II

(Neleģislatīvi akti)

REGULAS

KOMISIJAS REGULA (ES) 2019/1390

(2019. gada 31. jūlijs),

ar kuru, pielāgojot tehnikas attīstībai, groza pielikumu Regulai (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*), un ar kuru izveido Eiropas Ķimikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK [1], un jo īpaši tās 13. panta 2. punktu,

tā kā:

(1) Komisijas Regulā (EK) Nr. 440/2008 [2] ir noteiktas Regulas (EK) Nr. 1907/2006 izpildē izmantojamās testēšanas metodes ķimikāliju fizikālķīmisko īpašību, toksiskuma un ekotoksiskuma noteikšanai.

(2) Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācija (*OECD*) izstrādā harmonizētas un starptautiski saskaņotas testēšanas vadlīnijas, kas domātas ķimikāliju testēšanai regulatīviem nolūkiem. *OECD* regulāri izdod jaunas un pārstrādātas testēšanas vadlīnijas, kurās ņemta vērā zinātnes attīstība šajā jomā.

(3) Lai ņemtu vērā tehnikas attīstību un pēc iespējas samazinātu eksperimentu vajadzībām izmantoto dzīvnieku skaitu atbilstīgi Regulas (EK) Nr. 1907/2006 13. panta 2. punktam, un tā kā ir pieņemtas attiecīgas *OECD* testēšanas vadlīnijas, būtu jānosaka divas jaunas testēšanas metodes, ar ko novērtē ekotoksiskumu, un deviņas jaunas testēšanas metodes, ar ko nosaka toksisko iedarbību uz cilvēka veselību, kā arī septiņas testēšanas metodes būtu jāatjaunina. Vienpadsmit no minētajām metodēm attiecas uz *in vitro* testiem, ar kuriem nosaka ādas un acu kairinājumu/koroziju, ādas sensibilizāciju, genotoksiskumu un ietekmi uz endokrīno sistēmu. Ierosinātie grozījumi ir apspriesti ar ieinteresētajām personām.

[1] OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.

[2] Komisijas 2008. gada 30. maija Regula (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*) (OV L 142, 31.5.2008., 1. lpp.).

(4) Tāpēc Regula (EK) Nr. 440/2008 būtu attiecīgi jāgroza.

(5) Šajā regulā noteiktie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi atbilstīgi Regulas (EK) Nr. 1907/2006 133. pantam izveidotā komiteja,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza saskaņā ar šīs regulas pielikumu.

2. pants

Šī regula stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī.*

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2019. gada 31. jūlijā

Komisijas vārdā –
priekšsēdētājs
Jean-Claude JUNCKER

PIELIKUMS

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza šādi:

(1) Pielikuma B daļā B.4. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.4. **AKŪTS ĀDAS KAIRINĀJUMS/KOROZIJA (KODĪGA IEDARBĪBA UZ ĀDU)**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 404 (2015) aprakstītajam. ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas tiek regulāri pārskatītas, lai nodrošinātu, ka tās atspoguļo zinātnes jaunākās atziņas. Pārskatot ESAO *TG* Nr. 404, īpaši uzmanīgi tika apsvērts, ko iespējams uzlabot dzīvnieku labturības aspektos, kā arī izvērtēta visa par testējamo ķimikāliju jau esošā informācija, lai nebūtu jāveic lieka testēšana ar laboratorijas dzīvniekiem. Atjauninātajā ESAO *TG* Nr. 404 (sākotnēji pieņemta 1981. gadā, pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā) ir atsauce uz *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion (IATA)* (Norādījumu dokuments par integrētām pieejām testēšanai un novērtēšanai attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju) (1), kurā testēšanai attiecībā uz ādas kairinājumu un ādas koroziju ierosināta modulāra pieeja. *IATA* apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (1). Bez tam attiecīgā gadījumā minētā vadlīnija ieteic sākotnējā *in vivo* testā trīs kompreses dzīvniekam aplicēt nevis vienlaikus, bet secīgi.

2. Ādas kairinājuma un korozijas definīcijas sniegtas šīs testēšanas metodes apraksta papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Tiklab zinātnes kā dzīvnieku labturības interesēs ir neveikt testēšanu *in vivo*, iekams visi dati, kas relevanti attiecībā uz testējamās ķimikālijas potenciālajām ādai kodīgajām/kairinošajām īpašībām, nav izvērtēti *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Corrosion and Irritation* (Norādījumu dokumentā par integrētu pieeju ādas korozijas un kairinājuma testēšanu un novērtēšanu), proti, tā trijās daļās un attiecīgajos moduļos (1) aprakstītajā pierādījumsvara (*WoE*) analīzē. Īsumā — 1. daļā noteikts, ka esošos datus aplūko septiņos moduļos, kuri aptver datus par cilvēku, *in vivo* pētījumos iegūtos datus, attiecīgos *in vitro* datus, datus par fizikālķīmiskajām īpašībām (piem., pH, jo īpaši stiprs skābums vai sārmainums) un datus, kas iegūti ar metodēm, kuras neparedz testēšanu. 2. daļa nosaka, kā izdarāma *WoE* analīze. Ja *WoE* analīze joprojām nesniedz skaidrus rezultātus, jāveic 3. daļā aprakstītā papildu testēšana, sākot ar *in vitro* metodēm, bet *in vivo* testēšana jāizmanto kā pēdējā iespēja. Tātad šāda analīze mazina nepieciešamību veikt *in vivo* testēšanu attiecībā uz tādu testējamo ķimikāliju kodīgajām/kairinošajām īpašībām, attiecībā uz kurām par šiem diviem beigupunktiem pietiekami daudz datu jau iegūts citos pētījumos.

IN VIVO TESTA PRINCIPS

4. Uz eksperimenta dzīvnieku ādas aplicē vienu devu testējamās ķimikālijas. Par kontroli izmanto tā paša testā izmantotā dzīvnieka ādas neskartās daļas. Nosaka kairinājuma/korozijas pakāpi, ko ar noteiktiem starplaikiem nolasa, novērtē ar atzīmēm un ietekmes pilnīgai izvērtēšanai apraksta sīkāk. Pētījuma ilgumam jābūt tādam, lai varētu novērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu.

5. Dzīvnieki, kuriem jebkurā testa posmā novērojamas pastāvīgas stipru ciešanu un/vai sāpju pazīmes, humāni jānonāvē, un testējamā ķimikālija attiecīgi jānovērtē. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu humāni nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, sniegti atsevišķā norādījumu dokumentā (2).

SAGATAVOŠANĀS IN VIVO TESTAM

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

6. Piemērotākais laboratorijas dzīvnieks ir albīnais trusis, un izmanto jaunus veselus pieaugušus dzīvniekus. Ja izmanto citu sugu dzīvniekus, tas attiecīgi jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Apmēram 24 stundas pirms testa dzīvniekiem ķermeņa mugurdaļā rūpīgi nocērpj apmatojumu. Jāraugās ādu nesaskrāpēt un jāizmanto tikai dzīvnieki ar veselu un nebojātu ādu.

8. Dažām trušu līnijām ir bieza apspalvojuma vietas, kas zināmos gadalaikos kļūst izteiktākas. Šādas vietas, kur apmatojums uz ķermeņa ir ļoti blīvs, testēšanai neizmanto.

Turēšanas un barošanas apstākļi

9. Dzīvnieki jātur atsevišķi. Eksperimenta trušu telpas temperatūra ir 20 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams nepārsniegt 70 %, jāorientējas uz 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim.

TESTA PROCEDŪRA

Testējamās ķimikālijas aplicēšana

10. Testējamo ķimikāliju aplicē uz nelielas ādas virsmas platības (apmēram 6 cm^2), kuru pārklāj ar marles kompresi, ko piestiprina ar nekairinošu plāksteri. Ja tieša aplicēšana nav iespējama (piem., šķidrumiem vai daļai pastu), testējamo ķimikāliju vispirms pārnes uz marles kompreses, kuru pēc tam aplicē uz ādas. Kompresei jāpieguļ ādai, taču ne blīvi, un to panāk, ekspozīcijas laikā izmantojot attiecīgu puspiegulošu pārsēju. Ja testējamo ķimikāliju pārnes uz kompresi, tā ādai jāpiestiprina tā, lai ķimikālijai ar ādu būtu laba saskare un tā uz ādas būtu sadalīta vienmērīgi. Jāpanāk, ka dzīvnieks kompresei nevar pieskarties, tādējādi izslēdzot iespēju, ka testējamā ķimikālija tiek ieēsta vai ieelpota.

11. Šķidras testējamās ķimikālijas parasti pārbauda neatšķaidītas. Testējot cietas vielas (kuras, ja uzskata par nepieciešamu, var saberzt pulverī), testējamā ķimikālija jāsamitrina ar mazāko daudzumu ūdens (vai, ja nepieciešams, cita piemērota nesēja), ar ko pietiek, lai panāktu labu saskari ar ādu. Ja ūdens vietā izmanto citus nesējus, testētās ķimikālijas izraisītā ādas kairinājumā nesēja ietekmei, ja tāda vispār ir, jābūt iespējami minimālai.

12. Ekspozīcijas perioda (parasti četras stundas) beigās testējamās ķimikālijas atliekas no ādas noņem, ja iespējams, ar ūdeni vai citu piemērotu šķīdinātāju, kas neietekmē izveidojušos atbildreakciju un nebojā epidermu.

Devas līmenis

13. Uz testa anatomiskās vietas aplicē 0,5 ml šķidruma vai 0,5 g cietas vielas vai pastas.

Sākotnējais tests (ādas kairinājuma/korozijas *in vivo* tests ar vienu dzīvnieku)

14. Ja uz pierādījumsvara analīzes vai agrākas *in vitro* testēšanas pamata par attiecīgo testējamo ķimikāliju nospriests, ka tā ir kodīga, kairinoša vai nav klasificēta, tālāka *in vivo* testēšana parasti nav vajadzīga. Tomēr, ja tiek uzskatīts, ka vajadzīgi papildu dati, *in vivo* testu sākotnēji parasti izdara ar vienu dzīvnieku, izmantojot šādu pieeju. Vienam dzīvniekam secīgi aplicē trīs testa kompreses. Pirmo kompresi noņem pēc trim minūtēm. Ja nopietnu ādas reakciju nenovēro, citā vietā aplicē otru kompresi, ko noņem pēc stundas. Ja novērojumi šajā testa posmā liecina, ka ekspozīciju iespējams humāni paildzināt līdz četrām stundām, uzliek trešo kompresi, ko noņem pēc četrām stundām, un novērtē atbildreakciju.

15. Ja pēc kādas no trim secīgām ekspozīcijām tiek novērota kodīga ietekme, testu nekavējoties beidz. Ja pēc pēdējās kompreses noņemšanas kodīgu ietekmi nenovēro, dzīvnieku novēro vēl 14 dienas, ja vien korozija neizveidojas jau pirms šā laika beigām.

16. Ja netiek gaidīts, ka testējamā ķimikālija būs kodīga, bet tā var būt kairinoša, vienam dzīvniekam uz četrām stundām aplicē vienu kompresi.

Apstiprinošs tests (ādas kairinājuma *in vivo* tests, kurā izmanto papildu dzīvniekus)

17. Ja sākotnējā testā kodīga ietekme nav novērota, kairinājuma atbildreakcija vai tās neesība jāapstiprina, izmantojot ne vairāk kā divus papilddzīvniekus, kuriem katram aplicē vienu kompresi, ko tur četras ekspozīcijas stundas. Ja sākotnējā testā novērota kairinoša ietekme, apstiprinājuma testu var veikt secīgi vai divus papildzīvniekus eksponējot vienlaicīgi. Izņēmuma gadījumā, kur sākotnējs tests netiek veikts, diviem vai trijiem dzīvniekiem aplicē vienu kompresi, ko noņem pēc četrām stundām. Ja izmanto divus dzīvniekus un atbildreakcija abiem ir vienāda, turpmāka testēšana nav nepieciešama. Pretējā gadījumā jāveic testi ar vēl vienu dzīvnieku. Neskaidru reakciju izvērtēšanai var būt nepieciešams izmantot papildu dzīvniekus.

Novērošanas periods

18. Ar novērošanas periodu jāpietiek, lai varētu pilnīgi izvērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Taču eksperiments vienmēr jāpārtrauc jebkurā brīdī, kad dzīvniekiem parādās pastāvīgu smagu sāpju vai ciešanu pazīmes. Lai novērtētu ietekmes atgriezeniskumu, pēc komprešu noņemšanas dzīvnieki vēl līdz 14 dienas ilgi jānovēro. Ja iedarbības atgriezeniskumu konstatē pirms 14 dienu perioda beigām, eksperiments tajā brīdī jābeidz.

Klīniskie novērojumi un ādas reakciju pakāpes

19. Visiem dzīvniekiem eritēmas un tūskas pazīmes jāpārbauda un atbildreakcija ar atzīmi jānovērtē 60 minūtes pēc tampona noņemšanas un vēl pēc 24, 48 un 72 stundām. Sākotnējā testā ar vienu dzīvnieku tūlīt pēc kompreses noņemšanas apskata arī testa anatomisko vietu. Ādas reakcijas novērtē pa pakāpēm un reģistrē pēc zemāk dotās pakāpju tabulas. Ja ir ādas bojājums, ko pēc 72 stundām nevar identificēt par kairinājumu vai koroziju, tad, lai noteiktu, vai ietekme ir atgriezeniska, novērošana var būt jāturpina līdz 14. dienai. Papildus kairinājuma novērojumam pilnīgi jāraksturo un jāreģistrē arī jebkāda tāda lokāla toksiska ietekme kā ādas attaukošanās un jebkāda sistēmiski kaitīga ietekme (piem., ietekme uz toksiskuma klīniskajām pazīmēm un ķermeņa masas pārmaiņām). Jāapsver, vai neskaidru atbildreakciju precizēšanai neveikt histopatoloģiskus izmeklējumus.

20. Ādas reakciju iedalīšana pakāpēs neizbēgami ir subjektīva. Lai veicinātu ādas reakciju pakāpju saskaņošanu un palīdzētu testēšanas laboratorijām, novērojumu veicējiem un interpretētājiem, personālam, kas veic novērojumus, jābūt pietiekami apmācītam par izmantojamo atzīmju sistēmu (sk. tabulu zemāk). Var noderēt ilustrēti norādījumi par ādas kairinājuma un citu bojājumu pakāpēm (3).

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

21. Pētījuma rezultāti testēšanas galīgajā pārskatā jāapkopo tabulas veidā, aptverot visus 24. punkta sarakstā norādītos jautājumus.

Rezultātu izvērtēšana

22. Ādas kairinājuma novērtējuma atzīmes jāizvērtē kopsakarā ar bojājumu dabu un smagumu un to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Konkrētās novērtējuma atzīmes nav absolūts materiāla kairinošo īpašību standarts, jo tiek novērtēta arī testējamā materiāla cita veida ietekme. Individuālās novērtējuma atzīmes būtu uzskatāmas par bāzesvērtībām, kuras jāizvērtē kombinācijā ar visiem citiem pētījumā veiktajiem novērojumiem.

23. Kairinājuma atbildreakcijas izvērtēšanā jāņem vērā, vai ādas bojājumi ir atgriezeniski. Ja tādas reakcijas kā apmatojuma zaudējums (ierobežotā platībā), hiperkeratoze (ādas pārragošanās), hiperplāzija un plaisāšana saglabājas līdz 14 dienu ilga novērošanas perioda beigām, testējamā ķimikālija jāuzskata par kairinošu.

Testēšanas pārskats

24. Testēšanas pārskatā jānorāda šāda informācija.

In vivo testēšanas pamatojums:

— jau esošu testēšanas datu, arī ar secīgas testēšanas stratēģiju iegūtu rezultātu pierādījumsvara analīze;

— relevantu agrākā testēšanā iegūtu datu apraksts;

— katrā testēšanas stratēģijas posmā iegūtie dati;

— izdarīto *in vitro* testu apraksts, arī detalizēta informācija par procedūrām un ar testējamajām vielām un standartvielām iegūtajiem rezultātiem;

— *in vivo* pētījuma veikšanai nepieciešamā pierādījumsvara analīze.

Testējamā ķimikālija:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu vielas, maisījumi un vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli (UVCB): iespējami izsmeļoši raksturotas pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana) ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Nesējs:

— identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums;

— nesēja izraudzīšanās pamatojums.

Testa dzīvnieks (dzīvnieki):

— izmantotais celms/līnija, izraudzīšanās pamatojums gadījumos, kur neizmanto albīnos trušus;

— katra dzimuma dzīvnieku skaits;

— katra dzīvnieka masa testa sākumā un beigās;

— vecums pētījuma sākumā;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.

Testēšanas nosacījumi:

— kompreses vietas sagatavošanas paņēmiens;

— detalizēta informācija par izmantotajiem kompreses materiāliem un kompreses uzlikšanas paņēmienu;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu, aplicēšanu un noņemšanu.

Rezultāti:

— tabulā apkopotas atzīmes par katram dzīvniekam novēroto kairinājuma/korozijas veida atbildreakciju visos mērītajos laika punktos;

— visu novēroto bojājumu apraksts;

— stāstījumveida apraksts par novērotā kairinājuma vai korozijas dabu un pakāpi un jebkādi histopatoloģiski konstatējumi;

— papildus ādas kairinājuma vai korozijas aprakstam — apraksts par vēl citu nelabvēlīgu vietēju (piem., ādas attaukošanās) vai sistēmisku ietekmi.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

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

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

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

Tabula

Ādas reakcijas klasificēšana

Eritēmas un nekrotisku kreveļu veidošanās

Eritēmas nav	0
Ļoti neliela eritēma (tikko manāma)	1
Labi saskatāma eritēma	2
Vidēja līdz smaga eritēma	3
Smaga eritrēma (liellopa gaļas sarkanums) ar izveidojušos nekrotisku kreveli, kas liedz iespēju noteikt eritēmas pakāpi	4

Maksimālie iespējamie punkti: 4

Tūskas veidošanās

Tūskas nav	0
Ļoti neliela tūska (tikko manāma)	1
Neliela tūska (skarto vietu viegli noteikt pēc izteikta pietūkuma)	2
Vidēja tūska (pietūkums apm. 1 mm)	3
Smaga tūska (pietūkums vairāk nekā 1 mm, arī aiz eksponētā ādas laukuma)	4

Maksimālie iespējamie punkti: 4

Neskaidras atbildreakcijas var precizēt ar histopatoloģiskiem izmeklējumiem.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ādas kairinājums ir atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām.

Ādas korozija ir neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju uz ādas aplicējot līdz četrām stundām. Reakcijām uz kodīgumu parasti ir raksturīgas čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.;"

(2) Pielikuma B daļā B.17. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.17. **ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR GĒNIEM HPRT UN XPRT**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 476 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī pašreizējā pārstrādātā TM B.17 versija atspoguļo gandrīz trīsdesmitgadīgu pieredzi šā testa veikšanā un arī rezultātus, kas gūti, izstrādājot atsevišķu jaunu metodi zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testiem, kuros izmanto timidīna kināzes gēnu. TM B.17 pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).

2. Šā zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testa nolūks ir detektēt ķimikāliju izraisītas gēnu mutācijas. Ar šajos testos izmantotajām šūnu līnijām mēra turpvērstas mutācijas, kas notiek ar reportiergēniem — endogēnisko hipoksantīna–gvanīna fosforiboziltransferāzes gēnu (grauzēju šūnu Hprt, cilvēka šūnu HPRT; šajā testēšanas metodes aprakstā tie apvienoti saukti par gēnu Hprt un HPRT testu) un ksantīna–gvanīna fosforiboziltransferāzes transgēnu (gpt) (tas saukts par XPRT testu). HPRT un XPRT mutāciju testi detektē dažāda spektra ģenētiskus notikumus. Papildus ar šo HPRT testu detektētajiem mutatīvajiem notikumiem (piem., bāzu pāra maiņas mutācijām, nolasīšanas fāzes nobīdēm, mazām delēcijām un insercijām) transgēna gtp autosomālā lokalizācija var dot iespēju detektēt mutācijas, kas radušās no lielām HRPT testā nedetektētām delēcijām un varbūt arī mitotiskām rekombinācijām, jo gēns Hprt atrodas X hromosomā (2) (3) (4) (5) (6) (7). Regulatīviem nolūkiem pašlaik XPRT izmanto mazāk nekā HPRT testu.

3. Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. *In vitro* testos metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēnisks avots. Eksogēniskā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi.

