavuus, NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika, kilpirauhasen histologisen tutkimuksen tiedot (vain toukkanäytteistä), kasvu (paino ja pituus), maksan somaattinen indeksi (vain juveniilinäytteistä), geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde (vain juveniilinäytteistä), sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksan histopatologisen tutkimuksen tulokset (vain juveniilinäytteistä) ja plasman VTG-pitoisuus (vain juveniilinäytteistä, jos VTG-näyte on otettu)

— tilastollisessa analyysissa ja tietojen käsittelyssä sovellettu lähestymistapa (käytetty tilastollinen testi tai malli)

— pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä

— pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä (α = 0,05) tarvittaessa ECx kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut malliparametrit ja niiden vakiovirheet

— mahdolliset poikkeamat tästä testimenetelmästä ja hyväksymisperusteista sekä pohdinta niiden mahdollisista vaikutuksista testin tulokseen.

65. Päätetapahtumien mittaustuloksista on esitettävä keskiarvot ja keskihajonnat (sekä rinnakkaisnäytteiden että pitoisuuksien perusteella, mikäli mahdollista).

66. NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut mediaani aika on laskettava ja esitettävä rinnakkaisnäytteiden mediaanien keskiarvona ja niiden keskihajontana. Käsittelyjen osalta myös käsittelyn keston mediaani on laskettava ja esitettävä rinnakkaisnäytteiden mediaanien keskiarvona ja niiden keskihajontana.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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) Tämän liitteen C.4 luku, Biohajoavuuden määritys.

(18) Tämän liitteen C.29 luku, Biohajoavuuden määritys – CO_2 suljetuissa astioissa (Headspace-testi).

(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) Tämän liitteen luku C.38, Sammakkoeläinten muodonvaihdostutkimus

(26) Tämän liitteen luku C.48, Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus

(27) Tämän liitteen luku C.41, Kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi

(28) Tämän liitteen luku C.49, Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (fet-testi)

(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.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Apikaalinen päätetapahtuma: Aiheuttaa vaikutuksen populaation tasolla.

Kemikaali: Aine tai seos

ELISA: Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

ECx: (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC50 on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan päätetapahtumaan altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

phj: Päivää hedelmöittymisen jälkeen

Läpivirtaustesti: Testi, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistusjakson ajan.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto

LOEC: (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalilla havaitaan olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Tästä on ohjeita lisäyksessä 7.

Mediaani tappava pitoisuus (LC50): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa testin aikana.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

UVCB: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

VTG: Vitellogeniini on fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisproteiinin esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/l
Arseeni	1 µg/l
Kromi	1 µg/l
Koboltti	1 µg/l
Kupari	1 µg/l
Rauta	1 µg/l
Lyijy	1 µg/l
Nikkeli	1 µg/l
Sinkki	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

Lisäys 3

LAGDA-TESTIN TESTAUSOLOSUHTEET

1. Testilajit	*Xenopus laevis*
2. Testityyppi	Jatkuva läpivirtaus
3. Veden lämpötila	Nimellislämpötila on 21 °C. Keskimääräinen lämpötila testin keston ajan on 21 ± 1°C (rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 1,0 °C)
4. Valaistus	Loisteputket (laajakirjoiset) 600–2000 luksia (luumenia/m^2) veden pinnassa
5. Valojaksot	12 h valoisaa: 12 h pimeää
6. Testiliuoksen määrä ja testiastia (säiliö)	4–10 l (vedensyvyys vähintään 10–15 cm) Lasinen tai ruostumattomasta teräksestä valmistettu säiliö
7. Testiliuosten vaihtuvuus	Jatkuva, otettava huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpito että kemikaalille altistus (esim. 5 vaihtoa päivässä)
8. Testiorganismien ikä testin alkaessa	Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaihe 8–10
9. Organismien lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä	20 eläintä (alkiota) / säiliö (rinnakkaisnäyte) altistuksen alkaessa ja 10 eläintä (juveniilia) / säiliö (rinnakkaisnäyte) NF-vaiheen 66 jälkeen altistuksen lopettamiseen asti
10. Käsittelyjen lukumäärä	Vähintään 4 testikemikaalikäsittelyä + tarvittava(t) kontrolli(t)
11. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä	4 rinnakkaisnäytettä testikemikaalikäsittelyä kohti ja 8 rinnakkaisnäytettä kontrollia (kontrolleja) kohti
12. Organismien lukumäärä testipitoisuutta kohti	Vähintään 80 eläintä testikemikaalikäsittelyä kohti ja vähintään 160 eläintä kontrollia (kontrolleja) kohti
13. Laimennusvesi	Mikä tahansa vesi, jossa *X. laevis* voi kasvaa ja kehittyä normaalisti (esim. lähdevesi tai aktiivihiilisuodatettu hanavesi)
14. Ilmastus	Ei tarvita, mutta säiliöt voidaan joutua ilmastamaan, jos liuenneen hapen pitoisuus pienenee suositellun rajan alle ja suurenee, kun testiliuoksen virtaus maksimoidaan.
15. Liuenneen hapen pitoisuus testiliuoksessa:	Liuennut happi: ≥ 40 % ilman kyllästysarvosta tai ≥ 3,5 mg/l