5. Būtu jāraugās, lai nerodas tādi apstākļi (proti, varbūtēja mijiedarbība ar testēšanas sistēmu), kas novestu pie artefaktuāli pozitīviem rezultātiem, kurus nerada tieša testējamo ķimikāliju un šūnas ģenētiskā materiāla mijiedarbība; pie tādiem apstākļiem pieder arī pH vai osmolalitātes pārmaiņas (8) (9) (10), mijiedarbība ar barotnes komponentiem (11) (12) vai pārāk augsti citotoksicitātes līmeņi (13). HPRT testā par pārāk augstiem uzskata līmeņus, kas pārsniedz 19. punktā definētos ieteicamos augšējos citotoksicitātes līmeņus.

6. Pirms šo testēšanas metodi izmanto attiecībā uz maisījumu, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTA PRINCIPS

7. Mutantšūnas, kurām Hprt fermenta darbība HPRT testā vai xprt fermenta darbība XPRT testā neizpaužas, ir rezistentas pret purīna analoga 6-tiogvanīna (TG) citostatisko ietekmi. Hprt (HPRT testā) vai gpt (XPRT testā) standartšūnas ir jutīgas pret TG, kurš inhibē šūnu vielmaiņu un šūnām aptur tālāku dalīšanos. Tātad mutantšūnas TG klātbūtnē spēj proliferēt, turpretī normālas šūnas, kas satur Hprt (HPRT testā) vai gpt (XPRT testā) fermentu, to nespēj.

8. Šūnas, kas ir suspensijā vai vienslāņa kultūrās, uz piemērotu laiku (3–6 stundām) gan ar eksogēnisku metaboliskas aktivācijas avotu, gan bez tā (sk. 14. punktu) eksponē testējamajai ķimikālijai, bet pēc tam kultivē apakškultūrās, lai varētu noteikt citotoksicitāti un lai pirms mutantu atlasīšanas varētu notikt fenotipiskā ekspresija (14), (15), (16), (17). Citotoksicitāti nosaka pēc relatīvās izdzīvotības (*RS*), t. i., pēc klonēšanās efektivitātes, ko izmēra tūlīt pēc apstrādes un koriģē attiecībā uz jebkādiem apstrādes laikā notikušiem šūnu zudumiem salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (18. punkts un 2. papildinājums). Kultūras, kas apstrādātas, barotnē tur pietiekami ilgu laiku (katra veida šūnām tas ir savs), lai būtu iespējama gandrīz optimāla izraisīto mutāciju fenotipiskā ekspresija (parasti vismaz 7–9 dienas). Kad notikusi fenotipiskā ekspresija, nosaka mutantu biežumu, noteiktu skaitu šūnu izsējot tādā barotnē, kas satur selektīvo līdzekli, ar kuru detektē mutantu kolonijas, un barotnē bez selektīvā līdzekļa, pēc kuras nosaka klonēšanās efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc piemērota inkubēšanas laika kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita, ko koriģē atbilstoši klonēšanās efektivitātei mutantu selekcijas laikā.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Šūnas

9. HPRT un XPRT testiem jāizmanto tādu tipu šūnas, kam apliecināts jutīgums pret ķīmiskiem mutagēniem, augsta klonēšanās efektivitāte, stabils kariotips un stabils spontānu mutantu biežums. Pie HPRT testam visbiežāk izmantotajām šūnām pieder Ķīnas kāmja šūnu CHO, CHL un V79 līnija, peļu limfomas šūnas L5178Y un cilvēka limfoblastu šūnas TK6 (18) (19). No CHO atvasinātās šūnas AS52, kam ir transgēns gpt (bet gēns Hprt ir deletēts), izmanto XPRT testā (20) (21); HPRT testu ar šūnām AS52 nevar veikt, jo hprt gēni ir deletēti. Citu šūnu līniju izmantošana jāpamato un jāvalidē.

10. Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda, vai modālais hromosomu skaits ir stabils un vai nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu (22) (23), un, ja konstatē mikoplazmu vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies, šūnas nav izmantojamas. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu normālais cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem. Jāpārbauda arī spontāno mutantu biežums šūnu izejkultūrā, un, ja tas nav pieņemams, kultūra nav izmantojama.

11. Pirms kultūras izmanto šajā testā, tās var būt jāattīra no jau esošām mutantšūnām, piem., HPRT testa vajadzībām kultivējot HAT barotnē, bet XPRT testa vajadzībām — MPA barotnē (5) (24) (sk. 1. papildinājumu). Attīrītās šūnas iespējams saglabāt krioniski un pēc tam atkausēt, lai izmantotu par darba kultūrām. Tikko atkausētu darba kultūru var sākt testam izmantot, kad sasniegts parastais dubultošanās laiks. Izdarot XPRT testu, parastas šūnu AS52 kultūras gadījumā būtu jāizmanto apstākļi, kas garantē transgēna gpt saglabāšanos (20).

Barotne un kultivēšanas apstākļi

12. Kultūru uzturēšanai jāizmanto attiecīgas barotnes un attiecīgi inkubācijas apstākļi (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar CO_2 koncentrāciju 5 %, inkubācijas temperatūra 37 °C). Šūnu kultūras vienmēr būtu jātur tādos apstākļos, lai būtu nodrošināts, ka augšana notiek eksponenciālā fāzē. Īpaši svarīgi ir izraudzīties tādu barotni un tādus kultivēšanas apstākļus, kuri nodrošina šūnu optimālu augšanu ekspresijas periodā un gan mutantšūnām, gan nemutējušām šūnām — optimālu klonēšanās efektivitāti.

Kultūru sagatavošana

13. Šūnu līnijas tiek pavairotas no izejkultūrām, ko kultūras barotnē iesēj tādā blīvumā, lai apstrādes periodā un ekspresijas periodā šūnas suspensijās vai vienslāņa kultūrās joprojām augtu eksponenciāli (piem., attiecībā uz šūnām vienslāņa kultūrās jāizvairās no konfluences).

Metaboliskā aktivācija

14. Ja strādā ar šūnām, kuru endogēniskā metaboliskā kapacitāte nav pietiekama, jāizmanto eksogēniskas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no grauzēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar tādām fermentus inducējošām vielām kā *Aroclor 1254* (25) (26) (27) (28) vai fenobarbitāls kombinācijā ar β-naftoflavonu (29) (30) (31) (32). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (33) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat iedarbīga kā *Aroclor 1254* (29) (31). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē koncentrāciju var paaugstināt līdz 10 % (tilp./tilp.). To, kādu eksogēniskās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veidu un koncentrāciju izraugās, var ietekmēt testējamo vielu klase (34) (35) (36).

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

15. Cietas testējamās ķimikālijas jāsagatavo attiecīgos šķīdinātājos un attiecīgā gadījumā pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 16. punktu). Šķidras testējamās ķimikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķimikālijas vēlams testēt pēc attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (37) (38). Testējamās ķimikālijas preparāti jāpagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var glabāt.

TESTA APSTĀKĻI

Šķīdinātāji

16. Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai testējamo ķimikāliju šķīdību optimizētu, šķīdinātājam negatīvi neietekmējot testa norisi, piem., nemainot šūnu augšanu, neskarot testējamās ķimikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Ja vien iespējams, ieteicams vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju (vai kultūras barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji, piemēram, ir ūdens un dimetilsulfoksīds. Galīgajā apstrādes barotnē organiskajiem šķīdinātājiem parasti nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.), bet šķīdinātājiem uz ūdens bāzes (sālsūdens vai ūdens) — 10 % (tilp./tilp.). Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina, ka tie sader ar testējamo ķimikāliju un ar testa sistēmu un ka izmantotajā koncentrācijā tiem nepiemīt genotoksicitāte. Ja šādu apliecinošu datu nav, svarīgi ir izmantot arī neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), lai ar tām pierādītu, ka izraudzītais šķīdinātājs nerada nekādu deletējošu vai mutagēnisku ietekmi.

Citotoksicitātes mērīšana un ekspozīcijas koncentrāciju izraudzīšanās

17. Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizraugās koncentrācijas, kas spēj izraisīt tādas artefaktuāli pozitīvas atbildreakcijas kā pārmērīga citotoksicitāte (sk. 20. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 21. punktu) vai manāmas pH vai osmolalitātes pārmaiņas (sk. 5. punktu). Ja testējamā ķimikālija pievienošanas brīdī manāmi maina barotnes pH, lai nepieļautu artefaktuāli pozitīvus rezultātus un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu.

18. Koncentrācijas izraugās pēc citotoksicitātes un citiem apsvērumiem (sk. 20.–22. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var noderēt, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Pat ja citotoksicitāte izvērtēta jau no sākuma, galvenajā eksperimentā tā joprojām jānosaka katrai kultūrai. Citotoksicitāti izvērtē pēc *RS*, proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (*CE*), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, *CE* koriģējot pēc negatīvo kontroļu (kurām izdzīvotība ir 100 %) klonēšanās efektivitātes, sk. formulu 2. papildinājumā.

19. Jāizvērtē vismaz četras testa koncentrācijas (nerēķinot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (attiecīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Lai gan ir ieteicams izmantot kultūru dublikātus, ar katru testa koncentrāciju var izmantot vai nu replikātus, vai atsevišķas apstrādātas kultūras. Ar vienas noteiktas koncentrācijas atsevišķajām replikātu kultūrām iegūtie rezultāti pārskatā būtu jāatspoguļo atsevišķi, bet datu analīzes vajadzībām tos drīkst apkopot (17). Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, ar kurām tiek uzrādīta neliela citotoksicitāte vai tās nav, parasti noderēs koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes gadījumā izraudzītajām testa koncentrācijām jāaptver gan koncentrācijas, kuras rada citotoksicitāti, gan koncentrācijas, ar kurām citotoksicitāte ir vidēja, neliela vai tās vispār nav. Daudzām testējamajām ķimikālijām ir novērojama stāva koncentrācijatkarīgās atbildreakcijas līkne, un, lai aptvertu visu citotoksicitātes diapazonu vai lai detalizēti izpētītu devas un atbildreakcijas sakarību, var būt nepieciešams izmantot koncentrācijas ar tuvākiem intervāliem un vairāk nekā četras koncentrācijas, jo īpaši situācijās, kur eksperiments jāatkārto (sk. 43. punktu). Izmantot vairāk nekā 4 koncentrācijas var būt īpaši svarīgi, ja jāizmanto atsevišķas kultūras.

20. Ja maksimālās koncentrācijas pamatā ir citotoksicitāte, ar augstāko koncentrāciju būtu jācenšas panākt *RS* diapazonā no 20–10 %. Piesardzīgi būtu jāinterpretē pozitīvi rezultāti, kas konstatēti tikai ar *RS* 10 % vai zemāku (43. punkts).

21. Kas attiecas uz mazšķīstošām testējamām ķimikālijām, kuras pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, nav citotoksiskas, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas pārsniedz zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, pie kuras rodas duļķainība vai acīm redzamas nogulsnes, jo nogulsnes var rezultātus ietekmēt artefaktuāli. Darbojoties ar koncentrāciju, pie kuras rodas nogulsnes, būtu jācenšas nodrošināt, ka nogulsnes neietekmē testa izdarīšanu. Var būt lietderīgi pirms eksperimenta noteikt šķīdību kultūras barotnē.

22. Ja nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte netiek novēroti, augstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (39) (40). Ja testējamās ķimikālijas sastāvs nav noteikts, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, tā ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls (t.i., ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs (UVCB)), (41), vides ekstrakti u. tml., gadījumos, kur netiek novērota pietiekama citotoksicitāte, augstākā koncentrācija var būt jāpalielina (piem, 5 mg/mL), lai būtu panākta augstāka katra komponenta koncentrācija. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (42).

Kontroles

23. Paralēlas negatīvās kontroles (sk. 16. punktu), proti, tikai šķīdinātājs apstrādes barotnē, ar ko rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādātajām kultūrām, ir ikviena eksperimenta nosacījums.

24. Lai varētu pierādīt laboratorijas spēju izmantotā testa protokola apstākļos identificēt mutagēnus un — attiecīgā gadījumā — eksogēniskās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti, ir vajadzīgas paralēlas pozitīvās kontroles. Pozitīvo kontroļu piemēri sniegti zemāk 1. tabulā. Var izmantot alternatīvas pozitīvās kontrolvielas, ja tas pamatoti. Tā kā ģenētiski toksikoloģiskie zīdītāju šūnu *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti, testus, kuros izmanto apstrādi ar eksogēnisku metabolisku aktivāciju un bez tās, drīkst izdarīt tikai ar pozitīvu kontroli, kas prasa metabolisku aktivāciju. Šajā gadījumā viena vienīga pozitīva kontroles atbildreakcija apliecinās gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Lai pierādītu testa sistēmas jutīgumu, katra pozitīvā kontrole būtu jāizmanto ar vienu vai vairākām tādām koncentrācijām, ar kurām gaidāma reproducējama un detektējama palielināšanās salīdzinājumā ar fonu, turklāt atbildreakciju nedrīkstētu kompromitēt citotoksicitāte, kas pārsniedz šai testēšanas metodei specificētās robežas (sk. 20. punktu).

1. tabula

References ķimikālijas, ko ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanai un pozitīvo kontroļu izraudzīšanās vajadzībām

Nosacījums attiecībā uz metabolisko aktivāciju	Lokuss	Viela un *CAS* numurs
Eksogēniska metaboliska aktivācija nenotiek	*Hprt*	Etilmetānsulfonāts [*CAS* Nr. 62-50-0] Etilnitrozurea [*CAS* Nr. 759-73-9] 4-nitrohinolīna 1-oksīds [*CAS* Nr. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrīns [*CAS* Nr. 3930-19-6] Mitomicīns C [*CAS* Nr. 50-07-7]
Ar eksogēnisku metabolisku aktivāciju	*Hprt*	3-metilholantrēns [*CAS* Nr. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracēns [*CAS* Nr. 57-97-6] Benz[a]pirēns [*CAS* Nr. 50-32-8]
	xprt	Benz[a]pirēns [*CAS* Nr. 50-32-8]

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķimikāliju

25. Proliferējošas šūnas ar testējamo ķimikāliju apstrādā gan metaboliskās aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ekspozīcijai jāilgst attiecīgu laiku (parasti pietiek ar 3–6 stundām).

26. Minimālais šūnu skaits, ko izmanto katrai testa kultūrai (gan kontrolkultūrai, gan apstrādātai kultūrai), katrā testa posmā jābalsta uz spontāno mutantu biežumu. Vispārīgs princips ir šūnas apstrādāt un pasāžām ņemt tādā skaitā, lai visās testa fāzēs katrā kultūrā saglabātos vismaz 10 spontāni mutanti (17). Parasti spontāno mutantu biežums ir $5–20 \times 10^{-6}$. Lai spontāno mutantu biežums būtu 5×10^{-6} un lai pietiekams spontāno mutantu skaits (10 vai vairāk) saglabātos arī kultūrās, ko apstrādes laikā apstrādā ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (10 % *RS*), jāapstrādā vismaz 20×10^{6} šūnas. Turklāt pietiekamā skaitā (bet nekādā gadījumā mazāk par 2 miljoniem) jābūt arī šūnām, ko kultivē ekspresijas periodā un mutantu selekcijas nolūkā uzsēj uz platēm (17).

Fenotipiskās ekspresijas laiks un mutantu biežuma mērīšana

27. Pēc apstrādes perioda šūnas kultivē, lai izpaustos mutantu fenotips. Lai notiktu gandrīz optimāla jauninducētu Hprt un xprt mutantu fenotipiskā ekspresija, parasti pietiek ar minimālo laiku 7 līdz 9 dienas (43) (44). Šajā periodā pastāvīgi veido šūnu apakškultūras, lai visu laiku saglabātos eksponenciāla augšana. Kad fenotipiskā ekspresija notikusi, šūnas pārsēj barotnē ar selektīvo līdzekli (6-tiogvanīnu) un bez tā, lai attiecīgi varētu noteikt mutantu skaitu un klonēšanās efektivitāti selekcijas laikā. Šajā pārsēšanā vienslāņa kultūrām var izmantot trauciņus, bet šūnām suspensijā — mikroiedobju plates. Mutantu selekcijas vajadzībām šūnas jāuzsēj tādā blīvumā, lai būtu garantēta optimāla mutantu izguve (proti, lai nevarētu notikt metaboliska sadarbība) (17). Plates inkubē optimālai koloniju augšanai atbilstošu laiku (piem., 7–12 dienas) un kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita, ko koriģē atbilstoši klonēšanās efektivitātei mutantu selekcijas laikā (formulas sk. 2. papildinājumā).

Laboratorijas kompetence

28. Lai pirms testa pastāvīgas izmantošanas iegūtu pietiekamu vajadzīgo pieredzi, laboratorijai jābūt veikušai eksperimentu sēriju ar pozitīvās kontroles references vielām, kam ir dažādi iedarbības mehānismi (tās izraugās no 1. tabulas saraksta un vismaz vienai no tām jābūt tādai, kas ir aktīva ar metabolisku aktivāciju, un vienai — aktīvai bez tās), un ar dažādām negatīvajām kontrolēm (izmantojot dažādus šķīdinātājus/nesējus). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāsaskan ar literatūras datiem. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām pieredze jau ir, t. i., kuru rīcībā ir vēsturiska datubāze, kāda aprakstīta 30.–33. punktā.

29. Lai varētu pierādīt, ka laboratorija ir kompetenta detektēt mutagēniskas ķimikālijas, noteikt metaboliskās aktivācijas sistēmas darbībspēju un pierādīt, ka šūnu augšanas apstākļi apstrādes laikā, fenotipiskā ekspresija un mutantu selekcija, kā arī atzīmju likšanas procedūras atbilst vajadzīgajam, pozitīvas kontroles vielu (sk. 1. tabulu 25. punktā) izlase jāpēta gan bez metaboliskas aktivācijas, gan ar to. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, jāizraugās tāds izlases ķimikāliju koncentrāciju diapazons, kurā pieaugumi virs fona līmeņa būs reproducējami un ar koncentrāciju saistīti.

Vēsturisko kontroļu dati

30. Laboratorijai jānosaka:

— vēsturisks pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,

— vēsturisks negatīvo (neapstrādātu, ar šķīdinātāju) kontroļu diapazons un sadalījums.

31. Pirmo reizi iegūstot datus par vēsturisku negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm (22). Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar jauniem eksperimentu datiem, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt minētā sadalījuma 95 % kontrolrobežās (17) (45) (46).

32. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tajā būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimentēšanas apstākļos. Lai varētu noteikt, cik mainīgi ir laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu dati, un parādīt, ka laboratorijā šī metodika "tiek kontrolēta" (46), laboratorijām jāizmanto tādas kvalitātes kontroles metodes kā kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (47)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (45).

33. Negatīvo kontroļu datiem vajadzētu būt mutantu biežumam atsevišķās vai, ieteicams, replikātu kultūrās; sk. aprakstu 23. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma 95 % kontrolrobežās (17) (45) (46). Tādus paralēlo negatīvo kontroļu datus, kas ir ārpus 95 % kontrolrobežas, iekļaušanai vēsturiskajā kontroļu sadalījumā var pieņemt tikai tad, ja šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ja ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (sk. augstāk) un nav gadījusies ne tehniska kļūme, ne cilvēka kļūda.