16. Testiliuoksen pH-arvo	6,5–8,5 (rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5)
17. Testiliuoksen kovuus ja emäksisyys	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Ruokinta	(Ks. lisäys 4)
19. Altistusaika	NF-vaiheesta 8–10 siihen asti, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta vesi- ja/tai liuotinkontrolliryhmässä (enintään 17 viikkoa)
20. Biologiset päätetapahtumat	Kuolleisuus (ja havaitut poikkeavuudet), NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika (toukkanäytteistä), kilpirauhasen histologisen tutkimuksen tiedot (toukkanäytteistä), kasvu (paino ja pituus), maksan somaattinen indeksi (juveniilinäytteistä), geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde (juveniilinäytteistä), sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksan histopatologia (juveniilinäytteistä) ja plasman vitellogeniinipitoisuus (juveniilinäytteistä, valinnainen)
21. Testin validiteettikriteerit	Liuenneen hapen pitoisuuden on oltava > 40 % ilman kyllästysarvosta; veden lämpötilan on oltava 21 ± 1 °C, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla < 1,0 °C; testiliuoksen pH-arvon on oltava 6,5–8,5; kontrolleissa kuolleisuuden on oltava ≤ 20 % kussakin rinnakkaisnäytteessä, ja kontrolleissa NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kuluneen ajan on oltava keskimäärin ≤ 45 päivää; testiorganismien keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulee olla kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa (jos käytössä) 1,0 ± 0,2 g ja testin lopettamisvaiheessa 11,5 ± 3 g; saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Lisäys 4

RUOKINTA

Vaikka suositellaan tällaista ruokintaa, myös muut vaihtoehdot ovat hyväksyttäviä, kunhan testiorganismit kasvavat ja kehittyvät asianmukaisesti.

Toukkien ruokinta

Toukkien ravinnon valmistus

A. 1:1 (v/v) lohien kasvatusravintoa: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote);

1. lohien kasvatusravinto: 50 grammaa lohien kasvatusravintoa (pieniä rakeita tai jauhetta) ja 300 ml sopivaa suodatettua vettä sekoitetaan tehosekoittimen nopealla toiminnolla 20 sekunnin ajan

2. Levä/TetraFin® (tai vastaava tuote) -sekoitus: 12 g spirulina-levätabletteja ja 500 ml suodatettua vettä sekoitetaan tehosekoittimen nopealla toiminnolla 40 sekunnin ajan; 12 g Tetrafiniä® (tai vastaavaa tuotetta) ja 500 ml suodatettua vettä sekoitetaan, ja nämä sekoitukset yhdistetään, jolloin saadaan 1 litra sekoitusta, joka sisältää 12 g spirulina-levää ja 12 g Tetrafiniä® (tai vastaavaa tuotetta) litrassa.

3. Yhdistä yhtä suuret määrät sekoitettua lohien kasvatusravintoa ja levä-/TetraFin® (tai vastaava tuote) -sekoitusta.

B. Suolalehtijalkaiset:

15 ml suolalehtijalkaisten munia annetaan kuoriutua 1 litraan suolavettä (joka valmistetaan lisäämällä 20 ml NaCl:ää yhteen litraan deionisoitua vettä). Kun liuosta on ilmastettu 24 tuntia huoneenlämmössä jatkuvassa valossa, suolalehtijalkaiset kerätään. Niiden annetaan asettua 30 minuutin ajan lopettamalla ilmastus. Säiliön pinnalla kelluvat rakkulat kerätään pois ja hävitetään. Suolalehtijalkaiset kaadetaan asianmukaisten suodattimien läpi ja lisätään 30 ml:aan suodatettua vettä.

Ruokintasuunnitelma

Taulukossa 1 esitetään, minkä tyyppistä ja mikä määrä ravintoa annetaan altistuksen aikana toukkavaiheissa. Eläimiä on ruokittava kolmesti päivässä maanantaista perjantaihin ja kerran päivässä viikonloppuisin.

Taulukko 1

***X. laevis* -toukkien ruokinta läpivirtausolosuhteissa**

Aika (*) (hedelmöittymisen jälkeen)	Lohien kasvatusravinto: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote)		Suolalehtijalkaiset	
	Arkipäivä (3 kertaa päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)	Arkipäivä (kahdesti päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)
Päivät 4–14 (viikoilla 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (päivät 8–15) 1 ml (päivästä 16 alkaen)	0,5 ml (päivät 8–15) 1 ml (päivästä 16 alkaen)
Viikko 2	0,67 ml	2,4 ml		
Viikko 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Viikko 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Aika (*) (hedelmöittymisen jälkeen)	Lohien kasvatusravinto: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote)		Suolalehtijalkaiset	
	Arkipäivä (3 kertaa päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)	Arkipäivä (kahdesti päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)
Viikko 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Viikko 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Viikko 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Viikot 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Päivä 0 on se päivä, jona hCG-injektio annetaan.

Ruokavalio siirryttäessä toukkavaiheesta juveniilivaiheeseen

Kun toukkien muodonvaihdos on valmis, niille aletaan antaa jäljempänä kuvattua juveniilien ravintoa. Tässä siirtymävaiheessa toukkien ravintoa on vähennettävä, koska juveniilien ravintomäärä lisääntyy. Tämä voidaan tehdä vähentämällä toukkien ravintoa ja lisäämällä juveniilien ravintoa suhteessa sen mukaan, miten kukin viiden sammakonpoikasen ryhmä ohittaa NF-vaiheen 62 ja miten niiden muodonvaihdos tulee valmiiksi NF-vaiheessa 66.

Juveniilien ruokinta

Juveniilien ravinto

Kun muodonvaihdos on valmis (vaihe 66), ravinnoksi vaihdetaan pelkästään 3/32 tuuman laadukas uppoava sammakonruoka (Xenopus Express™, FL, Yhdysvallat) tai vastaava tuote.

Murskattujen pellettien valmistaminen toukka- ja juveniilivaiheiden siirtymäkohdassa

Uppoavat sammakonruokapelletit laitetaan hetkeksi kahvimyllyyn, tehosekoittimeen tai huhmareeseen, jotta niiden kokoa saadaan pienennettyä noin kolmanneksen. Pellettejä ei tule kuitenkaan käsitellä niin kauan, että niistä tulee jauhetta.

Ruokintasuunnitelma

Taulukossa 2 esitetään, minkä tyyppistä ja mikä määrä ravintoa annetaan elinkaaren juveniili- ja aikuisvaiheissa. Eläimiä tulee ruokkia kerran päivässä. On kuitenkin muistettava, että kun eläimet tekevät muodonvaihdosta, suolalehtijalkaisten antamista jatketaan siihen asti, kunnes muodonvaihdos on valmis > 95 prosentilla eläimistä.

Eläimiä ei ruokita testin päättymispäivänä, jotta ravinto ei vaikuta painon punnitsemiseen.

Taulukko 2

***X. laevis* -juveniilien ruokinta läpivirtausolosuhteissa. Huom. Ne eläimet, joiden muodonvaihdos ei ole tapahtunut tai joilla se on viivästynyt kemikaalikäsittelyn takia, eivät voi syödä kokonaisia pellettejä**

Aika (*) (Viikkoa muodonvaihdoksen mediaanin päivän jälkeen)	Murskattujen pellettien määrä (mg/sammakko)	Kokonaisten pellettien määrä (mg/sammakko)
Kun eläinten muodonvaihdos on valmis	25	0
Viikot 0–1	25	28
Viikot 2–3	0	110
Viikot 4–5	0	165
Viikot 6–9	0	220

(*) Viikon 0 ensimmäinen päivä on kontrollieläinten muodonvaihdoksen mediaani päivä.

Lisäys 5

GENEETTISEN SUKUPUOLEN MÄÄRITYS

Xenopus laeviksen geneettisen sukupuolen määrittämisen menetelmä perustuu julkaisuun Yoshimoto *ja muut.*, 2008. Yksityiskohtaiset genotyypitysmenettelyt voi katsoa tästä julkaisusta tarvittaessa. Vaihtoehtoisia menetelmiä (esim. suuren kapasiteetin qPCR) voidaan käyttää, jos ne katsotaan sopiviksi.

X. laeviksen alukkeet

DM-W-markkeri

Forward-aluke: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse-aluke: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiivinen kontrolli

Forward-aluke: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse-aluke: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA:n puhdistaminen

Puhdista DNA lihas- tai ihokudoksesta käyttämällä esimerkiksi Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (luettelonro 69 506) -tarvikepakettia tai vastaavaa tuotetta paketin ohjeiden mukaisesti. DNA voidaan uuttaa spin-kolonneista käyttämällä vähemmän puskuria, jolloin saadaan konsentroituneempia näytteitä, jos se on tarpeen PCR:n osalta. DNA on melko vakaata, joten on toimittava varovasti, jotta vältetään ristikontaminaatio, joka voi johtaa siihen, että koiraat määritetään virheellisesti naaraiksi tai päinvastoin.

PCR

Taulukossa 1 kuvataan näyteprotokolla, jossa käytetään Sigman JumpStart^{TM}*Taq* -polymeraasia

Taulukko 1

Näyteprotokolla, jossa käytetään Sigman JumpStart^{TM}*Taq* -polymeraasia

Master mix -reaktioseokset	1x (µl)	[Lopullinen]
NFW ([1])	11	-
10X-puskuri	2,0	-
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP:t (10 mM kutakin)	0,4	200 µM
Alukkeen merkkiaine (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev-alukkeen merkkiaine (8 µM)	0,8	0,3 µM
Alukkeen kontrolli (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev-alukkeen kontrolli (8 µM)	0,8	0,3 µM

Master mix -reaktioseokset	1x (µl)	[Lopullinen]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 yksikköä/µl
DNA-templaatti	1,0	~ 200 pg/µl

([1]) nukleaasiton vesi
Huom. Kun teet master mix -seoksia, tee aina hieman ylimääräistä, koska pipetoinnin aikana määrästä voi hävitä osa (esimerkki: 25x tulee käyttää vain 24 reaktioon).

Reaktio:

Master mix	19,0 µl
Templaatti	1,0 µl
Yhteensä	20,0 µl

Termosyklerin profiili:

Vaihe 1.	94 °C	1 min
Vaihe 2.	94 °C	30 s
Vaihe 3.	60 °C	30 s
Vaihe 4.	72 °C	1 min
Vaihe 5.	Siirry vaiheeseen 2.	35 sykliä
Vaihe 6.	72 °C	1 min
Vaihe 7.	4 °C	pito

PCR-tuotteet voidaan ajaa heti geelissä tai säilyttää 4 °C:ssa.

Agaroosigeelielektroforeesi (3 %) (näyteprotokolla)

50X TAE

Tris	24,2 g
Jääetikka	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Lisää vettä 100 ml:aan asti

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1-agaroosi

3 osaa NuSieve™ GTG™ -agaroosia

1 osa Fisherin agaroosia, matala elektroendosmoosi (EEO)

Menetelmä

1. Valmista 3-prosenttinen geeli lisäämällä 1,2 g agaroosisekoitusta 43 ml:aan 1X TAE:ta. Sekoita hyvin, jotta suuret kokkareet hajoavat.

2. Kuumenna agaroosiseosta mikroaaltouunissa, kunnes se on liuennut kokonaan (mutta älä ylikuumenna sitä). Anna seoksen jäähtyä hetki.

3. Lisää siihen 1,0 µL etidiumbromidia (10 mg/ml). Ravista pulloa. Huomaa, että etidiumbromidi on mutageenista. Siksi tässä vaiheessa tulee käyttää vaihtoehtoisia kemikaaleja, mikäli se on teknisesti suinkin mahdollista, jotta työntekijöihin kohdistuvat terveysriskit olisivat mahdollisimman pienet ([1]).