34. Jebkādas eksperimenta protokola pārmaiņas jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajām vēsturisko kontroļu datubāzēm. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izklāsts

35. Rezultātu izklāstā jāiekļauj visi citotoksicitātes aprēķināšanai vajadzīgie dati (izteikti kā *RS*). Gan datos par apstrādātajām kontrolēm, gan par kontrolkultūrām jāiekļauj šūnu skaits pēc apstrādes beigām, tūlīt pēc apstrādes uzsēto šūnu skaits un koloniju skaitīšanas rezultāti (vai attiecībā uz mikroiedobju metodi — tādu iedobju skaits, kurās koloniju nav). Katras kultūras *RS* ieteicams izteikt kā procentu attiecībā pret paralēlo šķīdinātāja kontroli (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

36. Rezultātu izklāstā jāiekļauj visi mutantu biežuma aprēķināšanai vajadzīgie dati. Gan datos par apstrādātajām kultūrām, gan datos par kontrolkultūrām jāiekļauj: 1) gan ar selekcijas līdzekli, gan bez tā uz platēm uzsēto šūnu skaits (brīdī, kad šūnas uzsēj mutantu selekcijai) un 2) gan attiecībā uz platēm ar selektīvo līdzekli, gan platēm bez selektīvā līdzekļa — saskaitīto koloniju skaits (vai attiecībā uz mikroiedobju metodi, tādu iedobju skaits, kurās koloniju nav) Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita (uz platēm ar selektīvu līdzekli), kas koriģēts atbilstoši klonēšanās efektivitātei (uz platēm bez selekcijas līdzekļa). Mutantu biežums būtu jāizteic kā mutantšūnu skaits uz miljonu dzīvotspējīgu šūnu (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

37. Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

38. Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

— paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē saskaņā ar 33. punktu;

— paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 24. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturiskajā pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

— testēšana notikusi ar diviem eksperimentēšanas nosacījumiem (t.i., ar metabolisko aktivāciju un bez tās), ja vien vienā no tiem rezultāti nav bijuši pozitīvi (sk. 25. punktu);

— šūnas un koncentrācijas bijušas analizējamas pietiekamā skaitā (25., 26. un 19. punkts);

— maksimālās koncentrācijas izraudzīšanās kritēriji atbilst 20., 21. un 22. punktā aprakstītajam.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

39. Ja visi pieņemamības kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju par viennozīmīgi pozitīvu uzskata tad, ja ar kādu no izvērtētajiem eksperimentēšanas nosacījumiem:

— vismaz vienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums;

— šo palielinājumu izvērtējot ar attiecīgu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu;

— kāds no rezultātiem ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā; sk. 33. punktu).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, šajā testēšanas sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija kultivētās zīdītāju šūnās spēj izraisīt gēnu mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (46) (48).

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju par viennozīmīgi negatīvu uzskata tad, ja ne ar vieniem no izvērtētajiem eksperimentēšanas nosacījumiem:

— ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums;

— ar attiecīgu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,

— visi rezultāti ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā); sk. 33. punktu).

Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj kultivētās zīdītāju šūnās izraisīt gēnu mutācijas.

41. Nepārprotami pozitīva vai negatīva atbildreakcija nav obligāti jāverificē.

42. Ja atbildreakcija nav atbilstoši iepriekš rakstītajam nedz nepārprotami negatīva, nedz nepārprotami pozitīva vai lai varētu labāk noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jāizvērtē ekspertam un/vai jāturpina pētīt. Var būt lietderīgi izdarīt atkārtotu eksperimentu ar modificētiem nosacījumiem (piem., koncentrāciju intervāls, atšķirīgi metaboliskās aktivācijas nosacījumi (proti, S9 koncentrācija vai S9 avots]).

43. Retos gadījumos datu kopums pat pēc sīkākas izpētes neļauj izdarīt secinājumu par pozitīviem vai negatīviem rezultātiem. Tāpēc būtu jāsecina, ka testējamās ķimikālijas atbildreakcija bijusi neskaidra (to vienlīdz varbūtīgi ir interpretēt gan kā pozitīvu, gan kā negatīvu).

Testēšanas pārskats

44. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināms;

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums;

— šķīdinātāja īpatsvars galīgajā kultūras barotnē.

Šūnas:

attiecībā uz laboratorijas pamatkultūrām:

— kultūru tips, šūnu līniju avots;

— pasāžu skaits, ja uzzināms, un to vēsture attiecīgajā laboratorijā;

— kariotipiskās īpašības un/vai modālais hromosomu skaits;

— šūnu kultūru audzēšanas metodes;

— mikoplazmas neesība;

— šūnu dubultošanās laiks.

Testa nosacījumi:

— koncentrāciju izvēles un kultūru skaita izraudzīšanās pamatojums, piem., citotoksicitātes dati un šķīdības ierobežojumi;

— barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis;

— testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija kultūras barotnē (piem., kultūras barotnes µg vai mg/ml vai mM);

— barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums);

— inkubācijas temperatūra;

— inkubācijas laiks;

— apstrādes ilgums;

— šūnu blīvums apstrādes laikā;

— metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles);

— attiecībā uz katru no apstrādes nosacījumiem — pozitīvās un negatīvās kontroles vielas, galīgās koncentrācijas;

— fenotipiskās ekspresijas periods (norādot uzsēto šūnu skaitu, subkultūras un attiecīgā gadījumā barošanas grafiku);

— selektīvā līdzekļa identitāte un koncentrācija;

— testu pieņemamības kritēriji;

— dzīvotspējīgo šūnu un mutantšūnu skaitīšanas metodes;

— citotoksicitātes mērīšanas metodes;

— jebkāda citotoksicitātei un izmantotajai metodei relevanta papildinformācija;

— inkubācijas laiks pēc uzsēšanas;

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs;

— pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

— par katru kultūru — apstrādāto šūnu un apakškultūrām izmantoto šūnu skaits;

— citotoksicitātes mērījumi un citi novērojumi, ja tādi ir;

— izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks;

— selektīvā un neselektīvā barotnē uzsēto šūnu skaits;

— koloniju skaits neselektīvajā barotnē un rezistento koloniju skaits selektīvajā barotnē, saistītais mutantu biežums;

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība;

— paralēlās negatīvās (šķīdinātājs) un pozitīvās kontroles dati (koncentrācijas un šķīdinātāji);

— vēsturisko negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām, standartnovirzēm un ticamības intervālu (piem., 95 %), kā arī datu skaits;

— statistiskās analīzes (par atsevišķām kultūrām un attiecīgā gadījumā par apkopotiem replikātiem) un p-vērtības, ja tādas ir.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(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. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

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

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

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

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

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

(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. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

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

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

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [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. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

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

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.

(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. Available at: [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. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

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

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Bāzu pāru maiņas mutagēni: ķimikālijas, kas izraisa DNS bāzu pāru maiņu.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Klonēšanās efektivitāte: to zemā blīvumā uzsēto šūnu procents, no kurām var izaugt pieskaitāma kolonija.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas kultūras barotnē.

Citotoksicitāte: attiecībā uz testiem, ko aptver šī testēšanas metode, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu relatīvās izdzīvotības samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. attiecīgo punktu).

Turpvērsta mutācija: tāda gēna mutācija no vecāktipa uz mutantformu, kura maina vai izdzēš iekodētā proteīna fermentatīvo darbību vai tā funkciju.

Nolasīšanas fāzes nobīdes mutagēni: ķimikālijas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanos vai izzušanu.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, arī DNS pārrāvumus, aduktus, pārkārtojumus, mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai noturīgus hromosomu bojājumus.

HAT barotne: barotne, kuras sastāvā ir hipoksantīns, aminopterīns un timidīns un kuru izmanto Hprt mutantu attīrīšanai.

Mitotiska rekombinācija: mitozes laikā notiekoša homoloģisku hromatīdu rekombinācija, kuras rezultātā var inducēties DNS dubultpavedienu pārtraukumi vai zust heterozigotāte.

MPA barotne: barotne, kuras sastāvā ir ksantīns, adenīns, timidīns, aminopterīns un mikofenolskābe un kuru izmanto Xprt mutantu attīrīšanai.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Mutantu biežums (MF): konstatēto mutantu koloniju skaits, kas dalīts ar selektīvā barotnē uzsēto šūnu skaitu un pārrēķināts atbilstoši klonēšanās efektivitātei (vai dzīvotspējai) selekcijas laikā.

Fenotipiskās ekspresijas laiks: tas laiks pēc apstrādes, kad ģenētiskā pārmaiņa nostiprinās genomā un jebkādi līdzšinējie gēna produkti tiktāl izsīkst, ka mainās arī fenotipiskā pazīme.

Relatīvā izdzīvotība (*RS*): *RS* izmanto par apstrādes izraisītas citotoksicitātes mēru. *RS* ir tūlīt pēc apstrādes uzsētu šūnu klonēšanās efektivitāte (*CE*), kas pārrēķināta atbilstoši jebkādam šūnu zudumam apstrādes laikā, salīdzinājumā ar klonēšanās efektivitāti negatīvajās kontrolēs (tajās konstatēto izdzīvotību pieņem par 100 %).

Aknu S9 frakcijas: ar 9 000g centrifugēta aknu homogenāta supernatants, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: aknu S9 frakcijas un metaboliskajai fermentatīvajai darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins, ar ko definē kontroles kultūras, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Neapstrādāta kontrole: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

UVCB: ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti un bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

CITOTOKSICITĀTES UN MUTANTU BIEŽUMA NOTEIKŠANAS FORMULAS

Citotoksicitāti izvērtē pēc relatīvās izdzīvotības, proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (*CE*), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, *CE* koriģējot atbilstoši negatīvo kontroļu klonēšanās efektivitātei (kurām izdzīvotība ir 100 %), sk. *RS* formulu zemāk.

Koriģēto *CE* ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$\text{Adjusted CE} = \frac{\text{Number of cells at the end of treatment}}{\text{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$\text{RS} = \frac{\text{Adjusted CE in treated culture}}{\text{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutantu biežums ir mutantu koloniju klonēšanās efektivitāte selektīvā barotnē, dalīta ar klonēšanās efektivitāti neselektīvā barotnē; abas efektivitātes mērītas vienai un tai pašai kultūrai selekcijas brīdī.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Cloning efficiency of mutant colonies in selective medium}}{\text{Cloning efficiency in non-selective medium}}$$

Ja klonēšanās efektivitātes noteikšanai izmanto plates:

CE = koloniju skaits / uz plates uzsēto šūnu skaits

Ja klonēšanās efektivitātes noteikšanai izmanto mikroiedobju plates:

Koloniju skaitu uz vienu mikroiedobju plates iedobi raksturo ar Puasona sadalījumu.

klonēšanās efektivitāte = -LnP(0) / vienā iedobē uzsēto šūnu skaits

-LnP(0) ir varbūtīgais tukšo iedobju skaits no apsēto iedobju skaita, un to apraksta ar formulu

LnP(0)= -Ln (tukšo iedobju skaits / apsēto iedobju skaits);"

(3) Pielikuma B daļā B.22. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.22 **GRAUZĒJU DOMINANTO LETĀLO MUTĀCIJU TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 478 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī modificētā testēšanas metodes versija atspoguļo vairāk nekā trīsdesmit gadu pieredzi šā testa veikšanā un šā testa potenciālu tikt integrētam vai kombinētam ar tādiem citiem toksiskuma testiem kā pētījumi par ontoģenētisko un reproduktīvo toksicitāti vai genotoksicitāti; tomēr šā testa ierobežojumu dēļ, kā arī tādēļ, ka tajā izmanto daudz dzīvnieku, to paredzēts izmantot nevis par primāru metodi, bet gan par papildu testēšanas metodi, kuru var izmantot tad, ja regulatīvās prasības neatstāj citu alternatīvu. Ja toksiskumu testē kombinēti, iespējams būtiski samazināt testos izlietoto dzīvnieku skaitu. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).

2. Dominanto letālo mutāciju (*DL*) testa nolūks ir izpētīt, vai ķimikālijas neizraisa mutācijas, kuru cēlonis ir hromosomu aberācijas dīgļšūnās. Dominanto letālo mutāciju tests genotoksicitātes novērtēšanai ir relevants arī tāpēc, ka, lai gan dažādām sugām *in vivo* metabolisms, farmakokinētika un DNS reparācijas procesi var atšķirties, šie faktori tomēr ir aktīvi un piedalās atbildreakcijā. *DL* mutācijas inducēšanās pēc tam, kad testa dzīvnieks eksponēts testējamai ķimikālijai, liecina, ka ķimikālija skārusi dīgļaudus.

3. *DL* mutācijas izraisa embrija vai augļa nāvi. *DL* mutācijas inducēšanās pēc tam, kad testa dzīvnieks eksponēts testējamai ķimikālijai, liecina, ka ķimikālija skārusi dīgļšūnas.

4. *DL* tests ir relevants beigupunkts cilvēka apdraudējuma un pa dīgļlīniju nodotu ģenētisku slimību riska prognozēšanā un noder tam, lai ar somatisku *in vivo* beigupunktu palīdzību apstiprinātu pozitīvus testu rezultātus. Tomēr šim testam vajag daudz dzīvnieku un tas ir darbietilpīgs; tāpēc tā veikšana ir ļoti dārga un patērē daudz laika. Tā kā dominantu letālu mutāciju spontānais biežums ir diezgan augsts, šā testa jutīgums nelielu mutāciju biežuma palielinājumu detektēšanā parasti ir ierobežots.

5. Galveno terminu definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Šo testu visbiežāk izdara ar pelēm (2) (3) (4), taču dažos gadījumos, ja tas zinātniski pamatoti, var būt lietderīgi izmantot tādas citas sugas kā žurka (5) (6) (7) (8). Parasti *DL* ir lielu hromosomālu aberāciju (strukturālu un skaitlisku anomāliju) rezultāts (9) (10) (11), taču nevar izslēgt gēnu mutācijas. *DL* mutācija ir tāda tieši dīgļšūnā radusies vai agrīnā embrijā pēc apaugļošanas konstatēta mutācija, kura neizraisa gametas disfunkciju, bet ir apaugļotajai olšūnai vai augošajam embrijam letāla.

7. Atsevišķus tēviņus attiecīgos intervālos secīgi pāro ar iepriekš nepārotām mātītēm. Pēc apstrādes notikušo pārošanās reižu skaits ir atkarīgs no *DL* pētījuma galanolūka (23. punkts), un tam jābūt tādam, lai būtu drošība, ka attiecībā uz *DL* ir izvērtētas visas vīrišķo dīgļšūnu nobriešanas fāzes (12).

8. Ja ir pierādījumi, ka testējamā ķimikālija vai tās metabolīts vai metabolīti sēkliniekos nenokļūs, šo testu izmantot nav lietderīgi.

TESTA PRINCIPS

9. Parasti tēviņus attiecīgā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķimikālijai un pāro ar neapstrādātām iepriekš nepārotām mātītēm. Izmantojot secīgus pārošanas intervālus, var testēt dažādu tipu dīgļšūnas. Kad pēc pārošanas pagājis attiecīgs laiks, mātītes eitanazē un tām izpēta dzemdi, lai noteiktu implantējušos augļu un nedzīvo un dzīvo embriju skaitu. Testējamas ķimikālijas dominanto letalitāti nosaka, dzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti apstrādātajā grupā salīdzinot ar dzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti nesēja/šķīdinātāja kontrolgrupā. Pārsvars, kāds nedzīvo implantējušos augļu skaitam uz vienu mātīti apstrādātajā grupā ir pār nedzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti kontrolgrupā, atspoguļo testējamās ķimikālijas inducēto pēcimplantācijas zudumu. Pēcimplantācijas zudumu aprēķina, nosakot nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu apstrādātajā grupā un to salīdzinot ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā. Pirmsimplantācijas zudumu var aplēst, salīdzinot, kāds apstrādātajā grupā un kontrolgrupā ir dzelteno ķermeņu skaits mīnus implantējušos augļu kopskaits vai arī implantējušos augļu kopskaits uz vienu mātīti.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

10. Kompetence šā testa veikšanā jāpierāda, demonstrējot spēju reproducēt dominanto letālo mutāciju biežumu no publicētiem datiem (piem., (13) (14) (15) (16) (17) (18)) ar tādām pozitīvo kontroļu vielām (arī ja atbildreakcijas ir vājas) kā 1. tabulas sarakstā norādītās un ar nesēju kontrolēm un iegūstot negatīvo kontroļu biežumus, kas atbilst pieņemamam datu diapazonam 1 (sk. atsauces augstāk) vai laboratorijas vēsturisko kontroļu sadalījumam, ja tāds pieejams.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

11. Jāizmanto veseli dzimumnobrieduši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto peles, bet var būt lietderīgi izmantot arī žurkas. Var izmantot arī jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus, ja vien pārskatā tas tiek zinātniski pamatots.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

12. Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Relatīvajam mitrumam ideālā gadījumā jābūt 50–60 %, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Pirms apstrādes vai pārošanas, ja netiek gaidīts vai novērots, ka grauzēji izturēsies agresīvi, tos ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās (ne vairāk kā pa pieci), vēlams, būros ar cietu grīdu un ar attiecīgi bagātinātu vidi. Ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

13. Veselus un dzimumnobriedušus pieaugušus tēviņus un mātītes nejaušināti sadala kontrolgrupās un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisko identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Nedrīkst pieļaut pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas šķērskontaminēšanos. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

14. Pirms dzīvniekiem dod devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē attiecīgos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno uzturam vai dzirdināmajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms devu došanas atšķaidīt. Inhalatīvas ekspozīcijas vajadzībām testējamās ķimikālijas atkarībā no to fizikāl-ķīmiskajām īpašībām var būt gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un nav noteikti pareizi glabāšanas nosacījumi, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testa nosacījumi

Šķīdinātājs/nesējs

15. Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un nedrīkst būt aizdomas, ka tas spēj reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību. Ieteicams vienmēr, kad vien iespējams, vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metil-celulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa.

Pozitīvās kontroles

16. Būtu vienmēr jāizmanto paralēlas pozitīvas kontroles dzīvnieki, ja vien laboratorija nav apliecinājusi kompetenci testa veikšanā un vēl nesen (piem., pēdējo piecu gadu laikā) testu izmantojusi regulāri. Tomēr pozitīvās kontroles dzīvnieki nav jāapstrādā tādā pašā apstrādes ceļā kā dzīvnieki, kas saņem testējamo ķimikāliju; nav arī jāņem paraugi no visiem pārošanas intervāliem. Pozitīvās kontroles vielām jābūt tādām, par kurām zināms, ka testam izmantotajos apstākļos tās rada *DL*. Izņemot apstrādi, ar kontrolgrupu dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

17. Pozitīvās kontroles vielu devas jāizraugās tā, lai tās konsekventi radītu pozitīvu ietekmi, kura izpaužas kā dominantas letālas mutācijas, taču lai šī ietekme būtu vāja vai vidēja, tādējādi paverot iespēju kritiski izvērtēt testa veiktspēju un jutīgumu. Pozitīvās kontroles vielu un attiecīgu devu piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles vielu piemēri

Viela [*CAS* Nr.] (atsauces Nr.)	Iedarbīgo devu diapazons (mg/kg) (grauzēju suga)	Devu došanas laiks (dienas)
Trietilēnmelamīns [51-18-3] (15)	0,25 (pelēm)	1
Ciklofosfamīds [50-18-0] (19)	50–150 (pelēm)	5
Ciklofosfamīds [50-18-0] (5)	25–100 (žurkām)	1
Etilmetānsulfonāts [62-50-0] (13)	100–300 (pelēm)	5
Monomērakrilamīds [79-06-1] (17)	50 (pelēm)	5
Hlorambucils [305-03-3] (14)	25 (pelēm)	1

Negatīvās kontroles

18. Katrā paraugošanas reizē jābūt arī negatīvās kontroles dzīvniekiem, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet pārējās darbības izdara tāpat kā ar grupām, kam dotas devas (20). Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītais šķīdinātājs/nesējs neierosina *DL* vai citu kaitīgu iedarbību, katrā paraugošanas reizē jābūt arī neapstrādātiem kontroldzīvniekiem, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesēju izmantot par kontrolvielu.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits

19. Atsevišķus tēviņus attiecīgos iepriekš noteiktos intervālos (piem., ar nedēļas intervālu, 21. un 23. punkts) secīgi pāro ar, vēlams, vienu atsevišķu iepriekš nepārotu mātīti. Tēviņu skaits grupā būtu iepriekš jānosaka tā, lai ar to pietiktu (kombinācijā ar katrā pārošanas intervālā pāroto mātīšu skaitu) tādas statistiskas jaudas iegūšanai, kāda vajadzīga, lai detektētu, ka *DL* biežums vismaz dubultojas (44. punkts).

20. Ar statistiskās jaudas aprēķiniem būtu iepriekš jānosaka, ar kādu mātīšu skaitu uz vienu pārošanas intervālu būs iespējams detektēt, ka *DL* biežums vismaz dubultojas (proti, tikdaudz grūsnu mātīšu, lai būtu iegūti vismaz 400 implantējušies augļi) (20) (21) (22) (23) un lai būtu gaidāms vismaz viens nedzīvs implantējies auglis uz analizējamo vienību (t.i. vienai devai atbilstošo pārošanas grupu) (24).