4. Kaada geeli muottiin sopivan työkalun avulla. Anna geelin jäähtyä kunnolla.

5. Lisää geeli laitteeseen. Peitä geeli 1X TAE:llä.

6. Lisää 1 µl 6x näytepuskuria aina 10 µl:aan PCR-tuotetta.

7. Pipetoi näytteet kuoppiin.

8. Käytä laitetta 160 V:n vakiojännitteellä noin 20 minuutin ajan.

Kuvassa 1 on agaroosigeelikuva, jossa näkyy koiras- ja naarasyksilöitä tarkoittavat juosteet.



Kuva 1: Agaroosigeelikuva, jossa näkyy koirasyksilöä (♂) tarkoittava juoste (yksi juoste ~203 bp: DMRT1) ja naarasyksilöä (♀) tarkoittava juoste (kaksi juostetta ~259 bp: DM-W ja 203 bp:DMRT1).

LÄHDEKIRJALLISUUS

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]) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2004/37/EY, annettu 29 päivänä huhtikuuta 2004, työntekijöiden suojelemisesta syöpäsairauden vaaraa aiheuttaville tekijöille tai perimän muutoksia aiheuttaville aineille altistumiseen työssä liittyviltä vaaroilta (kuudes neuvoston direktiivin 89/391/ETY 16 artiklan 1 kohdassa tarkoitettu erityisdirektiivi) (EUVL L 158, 30.4.2004, s. 50), 4 artiklan 1 kohta.

Lisäys 6

VITELLOGENIININ MITTAUS

Vitellogeniinin (VTG) mittaus tehdään entsyymivälitteisellä immunosorbenttimääritys (ELISA) -menetelmällä, joka kehitettiin alun perin rasvapäämutun VTG:n mittaamiseen (Parks ja muut, 1999). Tällä hetkellä *X. laevikselle* ei ole kaupallisesti saatavia vasta-aineita. Koska tästä proteiinista on kuitenkin runsaasti tietoa ja koska kustannustehokkaita kaupallisia vasta-aineiden tuotantopalveluja on hyvin saatavilla, laboratoriot voivat kohtuullisen helposti kehittää ELISA-määrityksen tämän mittauksen tekemistä varten (Olmstead ja muut, 2009). Julkaisussa Olmstead ja muut (2009) kuvataan myös testi, joka on muokattu *X. tropicaliksen* VTG-mittausta varten (ks. jäljempänä). Menetelmässä käytetään *X. tropicaliksen* VTG:lle valmistettua vasta-ainetta, mutta sen tiedetään toimivan myös *X. laeviksen* VTG:lle. Myös ei-kilpailevia ELISA-määrityksiä voidaan käyttää; niissä voi kuitenkin olla pienemmät havaintorajat kuin jäljempänä selostetussa menetelmässä.

Materiaalit ja reagenssit

— Preadsorboitu 1. vasta-aineseerumi

— Sekoita 1 osa anti-*X. tropicalis* VTG 1. vasta-aineseerumia ja 2 osaa kontrollikoiraan plasmaa. Anna seoksen olla huoneenlämmössä ~ 75 minuuttia, laita se jäähauteeseen 30 minuutiksi ja sentrifugoi (> 20K x G) 1 tunti 4 °C:ssa. Poista supernatantti, tee alikvootit ja säilö -20 °C:seen.

— 2. vasta-aine

— Goat Anti-Rabbit IgG-HRP -konjugaatti (esim. Bio-Rad 172-1019)

— VTG-standardi

— Puhdistettu *X. laeviksen* VTG, pitoisuus 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiini) (esim. KPL 50-76-00 tai Sigma T0440)

— Vuohen normaaliseerumi (NGS)(esim. Chemicon® S26-100 ml)

— 96-kuoppaisia EIA-polystyreenimikrotiitterilevyjä (esim. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— 37 °C:n hybridisaatiouuni (tai nopeasti tasapainottuva elatuskaappi) levyille, vesihaude putkille

— Muut tavalliset laboratoriolaitteet, kemikaalit ja tarvikkeet.

Valmistusohjeet

Pinnoituspuskuri (50 mM karbonaattipuskuria, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
Vesi	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfaattia, 1,5 M NaCl:ää):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
Vesi	810 ml

Pesupuskuri (PBST):

10X PBS	100 ml
Vesi	900 ml

Säädä pH-arvoksi 7,3 1 M:lla HCl:ää ja lisää sen jälkeen 0,5 ml Tween-20:tä

Testipuskuri:

Vuohen normaaliseerumi (NGS)	3,75 ml
Pesupuskuri:	146,25 ml

Näytteiden kerääminen

Verinäytteet kerätään heparinisoituun mikrohematokriittiputkeen ja asetetaan jäähauteeseen. Putkia sentrifugoidaan 3 minuuttia, jonka jälkeen ne pisteytetään ja avataan, ja plasma siirretään 0,6 ml:n mikrosentrifugiputkiin, jotka sisältävät 0,13 yksikköä kylmäkuivattua aprotiniinia. (Nämä putket valmistellaan etukäteen laittamalla niihin tarvittava määrä aprotiniinia. Sen jälkeen ne jäädytetään ja kylmäkuivataan pikavakuumikylmäkuivaajassa matalalla lämmöllä, kunnes ne ovat kuivat.) Säilytä plasma -80°C:ssa analysointiin saakka.

Menettely yhdelle levylle

Levyn pinnoittaminen

Sekoita 20 µl puhdistettua VTG:tä ja 22 ml karbonaattipuskuria (lopullinen 3 µg/ml). Lisää 200 µl jokaiseen 96-kuoppaisen levyn kuoppaan. Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua 37 °C:ssa 2 tunnin ajan (tai 4 °C:ssa yön yli).

Levyn estäminen

Estoliuos valmistetaan lisäämällä 2 ml vuohen normaaliseerumia (NGS:ää) 38 ml:aan karbonaattipuskuria. Poista pinnoitusliuos ja kuivaa ravistamalla. Lisää jokaiseen kuoppaan 350 µl estoliuosta. Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua yön yli 37 °C:ssa 2 tunnin ajan (tai 4°C:ssa yön yli).

Vertailustandardien valmistaminen

5,8 µl puhdistettua VTG-standardia sekoitetaan 1,5 ml:aan testipuskuria boorilasista valmistetussa kertakäyttöisessä testiputkessa (12 x 75 mm). Näin saatava pitoisuus on 12 760 ng/ml. Sen jälkeen tehdään sarjalaimennus, jossa 750 µl edellisestä laimennoksesta lisätään 750 µl:aan testipuskuria, jolloin saadaan nämä loppupitoisuudet: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ja 50 ng/ml.

Näytteiden valmistelu

Aloita laimentamalla plasma testipuskuriin suhteessa 1:300 (yhdistä esimerkiksi 1 µl plasmaa ja 299 µl testipuskuria) tai 1:30. Jos odotetaan suurta VTG-pitoisuutta, lisälaimennokset tai suuremmat laimennokset voivat olla tarpeen. Yritä pitää B/B_o vertailustandardien mukaisina. Käytä laimennussuhdetta 1:30 niissä näytteissä, joissa VTG-pitoisuus on vähäinen, kuten kontrollikoirailla ja -naarailla (naaraista kaikki ovat epäkypsiä). Tätä vähemmän laimennetuissa näytteissä voi näkyä ei-toivottuja matriisivaikutuksia.

Lisäksi on suositeltavaa ajaa positiivinen kontrollinäyte jokaiselle levylle. Se tehdään plasmavarannosta, jonka VTG-pitoisuus on suuri. Varanto laimennetaan ensin NGS:llä, jaetaan alikvootteihin ja säilötään -80 °C:ssa. Jokaisen levyn osalta sulatetaan yksi alikvootti, joka laimennetaan testipuskurilla ja käsitellään testinäytteen tavoin.

Inkubointi 1. vasta-aineella

1. vasta-aine valmistaan tekemällä preadsorboidusta 1. vasta-aineseerumista laimennos testipuskurissa suhteessa 1:2000 (ts. 8 µl 16 ml:aan testipuskuria). Yhdistä sen jälkeen 300 µl 1. vasta-ainetta sisältävää liuosta 300 µl:aan näytettä/vertailustandardia lasiputkessa. Tee B_o-putki samalla tavalla 300 µl:sta testipuskuria ja 300 µl:sta vasta-ainetta. Myös NSB-putki on valmistettava samalla tavalla käyttämällä vain 600 µl testipuskuria (eli ei siis vasta-ainetta). Peitä putket Parafilmillä ja sekoita ne varovasti kääntelemällä. Inkuboi putkia 37 °C-asteisessa vesihauteessa noin tunti.

Levyn peseminen

Pese levy hieman ennen kuin 1. vasta-aineen inkubointi tulee valmiiksi. Tyhjennä levy ja taputtele se kuivaksi imupaperilla. Täytä kuopat 350 µl:lla pesuliuosta, tyhjennä ne ja taputtele levy kuivaksi. Tässä monikanavainen toistopipetti tai levynpesuri on hyödyllinen. Pesuvaihe toistetaan vielä kaksi kertaa (pesuja tehdään siis yhteensä kolme).

Levyn täyttäminen

Kun levy on pesty, ota putket pois vesihauteesta ja kääntele niitä kevyesti. Lisää 200 µl jokaisesta näytteestä, vertailustandardista, B_o- ja NSB-putkista levyn kuoppiin (kaksi rinnakkaisnäytettä). Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua 37 °C:ssa 1 tunnin ajan.

Inkubointi 2. vasta-aineella

Edellisen vaiheen inkuboinnin päätyttyä levy on taas pestävä kolme kertaa samalla tavalla kuin edellisellä kerralla. Laimennettu 2. vasta-aine valmistetaan sekoittamalla 2,5 µl 2. vasta-ainetta ja 50 ml testipuskuria. Lisää 200 µl laimennettua 2. vasta-ainetta jokaiseen kuoppaan, peitä levy kuten edellä ja inkuboi sitä 1 tunti 37 °C:ssa.

Substraatin lisääminen

Kun 2. vasta-aineella inkubointi on päättynyt, pese levy taas kolme kertaa edellä kuvatun mukaisesti. Lisää sen jälkeen jokaiseen kuoppaan 100 µl TMB-substraattia. Anna reaktion kehittyä 10 minuutin ajan mieluiten kirkkaalta valolta suojattuna. Lopeta reaktio lisäämällä 100 µl fosforihappoa (1 M). Tämä muuttaa värin sinisestä voimakkaan keltaiseksi. Mittaa absorbanssi 450 nm:n alueella levylukijalla.

B/Bo-arvon laskeminen

Vähennä keskimääräinen NSB-arvo kaikista mittausarvoista. Jokaisen näytteen ja standardin B/B_o-arvo lasketaan jakamalla absorbanssiarvo (B) B_o-näytteen keskimääräisellä absorbanssilla.