Devu došanas periods un pārošanas intervāli

21. Pārošanas intervālu skaits pēc apstrādes ir atkarīgs no apstrādes grafika un ar to būtu jānodrošina, ka attiecībā uz *DL* inducēšanos jāizvērtē visas vīrišķo dīgļšūnu nobriešanas fāzes (12) (25). Kas attiecas uz vienu apstrādi, proti, līdz piecām devu došanas reizēm dienā, ir ieteicams, lai pēc pēdējās apstrādes ar nedēļu ilgiem intervāliem notiktu 8 (peļu) vai 10 (žurku) pārošanās. Ja devu došanas reizes ir vairākas, proporcionāli devu došanas perioda paildzināšanai var samazināt pārošanas intervālu skaitu, taču saglabājot mērķi izvērtēt visas spermatoģenēzes fāzes (piem., ja eksponēšana ilgusi 28 dienas, peļu gadījumā visu spermatoģenēzes fāžu izvērtēšanai pietiek tikai ar 4 pārošanas reizēm nedēļā). Visi apstrādes un pārošanas grafiki būtu zinātniski jāpamato.

22. Mātītes būtu jāatstāj kopā ar tēviņiem vismaz vienu estrālo ciklu (piem., gan pelēm, gan žurkām vienu estrālo ciklu aptver viena nedēļa). Mātītes, kas kādā nedēļu ilgā intervālā nav pārojušās, var izmantot vēlākam pārošanas intervālam. Tās var arī atstāt, līdz pārošanās notikusi, par ko liecina sperma vagīnā vai vaginmāla korķa esība.

23. Izmantotā ekspozīcija un pārošanas režīms ir atkarīgi no *DL* pētījuma galanolūka. Ja mērķis ir noteikt, vai kāda konkrēta ķimikālija pati par sevi inducē *DL* mutācijas, atzīts paņēmiens ir eksponēt dzīvniekus visā spermatoģenēzes ciklā (piem., pelei 7 nedēļas, 5–7 apstrādes nedēļā) un pārot tos vienreiz tā noslēgumā. Tomēr, ja mērķis ir apzināt pret *DL* inducēšanos jutīgo dīgļšūnu tipu, priekšroka dodama vienreizējai vai piecas dienas ilgai ekspozīcijai, kam seko pārošana reizi nedēļā.

Devu līmeņi

24. Iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, kas jāizdara tāpēc, ka nav devas izvēlei piemērotu datu, jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantoti galvenajā testā (26). Pētījuma mērķim jābūt noskaidrot maksimālo panesamo devu (*MTD*), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošu toksiskuma pazīmju izraisīšanas (piem., inducē anormālu izturēšanos vai reakcijas, nelielu ķermeņa masas samazināšanos vai citotoksicitāti hematopoētiskajā sistēmā, bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu humāni jāizdara eitanāzija (27)).

25. MTD arī nedrīkst nelabvēlīgi ietekmēt pārošanās rezultativitāti (21).

26. Testējamās ķimikālijas, kuras zemā netoksiskā devā iedarbojas bioloģiski specifiski (tādas kā hormoni un mitogēni), un ķimikālijas, kurām ir ļoti izteiktas toksikokinētiskās īpašības, var būt šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi un tātad attiecībā uz devām var būt jānovērtē atsevišķi.

27. Lai iegūtu informāciju par devas–atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīva kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamai ķimikālijai diapazona noteikšanas pētījumā toksiskums neizpaužas vai ķimikālijas toksiskums neizpaužas uz esošo datu pamata, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2 000 mg uz kg ķermeņa masas. Ja testējamai ķimikālijai toksiskums tomēr izpaužas, *MTD* jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons no maksimālās devas līdz devai, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Attiecībā uz netoksiskām ķimikālijām robeždeva devu došanas periodam 14 dienas vai vairāk ir 1 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā, bet devu došanas periodiem, kas nesasniedz 14 dienas, — 2 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā.

Devu došana

28. Testi jāplāno, ņemot vērā iespējamo cilvēka ekspozīcijas ceļu. Kā pamatotus var izraudzīties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., ar uzturu, ar dzirdināmo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, vietēju aplikāciju, ieelpošanu, perorālu uzņemšanu (ar gavāžu) vai implantāciju. Jebkurā gadījumā ceļš jāizraugās tā, lai mērķaudiem nodrošinātu pietiekamu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķimikāliju piejauc barībai vai dzirdināmam ūdenim, jo īpaši vienreizējas devas gadījumā, jāgādā, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un pārošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 31. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot ūdens šķīdumus, kuru gadījumā var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Ja izmanto lielāku tilpumu (ja dzīvnieku labturības tiesību akti to atļauj), tas jāpamato. Testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa masu saglabātos konstanta.

Novērojumi

29. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā, kurā periodā pēc devu došanas gaidāms ietekmju maksimums, testa dzīvniekiem jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Visi dzīvnieki jānosver pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos pēc tam vismaz reizi nedēļā, kā arī eitanazēšanas brīdī. Vismaz reizi nedēļā jāmēra barības patēriņš. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieks toksiskums, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (27).

Audu ievākšana un pārstrāde

30. Mātītes eitanazē otrajā grūtniecības pusē 13. grūsnības dienā (GD) pelēm un 14.–15. GD žurkām. Izmeklē dzemdi attiecībā uz dominantām letālām ietekmēm, nosakot implantējušos augļu skaitu, dzīvo un mirušo embriju skaitu un dzelteno ķermeņu skaitu.

31. Lai saskaitītu dzeltenos ķermeņus, atsedz dzemdes ragus un olnīcas; izņem, skaita un nosver augļus. Jāraugās, lai tiktu pamanītas rezorbcijas, ko var aizsegt dzīvi augļi; visas rezorbcijas jāuzskaita. Dokumentē augļu mirstību. Dokumentē arī veiksmīgi apaugļojušos mātīšu skaitu, kopējo implantāciju un pirmsimplantācijas zudumu skaitu, kā arī pēcimplantācijas mirstību (ieskaitot agrīnas un vēlīnas rezorbcijas gadījumus). Turklāt redzamos augļus var vismaz 2 nedēļas saglabāt Buina fiksācijas šķīdumā, fiksējot lielas ārējas kroplības (28) un tādējādi gūstot papildinformāciju par testējamā līdzekļa reproduktīvo un ontoģenētisko ietekmi.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

32. Dati jāapkopo tabulā, norādot pāroto tēviņu skaitu, grūsno mātīšu skaitu, kā arī to mātīšu skaitu, kurām nav iestājusies grūtniecība. Katras pārošanās rezultāti līdz ar katra tēviņa un mātītes identitāti jāatspoguļo atsevišķi. Attiecībā uz katru mātīti jāreģistrē pārošanas intervāls, apstrādāto tēviņu devu līmenis un dzīvo un nedzīvo implantējušos augļu skaits.

33. Pēcimplantācijas zudumu aprēķina, nosakot nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu apstrādātajā grupā un to salīdzinot ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret augļu kopskaitu nesēja/šķīdinātāja kontrolgrupā.

34. Pirmsimplantācijas zudumu var aprēķināt pēc dzelteno ķermeņu un implantējušos augļu skaita starpības vai pēc implantējušos augļu vidējā skaita samazinājuma vienā dzemdē salīdzinājumā ar kontroles dzīvnieku pārošanās rezultātiem. Ja aplēš pirmsimplantācijas zudumu, tas jānorāda ziņojumā.

35. Dominanto letālo koeficientu aplēš šādi: (nāves gadījumi pēc implantācijas / kopējās implantācijas uz vienu mātīti) × 100.

36. Pārskatā jāatspoguļo 29. punktā minētie toksiskuma un klīnisko pazīmju dati.

Pieņemamības kritēriji

37. Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

— paralēlā negatīvā kontrole atbilst publicētajām vēsturisko negatīvo kontroļu datu normām un laboratorijas vēsturiskajiem kontroļu datiem, ja tādi ir (sk. 10. un 18. punktu);

— paralēlās pozitīvās kontroles inducētā reakcija atbilst publicētajām vēsturisko pozitīvo kontroļu datu normām vai laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzei, ja tāda ir, un salīdzinājumā ar negatīvajām kontrolēm ir iegūts statistiski būtisks palielinājums (sk. 17. un 18. punktu);

— ir izanalizēts pietiekams kopējo implantējušos augļu un devu skaits (20. punkts);

— maksimālās devas izraudzīšanās kritēriji atbilst 24. un 27. punktā aprakstītajiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

38. Lai iegūtu devas un atbildreakcijas izanalizēšanai pietiekamus datus, jāizanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas.

39. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

— vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— attiecībā uz vismaz vienu no eksperimenta nosacījumiem (piem., pārošanas intervāls viena nedēļa) palielinājums, to attiecīgā testā izvērtējot, ir saistīts ar devu un

— kāds no iegūtajiem rezultātiem ir ārpus pieņemamā negatīvo kontroļu datu diapazona vai ārpus laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā), ja tāds pieejams.

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku dīgļšūnās spēj inducēt dominantas letālas mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm sniegti 44. punktā, citas ieteicamas statistiskas pieejas var atrast arī literatūrā (20) (21) (22) (24) (29). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

— ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— ne ar vienu no eksperimenta nosacījumiem nav novērojams ar devu saistīts palielinājums un

— visi rezultāti ir pieņemamajā negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu (ja tādi pieejami) diapazonā (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā).

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku dīgļšūnās nespēj inducēt dominantas letālas mutācijas.

41. Nepārprotami pozitīva vai nepārprotami negatīva atbildreakcija nav jāverificē.

42. Ja atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai viennozīmīgi pozitīva un lai varētu vieglāk noskaidrot kāda rezultāta bioloģisko nozīmīgumu (piem., neizteikts palielinājums vai robežgadījums), dati būtu jāizvērtē, izmantojot ekspertu spriedumus un/vai tālāku izmeklēšanu, kurā izmanto jau esošos eksperimentu datus, piem., sprież, vai pozitīvais rezultāts ir ārpus negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu pieņemamības diapazona (30).

43. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, vai testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka rezultāti ir neskaidri.

44. Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību ieteicams uzskatīt tēviņu. Lai gan skaitīšanas datu (piem., implantējušos augļu skaits uz vienu mātīti) sadalījums var būt pēc Puasona, un/vai īpatsvara (piem., nedzīvo implantējušos augļu procentuālās daļas) sadalījums var būt binomiāls, tomēr bieži gadās, ka šādiem datiem ir palielināta dispersija (31). Tātad statistiskajā analīzē vispirms, izmantojot tādus dispersijas testus kā Kokrana binomiālās mainības tests (32) vai Tarona C(α) tests binomiālās palielinātās dispersijas noteikšanai, vajadzētu testēt, vai dispersija nav palielināta / nepietiekama(31) (33). Ja nekonstatē novirzi no binomiālā sadalījuma, pa devu līmeņiem proporcionālas tendences var testēt ar Kokrana–Ārmitidža tendenčtestu (34), savukārt pārveida salīdzinājumus ar kontrolgrupu — ar Fišera precīzo testu (35). Līdzīgi, nekonstatējot novirzi no Puasona sadalījuma, var ar Puasona regresijas metodi (36) testēt skaitījuma tendences, bet pārveida salīdzinājumus ar kontrolgrupu — Puasona modeļa kontekstā, izmantojot pāru kontrastus (36). Ja konstatē būtiski palielinātu vai pazeminātu dispersiju, ieteicams izmantot neparametriskas metodes (23) (31). Pie tām pieder tādi ranžējoši testi kā Džonkhīra–Terpstras tendenčtests (37) un Manna–Vitnija testi (38) pārveida salīdzinājumiem ar nesēja/šķīdinātāja kontroles grupu, kā arī permutāciju testi, atkārtotu paraugošanu testi vai *bootstrap* testi tendenču konstatēšanai un pārveida salīdzinājumiem ar kontrolgrupu (31) (39).

45. Pozitīvi *DL* testa rezultāti liecina, ka testējamā ķimikālija devu saņēmuša testētās sugas tēviņa dīgļšūnām ir genotoksiska.

46. Apsverot, vai novērotās vērtības ir vēsturiskā kontroles diapazona robežās vai ārpus tām, var iegūt pieturas punktus atbildreakcijas bioloģiskā nozīmīguma izvērtēšanai (40).

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un sastāvdaļu relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— nesēja izraudzīšanās pamatojums;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;

— barības, dzirdināmā ūdens vai inhalācijas preparātu sagatavošana;

— preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tāda veikta.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija un izraudzīšanās pamatojums;

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums;

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;

— dzīvnieku unikālās identificēšanas metode;

— īslaicīgiem pētījumiem: tēviņu individuālā masa testa sākumā un beigās; par nedēļu ilgākiem pētījumiem: individuālā masa pētījuma laikā un barības patēriņš. Norāda katras grupas dzīvnieku ķermeņa masas diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas nosacījumi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati;

— devu diapazona noteikšanas pētījuma dati;

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu;

— ievadīšanas ceļa izraudzīšanās pamatojums;

— metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksiskumu dzīvniekiem, ja tādas ir, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums;

— ja rezultāti ir negatīvi, ar kādām metodēm verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē;

— faktiskā deva (mg uz kg ķermeņa masas dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā);

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti;

— detalizēta informācija par krātiņa vides bagātinājumu;

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izraudzīšanās pamatojums;

— atsāpināšanas metode;

— eitanāzijas metode;

— audu izolēšanas un saglabāšanas procedūras;

— visu komplektu un reaģentu avots un sērijas numuri (attiecīgā gadījumā);

— *DL* skaitīšanas metodes;

— pārošanas grafiks;

— pārošanas veiksmīguma noteikšanas metode;

— eitanazēšanas laiks;

— *DL* ietekmju novērtējuma atzīmju kritēriji, ieskaitot dzelteno ķermeni, implantācijas gadījumus, rezorpcijas gadījumus un pirmsimplantācijas zudumus, dzīvos implantējušos augļus, nedzīvos implantējušos augļus.

Rezultāti:

— dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksiskuma pazīmes;

— tēviņu ķermeņa masa devu došanas un pārošanas periodos;

— pāroto mātīšu skaits;

— ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība;

— tagadējie un vēsturiskie negatīvas kontroles dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām un standartnovirzēm;

— tagadējie pozitīvās kontroles dati;

— tabulā apkopoti dati par katru mātīti, arī: dzelteno ķermeņu skaits katrai mātītei; implantāciju skaits katrai mātītei; resorpcijas gadījumu un pirmsimplantēšanās bojāejas gadījumu skaits katrai mātītei; dzīvo implantējušos augļu skaits katrai mātītei; nedzīvo implantējušos augļu skaits katrai mātītei; augļu svars;

— augstāk minēto datu summa par katru pārošanas periodu un devu, norādot dominanto letālo mutāciju biežumu;

— izmantotā statistiskā analīze un metodes.

Rezultātu iztirzājums

Secinājums.

LITERATŪRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Dzeltenais ķermenis: hormonus izdalošs veidojums, kas olnīcā izveidojies olšūnas pamesta folikula vietā. Dzelteno ķermeņu skaits olnīcās atbilst ovulējušo olšūnu skaitam.

Dominanta letāla mutācija: mutācija, kas notiek dīgļšūnā vai nostiprinās pēc apaugļošanās un izraisa embrija vai augļa nāvi.

Auglības koeficients: pāroto grūsno mātīšu skaits uz visu pāroto mātīšu skaitu.

Pārošanas intervāls: laiks starp ekspozīcijas beigām un apstrādātu tēviņu pārošanu. Kontrolējot šo intervālu, iespējams izvērtēt ķimikāliju ietekmi uz dažādu tipu dīgļšūnām. Pelēm, kuras pāro 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. un 8. nedēļā pēc ekspozīcijas beigām, tiek mērīta ietekme uz spermu, kondensētajiem spermatīdiem, apaļajiem spermatīdiem, pahitēnas spermatocītiem, agrīnajiem spermatocītiem, spermatogonijiem, kas diferencējušies, spermatogonijiem, kas diferencējas, un dīgļšūnu spermatogonijiem.

Pirmsimplantācijas zudums: dzelteno ķermeņu un implantējušos augļu skaita starpība. To var aplēst, arī salīdzinot kopējo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti devu grupās un kontroles grupās.

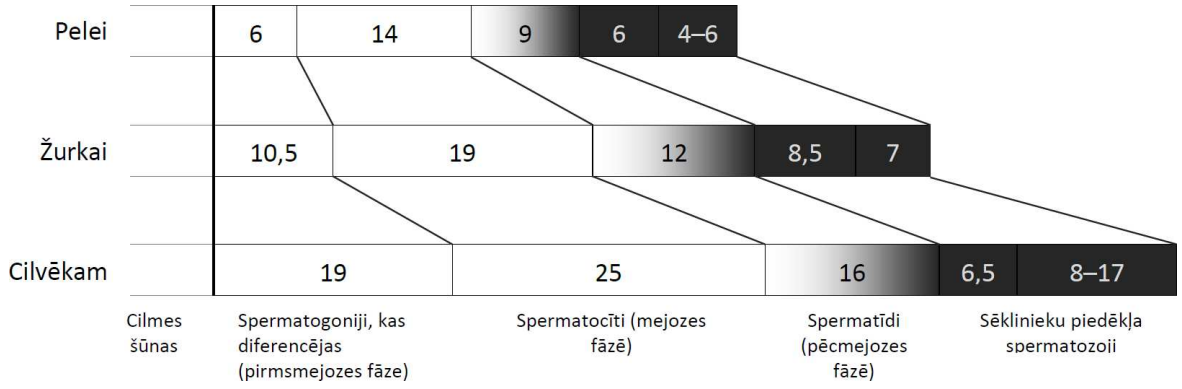
Pēcimplantācijas zudums: nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecība apstrādātajā grupā salīdzinājumā ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

2. papildinājums

ZĪDĪTĀJU SPERMATOGENĒZES LAIKI



1. attēls: Peļu, žurku un cilvēka vīrišķo dīgļšūnu attīstības ilguma (dienās) salīdzinājums. Ar ēnojumu iezīmētajos periodos nenotiek DNS reparācija.

Augstāk sniegts peļu, žurku un cilvēka spermatogenēzes shematisks attēls (avots *Adler*, 1996). Pie spermatogonijiem, kas diferencējušies, pieder: A atsevišķie; A sapārotie; A sarindotie spermatogoniji (*Hess and de Franca*, 2008). Par īstajām cilmes šūnām uzskata A atsevišķos spermatogonijus; tāpēc, lai novērtētu ietekmi uz cilmes šūnām, no testējamās ķimikālijas pēdējās injekcijas līdz pārošanai jāpaiet vismaz 49 dienām.

ATSAUCES

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

(4) Pielikuma B daļā B.23. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.23. **ZĪDĪTĀJU SPERMATOGONIJU HROMOSOMU ABERĀCIJU TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 483 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šis modificētais testēšanas metodes variants atspoguļo ilggadēju pieredzi šā testa veikšanā un šā testa potenciālu tikt integrētam vai kombinētam ar citiem toksiskuma vai genotoksicitātes pētījumiem. Ja toksiskumu testē kombinēti, iespējams būtiski samazināt testos izlietoto dzīvnieku skaitu. Šī testēšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).

2. Zīdītāju spermatogoniju hromosomu aberāciju *in vivo* testā nosaka vielas, kas zīdītāju spermatogonijos rada strukturālas hromosomu aberācijas (1) (2) (3) (4) (5). Dominanto letālo mutāciju tests genotoksicitātes novērtēšanai ir relevants arī tāpēc, ka dažādām sugām *in vivo* metabolisms, farmakokinētika un DNS reparācijas procesi gan var atšķirties, tomēr šie faktori ir aktīvi un piedalās atbildreakcijā. Šī testēšanas metode nav izstrādāta skaitlisku anomāliju mērīšanai; šo testu tam parasti neizmanto.

3. Šis tests mēra strukturālas hromosomu aberācijas (gan hromosomtipa, gan hromatīdtipa) spermatogoniju dīgļšūnu dalīšanās procesā un tātad gaidāms, ka tas spēj prognozēt pārmantojamu mutāciju inducēšanos šajās dīgļšūnās.

4. Galveno terminu definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Šajā testā parasti izmanto grauzējus, bet dažos gadījumos ir lietderīgi izmantot citas sugas, ja tas ir zinātniski pamatoti. Grauzēju sēklinieku citoģenētiskos standartpreparātos tiek ģenerēta mitotiska (spermatogoniji) un mejotiska (spermatocīti) metafāze. Balstoties uz hromosomu morfoloģiju, identificē mitotisko un mejotisko metafāzi (4). Šis citoģenētiskais i*n vivo* tests detektē strukturālas hromosomu aberācijas spermatogoniju mitozē. Šai metodei nav citu mērķšūnu.