Standardikäyrän luominen ja tuntemattomien määrien määrittäminen

Luo standardikäyrä jollakin grafiikkaohjelmalla (esim. Slidewrite™ tai Sigma Plot®), jolla voidaan ekstrapoloida määrä näytteen B/B_o-arvosta standardien B/B_o-arvon perusteella. Yleensä määrä piirretään logaritmisella asteikolla, ja käyrä on S-kirjaimen muotoinen. Se voi kuitenkin näyttää lineaariselta, kun käytetään standardeja, joiden vaihteluväli on pieni. Asianmukainen näyte vastaa laimennuskerrointa ja ilmoitetaan muodossa ”milligrammaa vitellogeniinia millilitrassa plasmaa”.

Minimihavaintorajojen määrittäminen

Usein on epäselvää, miten pieniin arvoihin perustuvat tulokset ilmoitetaan, varsinkin normaalien koiraiden osalta. Näissä tapauksissa on käytettävä 95 prosentin luottamusvälejä sen määrittämiseksi, tuleeko arvo ilmoittaa nollana vai jonakin toisena lukuna. Jos näytteen tulos on nollastandardin (B_0) luottamusvälin sisällä, tulos on ilmoitettava nollana. Minimihavaintoraja on pienin vertailustandardi, joka on jatkuvasti eri kuin nollastandardi; nämä kaksi luottamusväliä eivät siis mene päällekkäin. Sellaisesta näytetuloksesta, joka on minimihavaintorajan luottamusvälin sisällä tai sitä suurempi, ilmoitetaan laskettu arvo. Jos näytteen tulos on nollastandardin ja minimihavaintorajan luottamusvälien välissä, kyseisen näytteen arvoksi on ilmoitettava puolet minimihavaintorajasta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

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.

Lisäys 7

TILASTOANALYYSI

LAGDA-testistä saadaan kolmenlaisia tietoja, jotka voidaan analysoida tilastollisesti: 1) kvantitatiiviset jatkuvat tiedot 2) tiettyyn tapahtumaan kulunut aika (esim. aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen) kehitysnopeuden arviointia varten ja 3) histopatologisiin tutkimuksiin perustuvia numerotietoja poikkeavuuksien vaikeusasteista tai kehitysvaiheista. LADGA-testiä varten suositeltu tilastollisen analyysin päätöksentekokaavio on kuvassa 1. Jäljempänä esitetään myös muutamia huomautuksia, jotka voivat olla tarpeen, kun tehdään tilastollista analyysia LAGDA-testin mittauksista. Analyysin päätöksentekokaaviossa tulokset kuolleisuuden, kasvun (paino ja pituus) ja maksan somaattisen indeksin mittauksista tulee analysoida ”Muut päätetapahtumat” -kohdan mukaan.

Jatkuvat tiedot

Jatkuvia päätetapahtumia koskevista tiedoista on ensimmäiseksi tarkistettava monotonisuus tekemällä tietojen arvojärjestysmuunnos, sovittamalla ne ANOVA-malliin ja vertailemalla lineaarisia ja kvadraattisia kontrasteja. Jos tiedot ovat monotonisia, on tehtävä askeltava Jonckheere-Terpstran testi rinnakkaisnäytteiden mediaaneilla, eikä muita analyyseja tule tehdä. Vaihtoehtoinen testi tiedoille, jotka ovat normaalijakauman mukaisia ja joissa on homogeeninen varianssi, on askeltava Williamsin testi. Jos tiedot eivät ole monotonisia (kvadraattinen kontrasti on merkitsevä mutta lineaarinen ei), tiedot on analysoitava sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallilla. Sen jälkeen tiedoista on arvioitava normaalius (mieluiten Shapiro-Wilkin tai Anderson-Darlingin testillä) ja varianssin homogeenisuus (mieluiten Levenen testillä). Molemmat testit tehdään sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallin jäännöksillä. Näiden virallisten normaaliutta ja varianssin homogeenisuutta koskevien testien sijasta voidaan käyttää myös asiantuntijan arvioita, joskin ensisijaisesti tulee käyttää virallisia testejä. Jos tiedot jakautuvat normaalisti ja jos varianssi on homogeeninen, sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallin oletukset toteutuvat ja merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään Dunnettin testillä. Jos taas tuloksena todetaan epänormaalius tai varianssin heterogeenisuus, Dunnettin testin oletuksia eivät toteudu ja on käytettävä normalisoivaa, varianssia stabiloivaa muunnosta. Jos tällaista muunnosta ei löydy, merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään Dunnin testillä. Mikäli mahdollista, on tehtävä ensisijaisesti yksisuuntainen testi kaksisuuntaisen testin sijasta, joskin sen määrittäminen, kumpi on tarkoituksenmukaisempi tietyn päätetapahtuman osalta, edellyttää asiantuntijan arviota.

Kuolleisuus

Kuolleisuustiedot on analysoitava koko testin käsittävältä aikajaksolta, ja ne on ilmoitettava tietyssä säiliössä kuolleiden eläinten osuutena. Sammakonpoikasia, joiden muodonvaihdos ei tapahdu tietyn ajan kuluessa, niitä sammakonpoikasia, jotka ovat toukkien osaotoskohortissa, niitä juveniileja, jotka karsitaan, ja kaikkia eläimiä, jotka kuolevat tutkimuksen tekijän virheen vuoksi, on käsiteltävä sensuroituina tietoina, eivätkä ne sisälly prosenttiosuuksien laskennan nimittäjään. Ennen tilastollisten analyysien tekemistä kuolleisuusosuuksille on tehtävä arkussini-neliöjuurimuunnos. Vaihtoehtona on käyttää askeltavaa Cochran-Armitagen testiä mahdollisesti Rao-Scottin mukautuksella ylidispersion yhteydessä.

Paino ja pituus (kasvutiedot)

Koiraat ja naaraat eivät ole sukupuolisesti dimorfisia muodonvaihdoksen aikana, joten toukkaosaotoksen kasvutiedot on analysoitava sukupuolesta riippumatta. Juveniilien kasvutiedot on kuitenkin analysoitava erikseen geneettisen sukupuolen perusteella. Näiden päätetapahtumien osalta log-muunnos voi olla tarpeen, koska kokotietojen log-normaalius ei ole epätavallista.

Maksan somaattinen indeksi (LSI)

Maksan painot on normalisoitava osuudeksi ruumiin kokonaispainosta (ts. maksan somaattinen indeksi) ja analysoitava erikseen geneettisen sukupuolen perusteella.

Aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen

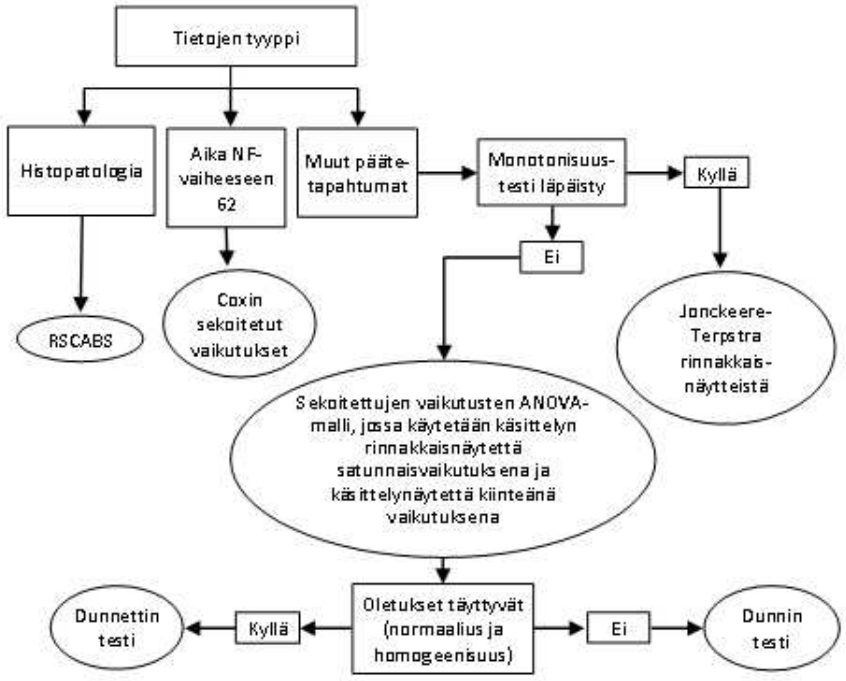
Muodonvaihdosvaiheen saavuttamiseen kulunutta aikaa koskevia tietoja on käsiteltävä time to event -tietoina. Mahdollisia kuolleita eläimiä tai yksilöitä, jotka eivät saavuttaneet 70 päivän kuluessa NF-vaihetta 62, on käsiteltävä oikealta sensuroituina tietoina (ts. todellinen arvo on suurempi kuin 70 päivää, mutta tutkimus päättyy, ennen kuin eläimet olivat saavuttaneet 70 päivässä NF-vaiheen 62). Testin päättymispäivä on määritettävä sen mediaaniajan perusteella, jona NF-vaihe 62 päättyi laimennusvesikontrollin eläinten osalta, kun muodonvaihdos tuli valmiiksi. Muodonvaihdoksen valmiiksi tulemisen mediaaniaika voidaan määrittää Kaplan-Meierin rajatuloestimaateilla. Tämä päätetapahtuma on analysoitava käyttämällä sekoitettujen vaikutusten Coxin suhteellisen vaaran mallia, jossa otetaan huomioon se, että tutkimuksessa käytettiin rinnakkaisnäytteitä.

Histopatologiset tiedot (vaikeusasteet ja kehitysvaiheet)

Histopatologiset tiedot esitetään vaikeusasteina tai kehitysvaiheina. Testissä nimeltä RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) käytetään askeltavaa RAo-Scottin mukauttamaa Cochran-Armitagen trenditestiä jokaisella histopatologisen vasteen vaikeusastetasolla (Green ja muut, 2014). Rao-Scottin mukautuksella saadaan kokeen rinnakkaisnäytteisiin perustuva rakenne mukaan testiin. "By Slices" -menettelyssä otetaan huomioon biologinen odotus, että vaikutuksen vakavuus yleensä suurenee annosten tai pitoisuuksien kasvaessa, mutta samalla siinä huomioidaan myös yksittäistä yksilöä koskevat pisteet ja näytetään kaikkien havaittujen vaikutusten vakavuus. Sen lisäksi, että RSCABS-menettelyssä määritetään, mitkä käsittelyt eroavat kontrolleista tilastollisesti (ts. joissa patologiset vaikutukset ovat vakavampia kuin kontrolleissa), siinä määritetään myös, millä vaikeusasteella ero ilmenee. Näin tästä menettelystä saadaan analyysissä erittäin tarpeellista kontekstitietoa. Kun arvioidaan sukurauhasten ja sukujohtimien kehitysvaihetta, tietoihin on sovellettava lisäkäsittelyä, koska RSCABS-menetelmässä oletuksena on, että vaikutuksen vakavuus suurenee annoksen mukaan. Havaittu vaikutus voi olla kehityksen viivästyminen tai nopeutuminen. Kehitysvaiheen arviointia koskevia tietoja on siis analysoitava ilmoitetun mukaisesti, jotta havaitaan kehityksen nopeutuminen, ja sen jälkeen ne on muunnettava manuaalisesti ennen toista analyysia, jotta havaitaan kehityksen viivästyminen.