6. Lai spermatogoniju šūnās varētu detektēt hromatīdtipa aberācijas, pirms nākamajās šūnu dalīšanās reizēs šīs aberācijas pārvēršas par hromosomtipa aberācijām, jāizpēta pirmā mitotiskā šūnu dalīšanās pēc apstrādes. Papildu informāciju par apstrādātiem spermatocītiem var iegūt, diakinēzes I metafāzē un II metafāzē attiecībā uz strukturālām aberācijām analizējot mejotiskas hromosomas.

7. Sēkliniekos atrodas vairāku paaudžu spermatogoniji (5), un šo dažādo tipu dīgļšūnām jutība pret apstrādi ar kādu ķimikāliju var izpausties individuālā diapazonā. Tātad detektētās aberācijas ir apstrādāto spermatogoniju šūnu populāciju agregēta atbildreakcija. Sēklinieku preparātos lielākā daļa mitotisko šūnu ir B spermatogoniji, kuriem šūnas cikls ir apmēram 26 h (3).

8. Ja ir pierādījumi, ka testējamā ķimikālija, tās metabolīts vai metabolīti sēkliniekos nenokļūs, šo testu izmantot nav lietderīgi.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

9. Dzīvniekus attiecīgā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķimikālijai un pēc apstrādes pienācīgā laikā eitanazē. Pirms eitanāzijas dzīvniekiem ievada metafāzi apturošu vielu (piem., kolhicīnu vai *Colcemid*®)). Tad no dzimumšūnām pagatavo hromosomu preparātus, ko iekrāso, un nosaka hromosomu aberācijas metafāzes šūnām.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

10. Šā testa izpildes kompetence būtu jāapliecina, pierādot spēju ar 1. tabulā norādītajām pozitīvajām kontrolvielām (arī ar tādām, uz kurām ir vāja atbildreakcija) reproducēt gaidāmo spermatogoniju strukturālo hromosomu aberāciju biežumu un iegūt tādu negatīvo kontroļu biežumu, kas atbilst pieņemtajam kontroldatu diapazonam publicētajā literatūrā (piem., (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) vai laboratorijas vēsturisko kontroļu sadalījumam, ja tāds ir.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

11. Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto peļu tēviņus; tomēr var izmantot citu attiecīgu zīdītāju sugu tēviņus, ja tas zinātniski pamatoti un lai būtu iespējams šā testa izpildi apvienot ar citu testēšanas metodi. Ja grauzēju vietā izmanto citas sugas, to izmantošana pārskatā zinātniski jāpamato.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

12. Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 %, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas uzturu ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Ja netiek gaidīts vai novērots, ka grauzēji izturēsies agresīvi, tos ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās (ne vairāk kā pa pieci), vēlams, būros ar cietu grīdu un attiecīgi bagātinātu vidi. Ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

13. Veselīgus jaunus pieaugušus tēviņus (devu došanas sākumā 8–12 nedēļas vecus) nejaušināti iedala kontroles grupās un grupās, kas saņem devas. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisko identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Nav pieļaujama pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas šķērskontaminēšanās. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas individuālajām atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 %.

Devu sagatavošana

14. Pirms dzīvniekiem dod devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē attiecīgos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno uzturam vai dzirdināmajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms devas došanas atšķaidīt. Inhalatīvas ekspozīcijas vajadzībām testējamās ķimikālijas atkarībā no fizikālķīmiskajām īpašībām var būt gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un ja vien no tiem neizriet pareizie glabāšanas nosacījumi, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testa apstākļi — šķīdinātājs/nesējs

15. Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms ieteicams izmantot šķīdinātājus vai nesējus uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē strukturālas hromosomu aberācijas un tam nav citādas kaitīgas ietekmes, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

Pozitīvās kontroles

16. Būtu vienmēr jāizmanto paralēlas pozitīvas kontroles dzīvnieki, ja vien laboratorija nav apliecinājusi kompetenci testa veikšanā un vēl nesen (piem., pēdējo piecu gadu laikā) testu izmantojusi regulāri. Ja nav paralēlas pozitīvas kontrolgrupas, katrā eksperimentā jāparedz novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi). To var panākt, pētījumā ar atzīmēm novērtējot arī attiecīgus etalonparaugus, kas saglabāti pēc iegūšanas kādā atsevišķā pozitīvās kontroles eksperimentā, ko testējošā laboratorija izdara regulāri (piem., ik 6–18 mēnešus), piem., kompetences testēšanā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

17. Pozitīvās kontroles vielām stabili jārada detektējams tādu šūnu biežuma pieaugums, kurās strukturālās hromosomu aberācijas pārsniedz spontāno līmeni. Pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr vērtētājam nebūtu uzreiz redzama kodēto paraugu identitāte. Pozitīvās kontroles vielu piemēri norādīti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles vielu piemēri

Vielas [*CAS* Nr.] (atsauces Nr.)
Ciklofosfamīds (monohidrāts) [*CAS* Nr. 50-18-0 (*CAS* Nr. 6055-19-2)] (9)
Streptonigrīns [*CAS* Nr. 108-91-8] (7)
Mitomicīns C [*CAS* Nr. 50-07-7] (6)
Monomērakrilamīds [*CAS* Nr. 79-06-1] (10)
Trietilēnmelamīns [*CAS* Nr. 51-18-3] (8)

Negatīvās kontroles

18. Katrā paraugošanas reizē jābūt arī negatīvās kontroles dzīvniekiem, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet pārējās darbības izdara tāpat kā ar grupām, kam dotas devas. Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītais šķīdinātājs/nesējs neierosina hromosomu aberācijas un tam nav citādas kaitīgas ietekmes, katrā paraugošanas reizē jābūt arī neapstrādātiem kontroldzīvniekiem, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesēju izmantot par kontrolvielu.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits

19. Pētījuma sākumā būtu jānosaka grupu lielums tā, lai katrā grupā būtu vismaz 5 tēviņi. Šādu dzīvnieku skaitu uzskata par pietiekamu adekvātas statistiskās jaudas nodrošināšanai (proti, lai parasti būtu iespējams ar 80 % varbūtību nozīmīguma līmenī 0,05 detektēt vismaz hromosomu aberāciju biežuma dubultošanos pie negatīvās kontroles līmeņa 1 % vai augstāka.) (3) (11). Orientējošs piemērs parastām prasībām attiecībā uz dzīvnieku maksimālo skaitu: pētījumā ar divām paraugošanas reizēm izmanto trīs devu grupas un paralēlu negatīvo kontrolgrupu, kā arī pozitīvo kontrolgrupu (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā); būtu nepieciešami 45 dzīvnieki.

Devu došanas grafiks

20. Testējamo ķimikāliju parasti dod vienreiz (proti, kā vienreizēju devu); var izmantot citus devu režīmus, ja vien tie ir zinātniski pamatoti.

21. No grupas, kurā pārbauda lielāko devu, paraugus pēc devas došanas ņem divās paraugošanas reizēs. Tā kā testējamās(-o) ķimikālijas(-u) uzņemšanai un metabolizēšanai, kā arī tās iedarbībai uz šūnas cikla kinētiku vajadzīgais laiks var ietekmēt hromosomu aberāciju noteikšanas optimālo laiku, ieteicama viena agrīna un viena vēla paraugošanas reize apmēram 24 un 28 stundas pēc devas došanas. Izņemot lielāko devu, paraugošanu ieteicams izdarīt agri, 24 stundas (par B spermatogonija šūnas cikla laiku īsāks vai ar to vienāds laiks, tāpēc optimizējas varbūtība, ka būs iespējams novērtēt pirmās pēcapstrādes metafāzes) pēc devas došanas, ja vien nav zināms cits, piemērotāks un pamatots paraugošanas laiks.

22. Var izmantot citus paraugošanas laikus. Piemēram, kas attiecas uz ķimikālijām, kuras rada no S neatkarīgu ietekmi, lietderīgs var būt agrāks paraugošanas laiks (t.i., agrāk nekā pēc 24 stundām).

23. Var izmantot tādu apstrādes režīmu ar atkārtotām devām, kāds rodas apvienojumā ar cita beigupunkta testu, kurā izmantots devu došanas periods 28 dienas (piem., TM B.58); tomēr, lai būtu iespējami atšķirīgi paraugošanas laiki, būtu vajadzīgas vēl citas dzīvnieku grupas. Tātad katrā gadījumā zinātniski jāpamato šāda grafika lietderība.

24. Pirms eitanazēšanas dzīvniekiem intraperitoniāli injicē attiecīgu devu metafāzi apturošas vielas (piem. *Colcemid*® vai kolhicīnu). Pēc tam ar attiecīgiem intervāliem no dzīvniekiem ņem paraugus. Pelēm un žurkām šis intervāls ir aptuveni 3 – 5 stundas.

Devu līmeņi

25. Ja veic iepriekšēju diapazona noteikšanas pētījumu, jo nav piemērotu datu, kas palīdzētu izraudzīties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un devu došanas režīmu, kas tiks izmantots galvenajā pētījumā, un ievērojot ieteikumus par devu diapazona noteikšanas pētījumu izpildi (12). Šajā pētījumā būtu jāorientējas uz maksimālās panesamās devas (*MTD*) apzināšanu; *MTD* definē kā devu, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā izraisa nelielu toksisku ietekmi (piem., anormāla izturēšanās vai reakcijas, neliels ķermeņa masas samazinājums vai citotoksicitāte hematopoētiskajā sistēmā), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ dzīvnieki būtu jāeitanazē (13).

26. Augstāko devu var definēt arī kā devu, kura kaut kādā veidā liecina par toksiskumu spermatogoniju šūnām (piem., samazinās spermatogoniju mitožu attiecība pret pirmo un otro mejotisko metafāzi). Šim samazinājumam nevajadzētu pārsniegt 50 %.

27. Testējamās ķimikālijas, kuras zemā netoksiskā devā iedarbojas bioloģiski specifiski (tādas kā hormoni un mitogēni), un ķimikālijas, kurām ir ļoti izteiktas toksikokinētiskās īpašības, var būt šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi un tātad attiecībā uz devām var būt jānovērtē atsevišķi.

28. Lai iegūtu informāciju par atbildreakciju uz devu, pilnīgā pētījumā jābūt negatīvai kontrolgrupai (18. punkts) un vismaz trijiem devu līmeņiem, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja diapazona noteikšanas pētījumā testējamā ķimikālija toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2 000 mg uz kg ķermeņa masas. Ja testējamai ķimikālijai toksiskums tomēr izpaužas, *MTD* jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons no maksimālās devas līdz devai, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (t.i., sēkliniekiem), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķimikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var būt mainīgas. Ja testējamā ķimikālija rada toksicitāti, būtu jāizraugās robeždeva plus divas zemākas devas (kā aprakstīts iepriekš). Robeždeva devu došanas periodam 14 dienas vai vairāk ir 1 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā, bet devu došanas periodiem, kas nesasniedz 14 dienas, — 2 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā.

Devu došana

29. Testi jāplāno, ņemot vērā iespējamo cilvēka ekspozīcijas ceļu. Tāpēc kā pamatotus var izvēlēties tādus ekspozīcijas ceļus kā, piem., ar uzturu, ar dzirdināmo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, perorālu uzņemšanu (ar gavāžu), inhalāciju vai implantāciju. Jebkurā gadījumā ceļš jāizraugās tā, lai mērķaudiem nodrošinātu pietiekamu ekspozīciju. Ja vien intraperitoneāla injekcija nav zinātniski pamatota, tā parasti nav ieteicama, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs. Ja testējamo ķimikāliju piejauc barībai vai dzirdināmam ūdenim, jo īpaši vienreizējas devas gadījumā, jāgādā, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 33. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot ūdens šķīdumus, kuru gadījumā var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Ja izmanto lielāku tilpumu (ja dzīvnieku labturības tiesību akti to atļauj), tas jāpamato. Testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa masu saglabātos konstanta.

Novērojumi

30. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā, kurā periodā pēc devu došanas gaidāms ietekmju maksimums, testa dzīvniekiem jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra barības patēriņš. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieks toksiskums, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (13).

Hromosomu preparātu sagatavošana

31. Tūlīt pēc eitanazēšanas no viena vai abiem sēkliniekiem iegūst dīgļšūnu suspensijas, ko apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē saskaņā ar vispārpieņemtiem protokoliem (piem., (2) (14) (15)). Šūnas pēc tam uzklāj uz priekšmetstikliņiem un krāso (16) (17). Visi priekšmetstikliņi būtu jāapzīmē ar kodu, lai vērtētājam nebūtu pieejama to identitāte.

Analīze

32. Par katru dzīvnieku būtu jāsaskaita vismaz 200 izteikti izplatījušos metafāžu (3) (11). Ja vēsturiskās negatīvās kontroles biežums ir < 1 %, statistiskās jaudas palielināšanai novērtēšanā par vienu dzīvnieku būtu jānovērtē vairāk nekā 200 šūnu (3). Būtu jāizmanto krāsošanas paņēmieni, ar kuriem iespējams identificēt centromēru.

33. Hromatīdtipa un hromosomtipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē pa apakštipiem (pārrāvumi, apmaiņas). Pārtraukumi būtu jāatspoguļo ziņojumā, bet nebūtu jāņem vērā, nosakot, vai kāda ķimikālija būtiski palielina tādu šūnu incidenci, kurām vērojamas hromosomu aberācijas. Laboratorijā izmantojamām procedūrām būtu jānodrošina, ka hromosomu aberācijas analizē labi apmācīti vērtētāji. Apzinoties, ka priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā daļa metafāzes šūnu bieži vien tiek bojātas un hromosomas zaudē, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vismaz $2n \pm 2$, kur n ir attiecīgās sugas haploidālais hromosomu skaits.

34. Testa nolūks gan ir detektēt strukturālas hromosomu aberācijas, tomēr, ja novēro tādus notikumus kā poliploidālas šūnas vai šūnas ar endoreduplicētām hromosomām, arī to biežumu ir svarīgi atspoguļot (sk. 44. punktu.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

35. Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulas veidā. Katram dzīvniekam nosaka šūnu skaitu, kurās ir strukturālas hromosomu aberācijas, kā arī hromosomu aberāciju skaitu uz vienu šūnu. Hromatīdtipa un hromosomtipa aberācijas, kas klasificētas pēc apakštipa (pārrāvumi, apmaiņas) sarakstā jānorāda atsevišķi, minot skaitu un biežumu eksperimenta grupās un kontrolgrupās. Atsevišķi dokumentē pārtraukumus. Ziņojumā pārtraukumu biežumu atspoguļo, tomēr strukturālo aberāciju kopējā biežuma analīzē to parasti neiekļauj. Ziņojumā atspoguļo gan poliploīdijas, gan/vai to šūnu īpatsvaru, kam ir endoreduplicētas hromosomas, ja šādas parādības ir.

36. Pārskatā jāatspoguļo 30. punktā minētie toksiskuma un klīnisko pazīmju dati.

Pieņemamības kritēriji

37. Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

— paralēlā negatīvā kontrole atbilst publicētajām normām, kas attiecas uz vēsturisko negatīvo kontroļu datiem (parasti gaida, ka hromosomu aberācijas būs vērojamas > 0 % un ≤ 1,5 % šūnu) un laboratorijas vēsturiskajiem kontroļu datiem (sk. 10. un 18. punktu).

— paralēlās pozitīvās kontrolēs inducētā reakcija atbilst publicētajām vēsturisko pozitīvo kontroļu datu normām vai laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzei, ja tāda ir, un salīdzinājumā ar negatīvajām kontrolēm ir iegūts statistiski būtisks palielinājums (sk. 17. un 18. punktu);

— ir izanalizēts pietiekams šūnu un devu skaits (sk. 28. punktu un 32. punktu).

— maksimālās devas izraudzīšanās kritēriji atbilst 25. un 26. punktā aprakstītajiem.

38. Ja novēro gan mitozi, gan mejozi, par citotoksicitātes mēru visiem devu saņēmušajiem un negatīvās kontroles dzīvniekiem būtu jāizraugās spermatogoniju mitožu attiecība pret pirmo un otro mejotisko metafāzi apkopotā paraugā, kas ir 100 dalošās šūnas uz katru dzīvnieku. Ja novēro tikai mitozi, katram dzīvniekam nosaka mitotisko indeksu vismaz 1 000 šūnām.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

39. Lai iegūtu devas un atbildreakcijas izanalizēšanai pietiekamus datus, jāizanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas.

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

— vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— vismaz vienā paraugošanas reizē palielinājums ir devatkarīgs un

— kāds no šiem rezultātiem ir ārpus pieņemamā negatīvo kontroļu datu diapazona vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā), ja tādas ir.

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku spermatogoniju šūnās spēj inducēt hromosomu aberācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (11) (18). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

41. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

— ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— ne ar vienu no eksperimenta nosacījumiem nav novērojams ar devu saistīts palielinājums un

— visi rezultāti ir pieņemamajā negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu (ja tādi pieejami) diapazonā (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā).

Testējamo ķimikāliju šajā testa sistēmā tad uzskata par nespējīgu inducēt hromosomu aberācijas kultivētās zīdītāju šūnās. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (11) (18). Negatīvs rezultāts neizslēdz iespējamību, ka ķimikālija varbūt inducē hromosomu aberācijas vēlākās, nepētītās ontoģenēzes fāzēs vai gēnu mutācijas.

42. Nepārprotami pozitīva vai nepārprotami negatīva atbildreakcija nav jāverificē.

43. Ja atbildreakcija nav nepārprotami negatīva vai pozitīva un lai varētu vieglāk noskaidrot kāda rezultāta bioloģisko nozīmīgumu (piem., neizteikts palielinājums vai robežgadījums), dati būtu jāizvērtē, izmantojot ekspertu slēdzienus un/vai tālāku izmeklēšanu, kurā izmanto jau esošos eksperimentu datus, piem., jāapsver, vai pozitīvais rezultāts ir ārpus negatīvās kontroles datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu pieņemamības diapazona (19).

44. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, vai testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka rezultāti ir neskaidri.

45. Poliploidālo šūnu skaita palielināšanās var norādīt, ka testējamai ķimikālijai ir potenciāls inhibēt mitotiskos procesus un inducēt skaitliskas hromosomu aberācijas (20). Ja palielinās tādu šūnu skaits, kam ir endoreduplicētas hromosomas, tas var liecināt, ka testējamajai ķimikālijai ir potenciāls inhibēt šūnu cikla norisi (21) (22); tas ir vēl cits, no mitotisku procesu inhibēšanas atšķirīgs mehānisms, kā hromosomās tiek inducētas skaitliskas pārmaiņas (sk. 2. punktu). Tāpēc poliploidālo šūnu incidence un tādu šūnu incidence, kam ir endoreduplicētas hromosomas, jādokumentē atsevišķi.

Testēšanas pārskats

46. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un sastāvdaļu relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— nesēja izraudzīšanās pamatojums;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā;

— barības, dzirdināmā ūdens vai inhalācijas preparātu sagatavošana;

— preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tāda veikta.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums;

— dzīvnieku skaits un vecums;

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;

— dzīvnieku unikālās identificēšanas metode;

— īslaicīgiem pētījumiem: dzīvnieku individuālā masa testa sākumā un beigās; par nedēļu ilgākiem pētījumiem: individuālā masa pētījuma laikā un barības patēriņš. Norāda katras grupas dzīvnieku ķermeņa masas diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas nosacījumi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati;

— diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts;

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums;

— ievadīšanas ceļa izraudzīšanās pamatojums;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu;

— nonāvēšanas laika pamatojums;

— metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksiskumu dzīvniekiem, ja tādas ir, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums;

— ja rezultāti ir negatīvi, ar kādām metodēm verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē;

— faktiskā deva (mg uz kg ķermeņa masas dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā);

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti;

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izraudzīšanās pamatojums;

— eitanāzijas metode;

— atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota);

— audu izolēšanas procedūras;

— metafāzes apturēšanai izmantojamās ķimikālijas identifikācija, tās koncentrācija un apstrādes ilgums;

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes;

— aberāciju atzīmju kritēriji;

— analizēto šūnu skaits uz vienu dzīvnieku;

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti

— dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksiskuma pazīmes;

— ķermeņa un orgānu masa nonāvēšanas brīdī (ja devas dotas vairākreiz, ķermeņa masas fiksējumi devu došanas režīma laikā);

— toksiskuma pazīmes;

— mitotiskais indekss;

— spermatogoniju šūnu mitožu attiecība pret pirmo un otro mejotisko metafāzi vai citas mērķaudos vērojamas liecības par eksponētību;

— aberāciju veids un skaits, ko norāda katram dzīvniekam atsevišķi;

— kopējais aberāciju skaits katrā grupā, vidējās vērtības un standartnovirzes;

— to šūnu skaits katrā grupā, kam ir aberācijas, vidējās vērtības un standartnovirzes;

— ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība;

— izmantotā statistiskā analīze un metodes;

— līdztekus veiktās negatīvās kontroles dati;

— vēsturiskie negatīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām, standartonovirzēm un ticamības intervālu 95 % (kur tādi pieejami) vai publicētie vēsturiskie negatīvo kontroļu dati, kurus izmanto attiecībā uz šā testa rezultātu pieņemamību;

— paralēlās pozitīvās kontroles dati;

— ploīdijas pārmaiņas, ja tādas tiek novērotas, arī poliploidālo un/vai endoreduplicēto šūnu biežums.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(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. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413. (4) Pielikuma B daļā B.23. nodaļu aizstāj ar šādu:

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: novirze no normālā diploidālā (vai haploidālā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Centromēra: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Hromosomu daudzveidība: hromosomu formu (piem., metacentriskas, akrocentriskas u. tml.) un lielumu daudzveidība.

Hromatīdtipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošanās.

Hromosomtipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošanās vienā un tajā pašā vietā.

Klastogēns: jebkura ķimikālija, kas izraisa strukturālas hromosomālas aberācijas šūnu vai organismu populācijās.

Pārtraukums: ahromatisks bojājums, kas mazāks par vienas hromatīdas platumu un saistīts ar ļoti nelielu hromatīdisku nobīdi.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, arī pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un sasaistes, pārkārtojumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskais indekss (MI): metafāzē esošu šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu populācijā; raksturo attiecīgās populācijas proliferācijas pakāpi.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Skaitliska anomālija: testam izmantojamajiem dzīvniekiem raksturīgā parastā hromosomu skaita pārmaiņas.

Poliploīdija: haploidālā hromosomu skaita (*n*) daudzkārtnis (t.i., 3*n*, 4*n* utt.), izņemot diploidālo skaitu.

Strukturālas pārmaiņas: hromosomas struktūras pārmaiņas, kas detektējamas, ar mikroskopu apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: Ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli"

(5) Pielikuma B daļā B.40. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.40. **ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: TRANSKUTĀNĀS ELEKTRISKĀS PRETESTĪBAS (TEP) TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 430 (2015) aprakstītajam. Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķimikālija [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1])]. Šajā atjauninātajā testēšanas metodē B.40 aprakstīta *in vitro* procedūra, kas dod iespēju saskaņā ar ANO *GHS* (1) un ar *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas.

2. Kodīgumu ādai parasti novērtē, izmantojot laboratorijas dzīvniekus (TM B.4, kas ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404, kura sākotnēji pieņemta 1981. gadā un pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā) (2). Papildus pašreizējai testēšanas metodei B.40, attiecībā uz to, kā testēt ķimikāliju potenciālu izraisīt ādas koroziju, validētas un kā TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* 431) (3) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* 435) (4) pieņemtas ir citas *in vitro* testēšanas metodes, ar kurām vajadzības gadījumā iespējams arī identificēt kodīgu ķimikāliju apakškategorijas. Vairākas tādas *in vitro* testēšanas metodes kā TM B.56 (ekvivalenta ESAO *TG* 439 (5)) ir pieņemtas izmantošanai ādas kairinājuma testēšanā. ESAO norādījumu dokuments par Integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu apraksta vairākus moduļus, kādos grupēti informācijas avoti un analīzes instrumenti, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (6).

3. Šis testēšanas metodes apraksts pievēršas tādam cilvēkveselības beigupunktam kā ādas korozija. Metodes pamatā ir žurkas ādas transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests, kurā, izmantojot ādas diskus, kodīgas vielas tiek atpazītas pēc to spējas izraisīt *stratum corneum* normālā veseluma un barjerfunkcijas zudumu. Attiecīgā ESAO testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2004. gadā un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu.

4. Lai izvērtētu regulatīvām vajadzībām veiktu ādas korozijas testēšanu *in vitro*, tika izdarīti pirmsvalidācijas pētījumi (7), pēc kuriem tika veikts oficiāls validācijas pētījums attiecībā uz tādu žurkas ādas TEP testēšanas metodi, ar ko novērtē kodīgumu ādai (8) (9) (10) (11). Šo pētījumu iznākums bija ieteikums TEP testēšanas metodi (kas ir noteikta par validēto references metodi, VRM) izmantot regulatīvām vajadzībām kodīguma ādai novērtēšanā *in vivo* (12) (13 (14).

5. Pirms kādu piedāvātu līdzīgu vai modificētu *in vitro* TEP testēšanas metodi, kas nav VRM, attiecībā uz ādas koroziju iespējams izmantot regulatīvām vajadzībām, saskaņā ar veiktspējas standartu (*PS*) (15) prasībām būtu jānosaka tās ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tās līdzību VRM. ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, kad jebkāda jauna ierosināta vai atjaunināta VS atbilstoša testēšanas metode būs pārskatīta un iekļauta attiecīgajā ESAO testēšanas vadlīnijā.

DEFINĪCIJAS

6. Izmantotās definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Validācijas pētījums (10) un citi publicēti pētījumi (16) (17) liecina, ka žurkas ādas TEP testēšanas metode spēj ādai kodīgas un nekodīgas vielas 122 vielu datubāzē atšķirt ar kopējo jutību 94 % (51/54) un specifiskumu 71 % (48/68).

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

8. Šī testēšanas metode attiecas uz ādas koroziju *in vitro*. Ar tās palīdzību iespējams saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas testējamās ķimikālijas. Kā pierāda validācijas pētījumi (8) (9) (10) (11), viens šīs testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka ar to nav iespējams kodīgas vielas un maisījumus sadalīt apakškategorijās atbilstoši ANO *GHS* vai *CLP*. Tāpēc šīs testēšanas metodes izmantošanas veids būs atkarīgs no piemērojamā tiesiskā regulējuma. Šī testēšanas metode gan pietiekami neinformē par ādas kairinājumu, taču jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums īpaši pievēršas TM B.46. Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (*IATA*) (6).

9. Validēšanā, kas ir pamatā šai testēšanas metodei, testēts daudz dažādu ķimikāliju, galvenokārt vielu, un validācijas pētījuma empīriskajā datubāzē bija pat 60 vielas, kas aptver daždažādas ķimikāliju klases (8)(9). Raugoties pēc kopējiem datiem, kas pieejami, šī testēšanas metode ir piemērojama plašam ķimikāliju klašu un agregātstāvokļu klāstam, ieskaitot šķidrumus, puscietas un cietas vielas, kā arī vaskus. Tomēr, tā kā attiecībā uz specifiskiem agregātstāvokļiem testējami objekti ar piemērotiem atsauces datiem nav viegli pieejami, jānorāda, ka validēšanā tikuši novērtēti samērā nedaudzi vaski un kodīgas cietas vielas. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja pierādījumi liecina, ka šī testēšanas metode kādai konkrētai vielu kategorijai nav izmantojama, to attiecībā uz konkrēto minēto kategoriju neizmanto. Turklāt, balstoties uz šīs testēšanas metodes izmantojamību attiecībā uz vielām, tiek uzskatīts, ka tā izmantojama arī attiecībā uz maisījumiem. Tomēr maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāvu spektru un patlaban par maisījumu testēšanu sevišķi daudz informācijas nav pieejams, tāpēc, ja var pierādīt, ka kādai konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, ko piedāvā *Eskes* u. c., 2012. g.) (18) attiecīgā testēšanas metode nav izmantojama, šo testēšanas metodi šai konkrētajai maisījumu kategorijai nevajag izmantot. Pirms attiecībā uz maisījumu izmanto šo testēšanas metodi, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Validācijas pētījumos vēl nav vērtētas gāzes un aerosoli (8) (9). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar TEP tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

TESTA PRINCIPS

10. Testēšanas sistēmā ar diviem nodalījumiem, kurus vienu no otra nodala ādas diski, testējamo vielu uz laiku līdz 24 stundām aplicē šo ādas disku epidermālajai virsmai. Ādas diskus ņem no humāni nonāvētām 28–30 dienas vecām žurkām. Kodīgas ķimikālijas identificē pēc to spējas izraisīt *stratum corneum* normālā veseluma un barjerfunkcijas zudumu, ko mēra kā TEP pazemināšanos zem sliekšņlīmeņa (16) (sk. 32. punktu). Žurkas ādas TEP vajadzībām ir izraudzīta robežvērtība 5kΩ, balstoties uz plašiem datiem par lielu ķīmisko vielu klāstu, kur lielākā daļa vērtību nepārprotami bijusi vai nu par šo vērtību krietni augstāka (bieži vien > 10 kΩ), vai krietni zemāka (parasti < 3 kΩΩ) (16). Testējamās ķimikālijas, kas dzīvniekiem nerada ādas koroziju, bet ir vai nav kairinošas, TEP vērtību parasti nepazemina zemāk par šo robežvērtību. Bez tam, ja izmanto citus ādas preparātus vai citu aparatūru, robežvērtība var mainīties, tāpēc var būt vajadzīga papildu validācija.

11. Testēšanas procedūrā, ar ko apstiprinoši testē pozitīvus TEP rezultātus, ieskaitot vērtības apΩ, tiek iekļauts krāsvielas saistīšanas solis. Krāsvielas saistīšanas solī tiek noteikts, vai jonu caurlaidības palielinājumu izraisījusi fiziska *stratum corneum* noārdīšanās. Ir apliecināts, ka TEP metode, kurā izmanto žurkas ādu, spēj prognozēt kodīgumu B.4. testēšanas metodē, ko *in vivo* īsteno ar trušiem (2).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

12. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo žurkas ādas TEP testēšanas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām būtu jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 1. tabulā ieteiktās standartvielas. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (16)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

1. tabula

Standartvielu ([1]) saraksts

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([2])	ANO *GHS*/*CLP* Kategorijas, kuru pamatā ir *in vivo* rezultāti ([3])	VRM Kategorijas, kuru pamatā ir *in vitro* rezultāti	Agregātstāvoklis	pH ([4])
In vivo kodīgas vielas						
N,*N*'-dimetil dipropilēntriamīns	10563-29-8	organiska bāze	1.A	6 × K	Š	8,3
1,2-diaminopropāns	78-90-0	organiska bāze	1.A	6 × K	Š	8,3
sērskābe (10 %)	7664-93-9	neorganiska skābe	(1.A/)1.B/1.C	5 × K 1 × NK	Š	1,2
kālija hidroksīds (10 % ūd.)	1310-58-3	neorganiska bāze	(1.A/)1.B/1.C	6 × K	Š	13,2
oktānskābe (kaprilskābe)	124-07-2	organiska skābe	2.B/1.C	4 × K 2 × NK	Š	3,6
2-*terc*-butilfenols	88-18-6	fenols	2.B/1.C	4 × K 2 × NK	Š	3,9
In vivo nekodīgas vielas						
izostearīnskābe	2724-58-5	organiska skābe	NK:	6 × NK	Š	3,6
4-amino-1,2,4-triazols	584-13-4	organiska bāze	NK	6 × NK	KV	5,5
fenetilbromīds	103-63-9	elektrofīla viela	NK	6 × NK	Š	3,6
4-(metiltio)-benzaldehīds	3446-89-7	elektrofīla viela	NK	6 × NK	Š	6,8
1,9-dekadiēns	1647-16-1	neitrāla organiska viela	NK	6 × NK	Š	3,9
tetrahloretilēns	127-18-4	neitrāla organiska viela	NK	6 × NK	Š	4,5

Saīsinājumi: aq = uz ūdens bāzes; *CAS* Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs; VRM = validēta references metode; K = kodīga; NK = nekodīga.

([1]) Standartvielas tika izraudzītas no vielām, kuras izmantotas žurkas ādas TEP testēšanas metodes *ECVAM* validācijas pētījumā, un šeit ir sagrupētas vispirms kodīgās un nekodīgās vielās, pēc tam pa kodīguma apakškategorijām un tad pa ķimikāliju klasēm (8) (9). Ja nav norādīts citādi, vielas testētas tīrības līmenī, kāds bijis pirkumā no komerciāla piegādātāja (8). Izlasē, cik vien iespējams, ietvertas vielas, kas: i) ir reprezentatīvas attiecībā uz tādu kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas; vāji līdz stipri kodīgas), ko iespējams mērīt vai prognozēt ar VRM; ii) ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas pētījumā izmantotajām ķimikāliju klasēm; iii) atspoguļo VRM veiktspējas raksturlielumus; iv) ir ar labi definētu ķīmisku struktūru; v) ar *in vivo* testēšanas references metodi inducē skaidrus rezultātus; vi) ir komerciāli pieejamas; un vii) nav saistītas ar augstām likvidēšanas izmaksām.

([2]) Ķimikāliju klase, ko piešķīruši *Barratt et al.* (8).

([3]) ANO *GHS*/*CLP* 1.A, 1.B un 1.C kategorijai attiecīgās ANO iepakojuma grupas ir I, II un III.

([4]) pH vērtības iegūtas no *Fentem et al.* (9) un *Barratt et al.* (8).

PROCEDŪRA

13. Uz žurkas ādas TEP balstītās ādas korozijas testēšanas metodes sakarā ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*) (19). Šīs testēšanas metodes aptvertajām uz žurkas ādas TEP ādas balstītajām korozijas testēšanas metodēm būtu jāatbilst šādiem nosacījumiem:

Dzīvnieki

14. Būtu jāizmanto žurka, jo tās ādas jutība pret vielām šajā testēšanas metodē ir jau iepriekš pierādīta (10) un žurka ir vienīgais oficiāli validētais ādas avots (8) (9). Sevišķi liela nozīme ir žurku vecumam (laikā, kad ņem ādu) un līnijai, lai būtu droši, ka apmatojuma folikulas ir snaudas fāzē, kāda ir pirms pieauguša dzīvnieka apmatojuma augšanas sākšanās.

15. Jauniem, apmēram 22 dienas veciem (atvasināti no *Wistar* vai līdzīga līnija) žurku vīrišķā vai sievišķā dzimuma īpatņiem uzmanīgi nocērp muguras un sānu apmatojumu. Pēc tam dzīvniekus, rūpīgi slaukot, mazgā, cirpto vietu iemērcot antibiotiku šķīdumā (kas satur, piemēram, streptomicīnu, penicilīnu, hloramfenikolu un amfotericīnu koncentrācijā, kura iedarbīgi inhibē baktēriju augšanu). Trešajā vai ceturtajā dienā pēc pirmās mazgāšanas dzīvniekus atkal mazgā ar antibiotikām, un tos izmanto triju dienu laikā pēc otrās mazgāšanas, kad pēc apmatojuma noņemšanas *stratum corneum* ir atjaunojies.

Ādas disku preparātu sagatavošana

16. 28–30 dienu vecumā dzīvniekus humāni nonāvē; vecums ir kritiski svarīgs. Tad ņem katra dzīvnieka muguras un sānu ādu, no kuras atdala zemādas taukus, tos uzmanīgi atslāņojot. Izgriež ādas diskus ar diametru apm. 20 mm. Ja pierādīts, ka pozitīvo un negatīvo kontroļu dati ir līdzvērtīgi datiem, kas iegūti, izmantojot svaigu ādu, āda var būt glabāta līdz disku izmantošanas brīdim.

17. Ādas disku novieto uz viena PTFE (politetrafluoretilēna) caurulītes gala tā, lai epidermālā virsma būtu kontaktā ar caurulīti. Pāri caurulītes galam ādas fiksēšanai uzmauc gumijas gredzenu, liekos audus nogriež. Pēc tam gumijas gredzena piestiprinājuma vietu PTFE caurulītei hermetizē, rūpīgi apziežot ar vazelīnu. Caurulīti ar atsperīgu spaili nostiprina receptora kamerā, kurā ir $MgSO_4$ šķīdums (154 mM) (1. attēls). Ādas diskam jābūt pilnīgi iegremdētam $MgSO_4$ šķīdumā. No vienas žurkas ādas var iegūt 10–15 diskus. Caurulītes un gredzena izmēri norādīti 2. attēlā.

18. Pirms sākt testēšanu, katra dzīvnieka ādai izdara kvalitātes kontroles procedūru, proti, izmēra divu ādas disku TEP. Lai pārējos diskus varētu izmantot testēšanas metodes vajadzībām, abu disku pretestībai jāpārsniedz 10 kΩ. Ja pretestība nesasniedz 10 kΩ, šīs ādas diski nav derīgi.

Testējamās ķimikālijas un kontrolvielu aplicēšana

19. Katrā izpildes reizē (eksperimentā) jāizmanto paralēlas pozitīvas un negatīvas kontroles, lai būtu nodrošināta adekvāta eksperimenta modeļa veiktspēja. Katrā izpildes reizē (eksperimentā) jāizmanto tikai viena dzīvnieka ādas diski. Pozitīvai un negatīvai kontrolei ieteicams izmantot attiecīgi 10 M sālsskābes un ūdens.

20. Šķidras testējamās vielas (150 µl) vienmērīgi aplicē uz epidermālās virsmas caurulītes iekšpusē. Testējot cietus materiālus, uz diska vienmērīgi aplicē tikdaudz cietās vielas, lai visa epidermālā virsma būtu pārklāta. Uz cietās vielas virsmas pievieno dejonizētu ūdeni (150µl) un cauruli viegli sakrata. Lai panāktu maksimālu saskari ar ādu, cietas vielas var būt jāuzsilda līdz 30 ° C, lai testējamo ķimikāliju izkausētu, padarītu mīkstāku vai sasmalcinātu, iegūstot granulveida vai pulverveida materiālu.

21. Katrai testējamai ķimikālijai un kontrolķimikālijai katrā testa izpildes reizē (eksperimentā) izmanto trijus ādas diskus. Testējamās ķimikālijas aplicē uz 24 stundām 20–23 °C temperatūrā. Testējamo ķimikāliju noņem ar ūdensvada ūdens strūklu, kura temperatūra nepārsniedz istabas temperatūru, skalošanu beidzot, kad vairāk materiāla nav noņemams.

TEP mērīšana

22. Ādas pretestību mēra kā TEP, izmantojot Vitstona tiltu zemsprieguma maiņstrāvas režīmā (18). Tilta vispārīgie parametri ir darba spriegums 1–3 V, sinusoīdas veida vai taisnstūrveida maiņstrāva ar frekvenci 50–1 000 Hz un mērījumu diapazons vismaz 0,1–30 kΩ. Ar validēšanai izmantoto mērtiltu virknes vai paralēlajā slēgumā tika mērīta induktivitāte, kapacitāte un pretestība attiecīgi līdz 2 000 H, 2 000 μF un 2 MΩ pie frekvences 100 Hz vai 1 kHz. TEP kodīguma testa vajadzībām mērījumi tiek atspoguļoti virknes slēgumam kā pretestība pie frekvences 100 Hz. Pirms elektriskās pretestības mērīšanas samazina ādas virsmas spraigumu, pievienojot tādu tilpumu 70 % etanola, lai būtu pārklāta epiderma. Pēc dažām sekundēm etanolu no caurulītes izlej un audus hidratē, pievienojot 3 ml $MgSO_4$ šķīduma (154 mM). Mērtilta elektrodus novieto abās ādas diska pusēs, lai izmērītu ādas disku pretestību kΩ (1. attēls). Elektroda izmēri un elektroda daļas garums zem turētāja spailes aplūkojami 2. attēlā. Iekšējā elektroda turētāja spaile pretestības mērīšanas laikā balstās uz PTFE caurules, lai nodrošinātu, ka $MgSO_4$ šķīdumā pastāvīgi ir iegremdēts vienāds elektroda garums. Ārējais elektrods receptora kamerā tiek ievietots tādā veidā, ka elektrods balstās pret kameras dibenu. Attālums starp atsperes spaili un PTFE caurulītes apakšu nedrīkst mainīties (2. attēls), jo šis attālums ietekmē iegūto pretestības vērtību. Tātad attālumam starp iekšējo elektrodu un ādas disku jābūt nemainīgam un iespējami mazam (1–2 mm).

23. Par 20 kΩ augstāku izmērītās pretestības vērtību var radīt arī uz ādas diska epidermālās virsmas palikušas testējamās ķimikālijas paliekas. Šo pārklājumu pilnīgāk likvidēt var mēģināt, piemēram, PTFE caurulīti hermētiski aizspiežot ar cimdotu īkšķi un apm. 10 sekundes pakratot; $MgSo_4$ šķīdumu izlej un pretestības mērīšanu atkārto ar svaigu $MgSO_4$ šķīdumu.