Kuva 1

LAGDA-testin tietojen tilastollisen analyysin päätöksentekokaavio



LÄHDEKIRJALLISUUS

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108–1 116.

Lisäys 8

NÄKÖKOHTIA SKOLIOOSIN HAVAITSEMISEEN JA SEN ILMAANTUMISEN MINIMOIMISEEN

Idiopaattinen skolioosi, joka näkyy X. laeviksen poikasilla yleensä ”taipuneena pyrstönä”, voi vaikeuttaa testipopulaatioiden morfologian ja käyttäytymisen havainnointia. Siksi on syytä pyrkiä minimoimaan tai eliminoimaan skolioosin ilmaantuminen sekä kantapopulaatiossa että testiolosuhteissa. Lopullisessa testissä keskivaikean ja vaikean skolioosin esiintyvyyden tulee olla vähemmän kuin 10 prosenttia. Tämä lisää luottamusta siihen, että testillä voidaan havaita käsittelyyn liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat muuten terveiden sammakkoeläinten toukkien kehitykseen.

Lopullisen testin päivittäisen havainnoinnin aikana on kirjattava sekä skolioosin ilmaantuvuus (yksilöiden määrä) että vaikeusaste, jos skolioosia havaitaan. Poikkeavuuden luonne on kuvattava käyryyden sijainnin (ts. peräaukon edessä vai takana) ja suunnan (ts. lateraalinen vai dorsaalisesta ventraaliseen) osalta. Vaikeusaste voidaan arvioida seuraavasti:

Merkityksetön: ei käyryyttä

1) Vähäinen: lievä lateraalinen käyryys peräaukon takana; näkyvissä vain eläimen ollessa levossa

2) Kohtalainen: lateraalinen käyryys peräaukon takana; näkyvissä aina, muttei estä eläimen liikkumista

3) Vaikea: lateraalinen käyryys peräaukon edessä; TAI käyryys, joka estää liikkumisen; TAI käyryys, jonka suunta on dorsaalisesta ventraaliseen

Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (EPA) tieteellinen neuvoa-antava ryhmä FIFRA (FIFRA SAP 2013) arvioi yhteenvetotiedot skolioosista viidessätoista sammakkoeläinten muodonvaihdostestissä, joissa käytettiin *X. laevista* (NF-vaiheesta 51 vaiheeseen 60+) ja antoi yleisiä suosituksia tämän poikkeavuuden esiintyvyyden vähentämiseksi testipopulaatioissa. Nämä suositukset ovat merkityksellisiä myös LAGDA-testissä, vaikka tässä testissä tarkastellaankin pidempää kehityksellistä aikajanaa.

Aikaisempi kutemiskyky

Lisääntyvinä pareina tulee yleensä käyttää hyväkuntoisia ja terveitä aikuisia sammakoita. Sellaisten parien eliminointi, jotka tuottavat jälkeläisiä, joilla on skolioosi, voi minimoida sen ilmaantuvuuden ajan myötä. Etenkin luonnosta pyydystettyjen parien käytön minimoiminen voi olla tässä hyödyllistä. LAGDA-testissä altistusaika alkaa NF-vaiheessa 8–10 olevilla alkioilla, eikä testin alkaessa ole mahdollista määrittää, kehittyykö tietyille yksilöille skolioosi. Sen lisäksi, että testissä käytettäviltä eläimiltä seurataan skolioosin ilmaantumista, on dokumentoitava myös aikaisempi kyky tuottaa poikasia (myös skolioosin esiintyminen kaikilla toukilla, joiden annettiin kehittyä). Voi olla hyödyllistä jatkaa sellaisen poikueen osan tarkkailua, jota ei käytetä tietyssä tutkimuksessa, ja raportoida nämä havainnot (FIFRA SAP 2013).

Vedenlaatu

On tärkeää varmistaa, että veden laatu on riittävä sekä laboratoriokannassa että testin aikana. Niiden veden laatua koskevien kriteerien lisäksi, jotka arvioidaan rutiininomaisesti vesieliöiden toksisuustesteissä, voi olla hyödyllistä seurata mahdollisia ravintoainepuutoksia ja korjata ne tarvittaessa (esim. C-vitamiinin, kalsiumin ja fosforin puutos) tai liiallista seleeni- ja kuparipitoisuutta, sillä niiden on ilmoitettu aiheuttavan eriasteista skolioosia laboratorioissa kasvatetuille *Rana* sp. - ja *Xenopus* sp. -lajeille (Marshall ja muut 1980; Leibovitz ja muut. 1992; Martinez ja muut. 1992; FIFRA SAP:n raportin 2013 mukaisesti). Asianmukaisen ruokavalion (ks. lisäys 4) käyttö ja säännöllinen säiliön puhdistus yleensä parantavat vedenlaatua ja testiyksilöiden terveyttä.

Ruokavalio

LAGDA-testissä suotuisaa ruokavaliota koskevat erityissuositukset ovat lisäyksessä 4. Ravinnon lähteet on suositeltavaa tarkastaa sellaisten biologisten toksiinien, rikkakasvien torjunta-aineiden ja muiden kasvinsuojeluaineiden varalta, joiden tiedetään aiheuttavan skolioosia *X. laevikselle* tai muille vesieläimille (Schlenk ja Jenkins 2013). Esimerkiksi tietyille kolinesteraasin estäjille altistuminen on liitetty skolioosin esiintymiseen kaloilla (Schultz ja muut 1985) ja sammakoilla (Bacchetta ja muut 2008).

LÄHDEKIRJALLISUUS

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.”