24. Iegūtās TEP vērtības var būt ietekmējuši testēšanai izmantotās aparatūras raksturlielumi, izmēri un eksperimenta procedūra. Kodīguma slieksnis 5 kΩ atvasināts, izmantojot datus, kas iegūti ar šajā metodes aprakstā norādīto specifisko aparatūru un procedūru. Ja tiek grozīti testēšanas nosacījumi vai ja izmanto citu aparatūru, var būt piemērojamas citas sliekšņvērtības un kontrolvērtības. Tādējādi metodika un pretestības sliekšņvērtības jākalibrē, testējot virkni standartvielu, kuras izraugās no validācijas pētījumā izmantoto vielu klāsta (8) (9) vai pētāmajām vielām līdzīgu ķimikāliju klašu vielām. Piemērotu standartvielu komplekss ir norādīts 1. tabulā.

Krāsvielu saistīšanas metodes

25. Saskarē ar noteiktiem nekodīgiem materiāliem pretestība var samazināties zem robežvērtības 5 kΩ, paverot iespēju joniem izkļūt caur *stratum corneum* un vēl samazinot elektrisko pretestību (9). Piemēram, neitrālas organiskās vielas un virsmaktīvas vielas (deterģenti, emulgatori u. c.) var noņemt ādas lipīdus, palielinot membrānas joncaurlaidību. Tāpēc, ja ar šādām ķimikālijām iegūtās TEP vērtības ir apmēram 5 kΩ vai mazākas, bet saskatāma ādas bojājuma nav, kontrolaudiem un apstrādātajiem audiem jānoteic krāsvielas penetrācija, lai noskaidrotu, vai iegūtās TEP vērtības ir ādas caurlaidības paaugstināšanās vai ādas korozijas rezultāts (7) (9). Pēdējā gadījumā, ja ir *stratum corneum* pārrāvumi, audu slāni zem ādas virsmas ātri penetrē un nokrāso uz tās aplicēta krāsviela sulforodamīns B. Minētā krāsviela ir stabila pret ļoti daudzu ķīmisko vielu iedarbību, kā arī ir stabila turpmāk aprakstītajā ekstrakcijas procedūrā.

Krāsvielas sulforodamīna B aplicēšana un noņemšana

26. Pēc TEP noteikšanas magnija sulfāta šķīdumu no caurulītes izlej un uzmanīgi apskatās, vai ādai nav acīmredzamu bojājumu. Ja acīmredzama liela bojājuma (piem., perforācijas) nav, katra ādas diska epidermālajai virsmai uz divām stundām aplicē 150 μl 10 % (masa/tilp.) krāsvielas sulfurodamīna (skābais sarkanais 52; *C.I.* 45100; *CAS* numurs 3520-42-1) šķīduma destilētā ūdenī. Lai visu lieko/nesaistīto krāsvielu noņemtu, ādas diskus pēc tam apmēram 10 sekundes skalo ar ūdensvada ūdeni, kura temperatūra nepārsniedz istabas temperatūru.

Katru ādas disku no PTFE caurulītes piesardzīgi izņem un ievieto mēģenē (piemēram, 20 ml stikla scintilācijas mēģenē) ar dejonizētu ūdeni (8 ml). Mēģenes uzmanīgi 5 minūtes krata, lai noņemtu vēl jebkādu nesaistītu krāsvielu. Pēc tam skalošanas procedūru atkārto, tad ādas diskus izņem un ievieto mēģenēs ar 5 ml nātrija dodecilsulfāta (NDS) 30 % šķīdumu destilētā ūdenī un 60 °C temperatūrā inkubē līdz nākamajai dienai.

27. Pēc inkubācijas visus ādas diskus izņem un atmet, bet šķīdumu 8 minūtes centrifugē 21 °C temperatūrā (relatīvais centrbēdzes spēks ~ 175 × g). Paraugu, kurā ir 1 ml supernatanta, 1:5 (tilp./tilp) (t. i., 1 ml + 4 ml) atšķaida ar 30 % (masa/tilp) NDS šķīdumu destilētā ūdenī. Mēra šķīduma optisko blīvumu (OB) pie 565 nm.

Krāsvielas satura aprēķināšana

28. Krāsvielas sulforodamīna B saturu diskā aprēķina pēc OB vērtībām (9) (sulforodamīna B krāsvielas molārās ekstinkcijas koeficients pie 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekulmasa = 580). Krāsvielas saturu katram ādas diskam nosaka, izmantojot attiecīgo kalibrēšanas līkni, un pēc tam replikātiem aprēķina krāsvielas vidējo saturu.

Pieņemamības kritēriji

29. Vidējie TEP rezultāti ir derīgi, ja paralēlās pozitīvās un negatīvās kontroles vērtības atbilst diapazoniem, kas attiecībā uz šo metodi ir pieņemami testēšanas laboratorijā. Pieņemamie pretestības diapazoni attiecībā uz iepriekš aprakstīto metodoloģiju un aparātu ir norādīti šajā tabulā:

Kontrole	Viela	Pretestības diapazons (KΩ)
pozitīvā	1 M sālsskābes	0,5–1,0
negatīvā	Destilēts ūdens	10–25

30. Vidējie krāsvielas saistīšanas rezultāti derīgi ar nosacījumu, ka paralēlo kontroļu vērtības atbilst diapazoniem, kas attiecībā uz šo metodi ir pieņemami. Ieteicamie pieņemamie krāsvielas satura diapazoni kontrolvielām, kuras izmanto ar augstāk aprakstīto metodoloģiju un aparatūru, norādīti šajā tabulā:

Kontrole	Viela	Krāsvielas satura diapazons (μg/disks)
pozitīvā	1 M sālsskābes	40–100
negatīvā	Destilēts ūdens	15–35

Rezultātu interpretēšana

31. Šo testēšanas metodi optimizējot, noteikta, pirmsvalidācijas fāzē testēta un oficiālā validācijas pētījumā apstiprināta tika TEP robežvērtība, pie kuras kodīgas ķimikālijas tiek nošķirtas no nekodīgām.

32. Ar ANO *GHS* / *CLP* asociētais prognozēšanas modelis attiecībā uz ādas korozijas testēšanas metodi, kas balstās uz žurkas ādas TEP ir sniegts zemāk:

Uzskatāms, ka testējamā ķimikālija uz ādu kodīgi neiedarbojas:

i) ja attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir lielāka par (>) 5 kΩ vai

ii) attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar (>) 5 kΩ un

— ādas diski nav acīmredzami bojāti (piem., perforēti) un

— vidējais krāsvielas saturs uz disku ir mazāks par (<) vidējo krāsvielas saturu uz disku, kāds ir paralēlajai 10 M HCl pozitīvajai kontrolei (attiecībā uz pozitīvās kontroles vērtībām sk. 30. punktu).

Uzskatāms, ka testējamā ķimikālija uz ādu iedarbojas kodīgi:

i) ja attiecībā uz šo testējamo ķimikāliju vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar (≤) 5 kΩ un šie ādas diski ir acīmredzami bojāti (piem., perforēti) vai

ii) attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar (>) 5 kΩ un

— ādas diski nav acīmredzami bojāti (piem., perforēti), bet

— vidējais krāsvielas saturs uz disku ir lielāks par vai vienāds ar (≥) vidējo krāsvielas saturu uz disku, kāds ir paralēlajai 10 M HCl pozitīvajai kontrolei (attiecībā uz pozitīvajām kontrolvērtībām sk. 30. punktu).

33. Vienai atsevišķai testēšanas reizei (eksperimentam) ar vismaz trim ādas disku replikātiem jābūt pietiekamai gadījumos, kur testējamās ķīmiskās vielas klasifikācija ir nepārprotama. Tomēr ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, replikātu mērījumiem trūkst konkordances un/vai vidējais TEP ir 5 ± 0,5 k, jāapsver, vai nav vajadzīga otrā testēšanas reize (eksperiments), kā arī vai nav vajadzīga trešā, ja abu pirmo divu testēšanas reižu (eksperimentu) rezultāti nesakrīt.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

34. Attiecīgā gadījumā testējamās ķimikālijas pretestības vērtības (kΩ) un krāsvielas satura vērtības (μg uz disku) būtu jāatspoguļo tabulas veidā, ieskaitot datus par katru atsevišķo replikāta disku katrā testēšanas reizē (eksperimentā) un vidējās vērtības ± standartnovirze. Jāatspoguļo visi eksperimentu atkārtojumi. Attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju ziņojumā būtu jāatspoguļo novērotie ādas disku bojājumi.

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles ķimikālijas:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi iespējami izsmeļoši raksturotas pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā līnija un dzimums;

— par donordzīvniekiem izmantoto dzīvnieku vecums;

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;

— detalizēta informācija par ādas preparātu sagatavošanu.

Testēšanas nosacījumi:

— testēšanas iekārtu kalibrēšanas līknes;

— krāsvielas saistīšanas testa izpildes kalibrācijas līknes, OB mērīšanai izmantotās vērtības un attiecīgā gadījumā mērierīces (piem., spektrofotometra) OB linearitātes diapazons;

— detalizēta informācija par TEP mērīšanai izmantoto testēšanas procedūru;

— attiecīgā gadījumā — detalizēta informācija par krāsvielas saistīšanas noteikšanai izmantoto procedūru;

— testā izmantotās devas, ekspozīcijas perioda vai periodu ilgums un ekspozīcijas temperatūra vai temperatūras;

— detalizēta informācija par mazgāšanas procedūru, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda;

— uz vienu testējamo ķimikāliju un uz kontrolēm (pozitīvo un negatīvo kontroli) izmantoto replicēto ādas disku skaits;

— testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas;

— norāde uz modeļa vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz:

i) pozitīvās un negatīvās kontroles TEP vērtību (izteiktas kJ) pieņemamība ar norādi uz pozitīvās un negatīvās kontroles pretestības diapazoniem,

ii) pozitīvās un negatīvās kontroles krāsvielas satura vērtību (izteiktas µg/disc) pieņemamība ar norādi uz pozitīvās un negatīvās kontroles krāsvielas satura diapazoniem,

iii) testa rezultātu pieņemamība ar norādi uz ādas disku replikātu vēsturisko mainību;

— izmantoto lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozēšanas modeļa apraksts.

Rezultāti:

— tabulas veidā apkopoti TEP un krāsas saistīšanas testu (attiecīgā gadījumā) dati par atsevišķām testējamām ķimikālijām un kontrolēm, sniegti par katru testēšanas reizi (eksperimentu) un katru ādas diska replikātu (pa atsevišķiem dzīvniekiem un atsevišķiem ādas paraugiem, vidējās vērtības, standartnovirze un variācijas koeficients;

— apraksts par jebkādu novērotu ietekmi;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozēšanas modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

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

(2) Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation, Corrosion.

(3) Chapter B.40bis of this Annex, *In Vitro* Skin Model.

(4) Chapter B.65 of this Annex, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method.

(5) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.

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

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

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

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

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

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

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

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

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

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

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

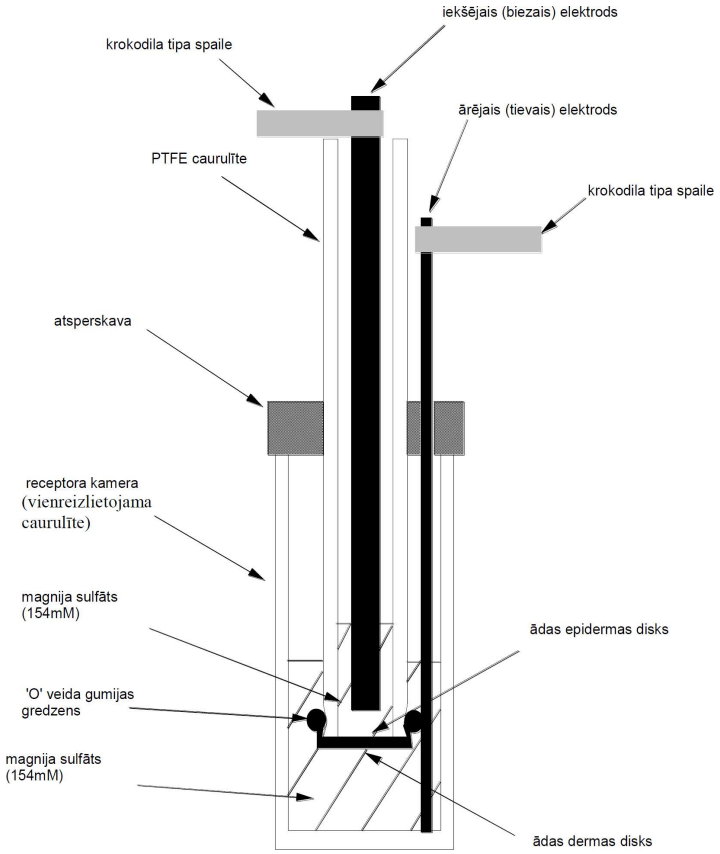
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher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

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

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

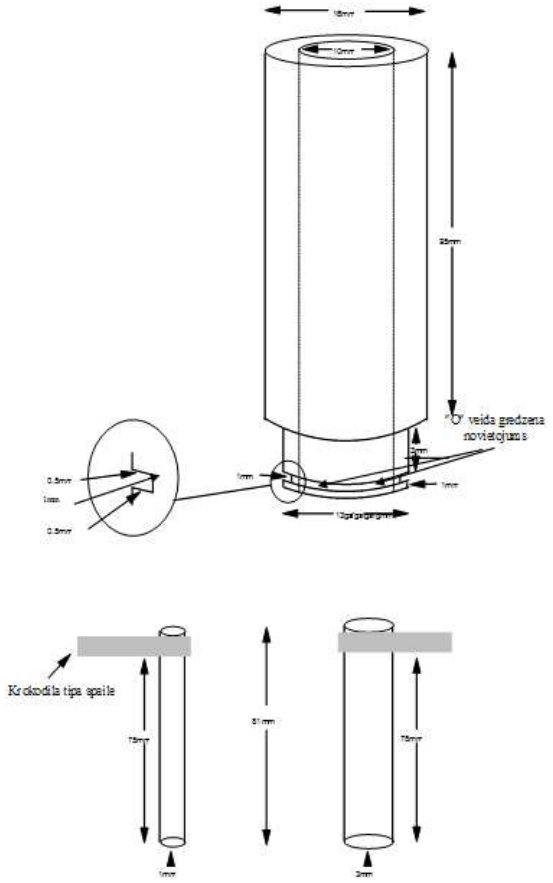
1. Attēls

Zurkas Zdas Tep Testa Aparāts



2. Attēls

Politetrafluoretilēna (PFTE) Caurulītes, Receptora Kameras Un Elektrodu Izmēri



Attēlotā aparāta darbības kritiskie faktori:

— PTFE caurulītes iekšējais diametrs,

— elektrodu garumam attiecībā pret PTFE caurulīti un receptora kameru jābūt tādam, lai elektrodi nepieskartos ādas diskam un lai elektroda standartgarums būtu saskarē ar $MgSO_4$ šķīdumu,

— $MgSO_4$ šķīduma līmenim receptora kamerā jābūt tādam, lai attiecībā uz šķidruma līmeni PTFE caurulītē līmenis būtu kā 1. attēlā,

— lai elektriskās pretestības mērījums patiesi atspoguļotu ādas īpašības, ādas diskam jābūt pietiekami labi fiksētam pie PTFE caurulītes.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (20).

K: kodīga.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veiktspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži vien izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (20).

***GHS* (Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma):**: sistēma, kas piedāvā ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasifikāciju pa standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairākām vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

OD: optiskais blīvums.

PK: pozitīvā kontrole, replikāts, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārāk liela.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: ((i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši ticamības un pareizības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testēšanas metodi var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (20).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību (20).

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar šo testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (20).

Ādas korozija *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar dermu un radusies pēc tam, kad testējamā viela uz ādas aplicēta līdz četrām stundām. Tipiskas reakcijas uz kodīgumu ir čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (20).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

(Testēšanas) reize: atsevišķas testējamās ķimikālijas paralēla testēšana ar vismaz trijiem replicētiem ādas diskiem.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Transkutānā elektriskā pretestība (TEP): ādas elektriskās pretestības mērs, kas izteikts kiloomos (kΩ). Vienkārša un robusta metode, kā novērtē barjerfunkciju, ar Vitstona tilta palīdzību reģistrējot jonu pāreju caur ādu.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.;"

(6) pielikuma B daļas B.40a nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.40.a **ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: REKONSTRUĒTAS CILVĒKA EPIDERMAS RhE TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 431 (2016) aprakstītajam. Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķimikālija [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1])]. Šīs atjauninātās testēšanas metodes B.40a aprakstā raksturota *in vitro* procedūra, kas dod iespēju saskaņā ar ANO *GHS* (1) un ar *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas. Ar tās palīdzību kodīgas vielas ir iespējams arī daļēji iedalīt apakškategorijās.

2. Ķimikāliju ādas korozijas radīšanas potenciāla novērtēšana parasti bijusi saistīta ar laboratorijas dzīvnieku izmantošanu (TM B.4, līdzvērtīga ESAO *TG* 404; sākotnēji pieņemta 1981. g. un pārskatīta 1992., 2002. un 2015. g. (2). Lai testētu ķimikāliju potenciālu izraisīt ādas koroziju, bez pašreizējās testēšanas metodes B.40a validētas un pieņemtas ir tādas citas *in vitro* testēšanas metodes kā TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* 430) (3) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* 435) (4). Turklāt ādas kairinājuma potenciāla testēšanai ir pieņemta *in vitro* TM B.46 (ekvivalenta ESAO TG 439) (5). ESAO norādījumu dokuments par integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu apraksta vairākus moduļus, kādos grupēti informācijas avoti un analīzes instrumenti, un pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (6).

3. Šis testēšanas metodes apraksts pievēršas tādam cilvēkveselības beigupunktam kā ādas korozija. Tas paredz izmantot rekonstruētu cilvēka epidermu (*RhE*) (iegūta no nepārveidotiem no cilvēka atvasinātiem epidermas keratinocītiem), kura tuvu atdarina cilvēka ādas augšējo slāņu jeb epidermas, histoloģiskās, morfoloģiskās, bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības. Attiecīgā testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2004. gadā, 2013. gadā atjaunināta, lai tajā iekļautu papildu testēšanas metodes, kurās izmantoti *RhE* modeļi un paredzēta iespēja šīs metodes izmantot, lai uz tām balstītu kodīgu ķimikāliju iedalīšanu apakškategorijās, kā arī 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un ieviestu alternatīvu procedūru, ko izmanto dzīvotspējas mērīšanai.

4. Šajā testēšanas metodē ir iekļauti četri validēti komerciāli pieejami *RhE* modeļi. Ir veikti pirmsvalidācijas pētījumi(7), pēc kuriem izdarīts oficiāls validācijas pētījums par ādas korozijas (8)(9)(10) novērtēšanu (11) (12) attiecībā uz diviem komerciāli pieejamiem testa modeļiem, *EpiSkin™ Standard Model* (SM) un *EpiDerm™ Skin Corrosivity Test* (*SCT*) (*EPI*-200) (tālākajā tekstā saukti par validētajām references metodēm — VRM). Šo pētījumu iznākumā radās ieteikums, ka divas iepriekš minētās VRM varētu izmantot regulatīvām vajadzībām, lai kodīgas (*C*) vielas atšķirtu no nekodīgām (*NC*) vielām, un ka turklāt *EpiSkin™* var izmantot par atbalstu kodīgu vielu iedalīšanā apakškategorijās (13) (14) (15). Saskaņā ar validāciju, kas balstās uz PS, līdzīgus rezultātus kā VRM *EpiDerm™* ir uzrādījuši vēl divi citi komerciāli pieejami *in vitro* ādas korozijas *RhE* testa modeļi (16) (17) (18). Tie ir *SkinEthic™ RHE* ([2]) un *epiCS®* (agrākais nosaukums *EST*-1000), un arī tos var regulatīviem nolūkiem izmantot kodīgu vielu atšķiršanai no nekodīgām vielām (19)(20). Pēcvalidācijas pētījumi, ko *RhE* modeļa izstrādātāji 2012. līdz 2014. gadā izdarījuši ar precizētu protokolu, ar kura palīdzību tika koriģēta interference, ko rada testējamo ķimikāliju izraisīta nespecifiska MTT redukcija, uzlaboja gan *C*/*NC* atšķiršanas veiktspēju, gan atbalstu kodīgo vielu iedalīšanai apakškategorijās (21) (22). Ar *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* un *EpiCS®* iegūtie pēcvalidācijas dati ir tālāk statistiski izanalizēti, lai apzinātu alternatīvus prognozēšanas modeļus, kas uzlabojuši prognozētspēju attiecībā uz apakškategorizēšanu (23).

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

([2]) Visos uz *RhE* tehnoloģiju balstītajos modeļos izmanto saīsinājumu *RhE* (= rekonstruēta cilvēka epiderma). Modeļa *SkinEthic™* nosaukumā šis saīsinājums nozīmē to pašu, taču šīs konkrētās testēšanas metodes tirdznieciski izmantotajā nosaukumā visi saīsinājuma burti ir lielie burti.

5. Pirms kādu piedāvātu līdzīgu vai modificētu *in vitro RhE* testēšanas metodi, kas nav VRM, attiecībā uz ādas koroziju iespējams izmantot regulatīvām vajadzībām, saskaņā ar veiktspējas standartu (*PS*) (24) prasībām, kuras aprakstītas saskaņā ar ESAO norādījumu dokumenta Nr. 34 (25) principiem būtu jānosaka tās ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tās līdzību VRM. Datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, ja visas jaunierosinātās vai atjauninātās VS atbilstošās testēšanas metodes būs pārskatītas un iekļautas attiecīgajā testēšanas vadlīnijā. Minētajā testēšanas vadlīnijā iekļautos testa modeļus var izmantot, lai, turklāt izmantojot datu savstarpējās atzīšanas priekšrocības, apmierinātu valstu prasības attiecībā uz testu rezultātiem, kas iegūti ar kādu *in vitro* testēšanas metodi ādas korozijas noteikšanai.

DEFINĪCIJAS

6. Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Ar šīs testēšanas palīdzību iespējams saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas un maisījumus. Šī testēšanas metode tālāk atbalsta kodīgu vielu un maisījumu apakškategorizēšanu ANO *GHS* (1) atbilstošā izvēles 1.A apakškategorijā un 1.B un 1.C apakškategorijas kombinācijā (21) (22) (23). Šo testēšanas metodi ierobežo nelielais labi zināmu 1.C apakškategorijas *in vivo* ādai kodīgu ķimikāliju kopums, tāpēc ar tās palīdzību saskaņā ar ANO *GHS* un ar *CLP* savstarpēji nošķirt "kodīgs ādai" 1.B un 1.C apakškategoriju nav iespējams. Iedalīšana apakškategorijās ir iespējama ar testēšanas modeļiem *EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE* un *epiCS®* testa modeļiem (proti, 1.A apakškategorija attiecībā pret 1.B un 1.C apakškategoriju un attiecībā pret NK).

8. Validācijā, kas atbalsta šajā testēšanas metodes aprakstā ietvertos testēšanas modeļus, kuri tiek izmantoti nekodīgu un kodīgu vielu identificēšanai, ķimikālijas ir testētas plašā klāstā, kurā galvenokārt pārstāvētas atsevišķas vielas; validācijas pētījuma empīriskajā datubāzē bija 60 ķimikāliju un tā aptvēra plašu ķimikāliju klašu klāstu (8) (9) (10). Testēšanas metodes izstrādātāji izdarīja testēšanu, kurā tika pierādīta testa jutība, specifiskums, pareizība un intralaboratoriskā reproducējamība tādām vajadzībām kā iedalīšana apakškategorijās, un rezultātus pārskatīja ESAO (21) (22) (23). Raugoties pēc pieejamiem vispārējiem datiem, šī testēšanas metode ir piemērojama plašam ķimikāliju klašu un agregātstāvokļu klāstam, ieskaitot šķidrumus, puscietas un cietas vielas, kā arī vaskus. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietas vielas pirms aplicēšanas jāsamaļ smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Ja pierādījumi liecina, ka šie testa modeļi kādai konkrētai testēšanas metodes apraksta aptvertai testējamo ķimikāliju kategorijai nav izmantojama, to attiecībā uz minēto konkrēto kategoriju neizmanto. Turklāt, paplašinot šīs testēšanas metodes izmantojamību attiecībā uz vielām, tiek uzskatīts, ka tā izmantojama arī attiecībā uz maisījumiem. Tomēr, ņemot vērā, ka maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāva spektru un patlaban pieejams tikai nedaudz informācijas par maisījumu testēšanu, tad, ja var pierādīt testēšanas metodes nepiemērojamību konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, kas piedāvāta (26)), attiecīgo testēšanas metodi minētajai konkrētajai maisījumu kategorijai neizmanto. Pirms attiecībā uz maisījumu izmanto šo testēšanas metodi, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Validācijas pētījumos vēl nav vērtēti gāzes un aerosoli (8) (9) (10). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar *RhE* tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

9. Testējamās ķimikālijas, kas gaismu absorbē tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns, un testējamās ķimikālijas, kas vitālo krāsvielu MTT spēj tieši reducēt (līdz MTT formazānam), var ietekmēt audu dzīvotspējas mērījumus un tādēļ koriģēšanai var būt nepieciešams izmantot pielāgotas kontroles. Tas, kāda veida pielāgotas kontroles var būt vajadzīgas, var mainīties atkarībā no tā, kāda veida interferenci testējamā ķimikālija rada, un atkarībā no MTT formazāna mērīšanai izmantotās procedūras (sk. 25.–31. punktu).

10. Lai arī ar šo testēšanas metodi nevar iegūt pietiekamu informāciju par ādas kairinājumu, jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums *in vitro* īpaši pievēršas TM B.46, kura balstās uz to pašu *RhE* testēšanas sistēmu, lai gan tai ir cits protokols (5). Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (6). Šajā *IATA* pieejā, pirms apsver, vai neveikt testēšanu ar dzīviem dzīvniekiem, izdara *in vitro* testus uz kodīgumu ādai (tādus, kā doti šajā metodes aprakstā) un kairinājumu ādai, Ir atzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst nacionālām un starptautiskām ētikas normām un nosacījumiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testējamo ķimikāliju vietēji aplicē uz trīsdimensiju *RhE* modeļa, kuru veido nepārveidoti cilvēka epidermas keratinocīti, kas kultivēti tā, lai veidotos labi diferencēts daudzslāņains cilvēka epidermas modelis. Tai ir bazālais, spinālais un granulārais slānis, kā arī vairākslāņu *stratum corneum* ar lamelāriem lipīdu starpšūnu slāņiem, kuru uzbūve ir reprezentatīva galvenajām lipīdu klasēm *in vivo*.

12. *RhE* testēšanas metodes pamatā ir premisa, ka kodīgas ķimikālijas difūzijas vai erozijas ceļā spēj izkļūt cauri *stratum corneum* un ka tās ir citotoksiskas apakšā esošo slāņu šūnām. Šūnu dzīvotspēju mēra pēc vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolila zilais tetrazolija bromīds; *CAS* Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu kvantitatīvi nosaka audu ekstraktā (27). Kodīgas ķimikālijas identificē pēc to spējas šūnu dzīvotspēju samazināt zem noteiktām sliekšņvērtībām (sk. 35. un 36. punktu). Ir parādīts, ka uz *RhE* balstītā ādas korozijas testēšanas metode spēj prognozēt trušiem saskaņā ar TM B.4 novērtētu ādas korozijas ietekmi *in vivo* (2).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

13. Pirms kādu no četriem šai testēšanas metodei atbilstošajiem validētajiem *RhE* testa modeļiem sāk izmantot regulāri, laboratorijām ieteicams pierādīt tehnisko kompetenci, pareizi saklasificējot divpadsmit 1. tabulas sarakstā norādītās standartvielas. Ja izmanto metodi, kura paredzēta sīkākai klasificēšanai, jāpierāda arī, ka pareizi tiek veikta iedalīšana apakškategorijās. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (24)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

1. tabula

Standartvielu ([1]) saraksts

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([2])	ANO *GHS/CLP* kat. uz *in vivo* rezultātu bāzes ([3])	VRM kat. uz *in vitro* rezultātu ([4]) bāzes	MTT Reducētājs ([5])	Agregātstāvoklis
1.A kategorija, *In Vivo* kodīgas vielas						
brometiķskābe	79-08-3	organiska skābe	1.A	(3) 1.A	—	CV
bora trifluorīddihidrāts	13319-75-0	neorganiska skābe	1.A	(3) 1.A	—	Š
fenols	108-95-2	fenols	1.A	(3) 1.A	—	CV
dihloracetil-hlorīds	79-36-7	elektrofīla viela	1.A	(3) 1.A	—	Š
Apakškategoriju 1B-un-1C kombinācija, *In Vivo* kodīgas vielas						
glioksilskābes monohidrāts	563-96-2	organiska skābe	1B-un-1C	(3) 1B-un-1C	—	S

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([2])	ANO *GHS/CLP* kat. uz *in vivo* rezultātu bāzes ([3])	VRM kat. uz *in vitro* rezultātu ([4]) bāzes	MTT Reducētājs ([5])	Agregātstāvoklis
1.A kategorija, *In Vivo* kodīgas vielas						
pienskābe	598-82-3	organiska skābe	1B-un-1C	(3) 1B-un-1C	—	L
etanolamīns	141-43-5	organiska bāze	1B	(3) 1B-un-1C	jā	viskoza viela
hlorūdeņražskābe (14,4 %)	7647-01-0	neorganiska skābe	1.B-un-1.C	(3) 1.B-un-1.C	—	L
in vivo nekodīgas vielas (vielas, kas nav kodīgas)						
fenetilbromīds	103-63-9	elektrofīla viela	NK	(3) NK	jā	Š
4-amino-1,2,4-triazols	584-13-4	organiska bāze	NK	(3) NK	—	CV
4-(metiltio)-benzaldehīds	3446-89-7	elektrofīla viela	NK	(3) NK	jā	Š
laurīnskābe	143-07-7	organiska skābe	NK	(3) NK	—	CV

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs VRM = validēta references metode; NK = nekodīga viela; CV = cieta viela; Š = šķidrums.

([1]) Standartvielas, kas sagrupētas vispirms kodīgās un nekodīgās vielās, pēc tam pa kodīguma apakškategorijām un tad pa ķimikāliju klasēm, tika izraudzītas no vielām, kuras tika izmantotas *ECVAM EpiSkin™* un *EpiDerm™* validācijas pētījumos (8) (9) (10) un pēcvalidācijas pētījumos, kuru pamatā ir *EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™* un *epiCS®* izstrādātāju sagādātie dati (23). Ja nav norādīts citādi, vielas testētas tīrības līmenī, kāds piemīt komerciāli iegādātai vielai (8). Izlasē, cik vien iespējams, iekļautas vielas, kas: i) ir reprezentatīvas attiecībā uz to kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas, vāji līdz stipri kodīgas), ko iespējams mērīt vai paredzēt ar VRM, ii) ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas pētījumos izmantotajām ķimikāliju klasēm, iii) ir ar labi definētu ķīmisku struktūru, iv) ar VRM inducē reproducējamus rezultātus, v) ar *in vivo* testēšanas references metodi inducē skaidrus rezultātus; vi) ir komerciāli pieejamas un vii) nav saistītas ar augstām likvidēšanas izmaksām.

([2]) Ķimikāliju klasi piešķīruši *Barratt et al.* (8).

([3]) Attiecīgās ANO iepakojuma grupas attiecīgi priekš ANO *GHS/CLP* 1.A, 1.B un 1.C kategorijas ir ir I, II un III.

([4]) Šajā tabulā atspoguļotās VRM *in vitro* prognozes iegūtas ar testa modeļiem *EpiSkin™* un *EpiDerm™* (VRM) testēšanas metodes izstrādātāju veiktā pēcvalidācijas testēšanā.

([5]) *ECVAM* ādas korozijas validācijas pētījumos iegūtās vērtības, kas raksturo ādas dzīvotspēju, netika koriģētas attiecībā uz tiešo MTT redukciju (validācijas pētījumos netika izdarītas kontroles ar nonāvētiem audiem). Tomēr šajā tabulā sniegtie testēšanas metodes izstrādātāju radītie pēcvalidācijas dati iegūti ar pielāgotām kontrolēm (23).

14. Kompetences pierādīšanā lietotājam ieteicams pēc audu saņemšanas verificēt, ka to barjerīpašības atbilst *RhE* modeļa ražotāja dotajai specifikācijai. Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audu sūtījums piegādāts no tālienes vai piegāde bijusi ilga. Kad testēšanas metode sekmīgi apgūta un kompetence tās izmantošanā pierādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt katru reizi. Tomēr, ja testēšanas metodi izmanto parastajā praksē, barjerfunkciju ieteicams joprojām novērtēt regulāri.

PROCEDŪRA

15. Tālāk vispārīgi aprakstīti šīs testēšanas metodes aptverto ādas korozijas novērtēšanai paredzēto *RhE* testēšanas modeļu komponenti un procedūras. *RhE* modeļus, kas atzīti par zinātniski derīgiem izmantošanai šajā testēšanas metodē, proti, modeļus *EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE* un *epiCS®* (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), var iegūt no komerciāliem piegādātājiem. Attiecībā uz šiem četriem *RhE* modeļiem ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*), un pārskats par šo modeļu testēšanas metodes galvenajiem komponentiem sniegts 2. papildinājumā. Jebkuru no šiem modeļiem īstenojot un izmantojot laboratorijā, ieteicams iepazīties ar attiecīgo *SOP*. Testēšanai ar šīs testēšanas metodes aptvertajiem četriem *RhE* testēšanas modeļiem būtu jāatbilst tālāk minētajiem nosacījumiem.

RHE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgie nosacījumi

16. Epitēlija rekonstruēšanai jāizmanto nepārveidoti cilvēka keratinocīti. Zem funkcionējoša *stratum corneum* jābūt vairākiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu slāņiem (bazālajam slānim, *stratum spinosum, stratum granulosum*). *Stratum corneum* jābūt vairākslāņainam, ar tādu esenciālo lipīdu profilu, lai izveidotos funkcionāla barjera, kura ir pietiekami robusta, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, nātrija dodecilsulfāta (SDS) vai *Triton X-100*, ātru penetrēšanos. Barjerfunkcija būtu uzskatāmi jāpierāda, un šo funkciju iespējams novērtēt, vai nu nosakot, pie kādas koncentrācijas etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika par 50 % samazina audu dzīvotspēju (IC_{50}), vai nosakot, kāds ekspozīcijas laiks vajadzīgs, lai pēc tam, kad konkrētā noteiktā koncentrācijā aplicēta etalonķimikālija (sk. 18. punktu), par 50 % samazinātos šūnu dzīvotspēja (ET_{50}). *RhE* modeļa aizturētājīpašībām jābūt tādām, lai ap *stratum corneum* esošais materiāls nenokļūtu dzīvotspējīgos audos, kā dēļ var tikt nepareizi modelēta ādas ekspozīcija. *RhE* modelis nedrīkst būt kontaminēts ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Funkcionālie nosacījumi

Dzīvotspēja

17. Audu dzīvotspējas kvantitatīvai noteikšanai izmanto MTT testu (27). *RhE* audu modeļa dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT spēj reducēt par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm, kuras pēc tam no audiem tiek ekstrahētas ar izopropanola (vai līdzīga šķīdinātāja) starpniecību. Jau paša ekstrakcijas šķīduma optiskajam blīvumam (OB) jābūt pietiekami zemam, t. i., OB < 0,1. Ekstrahēto MTT formazānu kvantitatīvi var izteikt, vai nu izmantojot standartabsorbcijas OB mērīšanu, vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (38). *RhE* modeļa lietotājiem jānodrošina, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst negatīvās kontroles vajadzībām definētajiem kritērijiem. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Četru validēto šajā testēšanas metodē iekļauto *RhE* testa modeļu negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazoni ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam par negatīvās kontroles pieņemšanas kritēriju jāizmanto 2. tabulā norādītie negatīvās kontroles OB diapazoni. Jādokumentē, vai visā ekspozīcijas periodā ar negatīvo kontroli apstrādātie audi kultūrā ir stabili (uzrāda tādus pašus OB rādītājus).

2. tabula

Partijas kvalitātes kontrolei paredzētie negatīvās kontroles optiskā blīvuma vērtību pieņemamības diapazoni

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Barjerfunkcija

18. *Stratum corneum* un tā lipīdsastāvam jābūt pietiekamam, lai nepieļautu noteiktu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, SDS vai *Triton X-100*, strauju penetrēšanos, un to nosaka ar IC_{50} vai ET_{50} (3. tabula). *RhE* modeļa izstrādātājam/tirgotājam, piegādājot audus galalietotājam, jāpierāda katras izmantotā *RhE* modeļa partijas barjerfunkcija (sk. 21. punktu).

Morfoloģija

19. *RhE* modelis būtu histoloģiski jāizmeklē, pierādot, ka tam ir vairākslāņu struktūra, kas ir tāda pati kā cilvēka epidermas struktūra un satur *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* un *stratum corneum*, un cilvēka epidermas lipīdprofilam līdzīgs lipīdprofils. *RhE* modeļa izstrādātājam/tirgotājam, piegādājot audus galalietotājam, jāiesniedz katras izmantotā *RhE* modeļa partijas histoloģisks izmeklējums, kas pierāda, ka tam piemīt vajadzīgā audu morfoloģija (sk. 21. punktu).

Reproducējamība

20. Testēšanas metodes lietotājiem būtu jāpierāda šo testēšanas metožu reproducējamība, tās izmantojot ilgākā laika nogrieznī ar pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm. Turklāt šī testēšanas metode būtu jāizmanto tikai tad, ja *RhE* modeļa izstrādātājs/piegādātājs sagādā datus, kas pierāda metodes reproducējamību, to izmantojot ilgākā laika nogrieznī ar kodīgām un nekodīgām ķimikālijām no, piem., kontrolvielu saraksta (1. tabula). Ja kādu no testēšanas metodēm izmanto iedalīšanai apakškategorijās, jāpierāda arī reproducējamība attiecībā uz iedalīšanu apakškategorijās.

Kvalitātes kontrole (QC)

21. *RhE* modelis jāizmanto tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs pierādījis, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst definētajiem produkcijas pieņemamības kritērijiem, kuru vidū svarīgākie ir *dzīvotspēja* (17. punkts), *barjerfunkcija* (18. punkts) un *morfoloģija* (19. punkts). Šos datus dara pieejamus testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju varētu iekļaut testēšanas pārskatā. Kodīgu vielu klasificēšanā uzticamām prognozēm der tikai rezultāti, kas iegūti ar kvalitātes kontrolē pieņemtām audu partijām. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka *IC*50 vai *ET*50 vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Pieņemamības diapazoni attiecībā uz četriem validētajiem testa modeļiem ir norādīti 3. tabulā.

3. tabula

Partiju caurlaišanas *QC* kritēriji

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™ (18 stundas ilga apstrāde ar *SDS* (33).	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % *Triton X-100*)(34)	ET_{50} = 4,0 stundas	ET_{50} = 8,7 stundas
SkinEthic™ RHE (1 % *Triton X-100*)(35)	ET_{50} = 4,0 stundas	ET_{50} = 10,0 stundas
epiCS® (1 % *Triton X-100*)(36)	ET_{50} = 2,0 stundas	ET_{50} = 7,0 stundas

Testējamās ķimikālijas un kontrolķimikāliju aplicēšana

22. Uz katru testējamo ķimikāliju un kontrolēm un katru ekspozīcijas laiku jāizmanto vismaz divi audu replikāti. Testējamās ķīmiskās vielas, kas ir šķidrumi vai cietas vielas, uz epidermas virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, t. i., vismaz 70 µl/cm^2 vai 30 mg/cm^2, raugoties, lai netiktu testēta nefiksēta deva. Atkarībā no modeļa, lai nodrošinātu iespējami labāku testējamās vielas saskari ar epidermas virsmu, testējot cietas vielas, epidermas virsma vispirms jāsamitrina ar dejonizētu vai destilētu ūdeni, un tikai tad var aplicēt vielu (34) (35) 36) (37). Ja vien iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Aplicēšanas metodei jābūt

testējamai ķimikālijai piemērotai (sk., piem., atsauces (34–37)). Ekspozīcijas perioda beigās testējamā ķimikālija no epidermas virsmas rūpīgi jānoskalo ar buferšķīdumu uz ūdens bāzes vai 0,9 % NaCl šķīdumu. Atkarībā no tā, kurš no četriem validētajiem *RhE* testēšanas modeļiem tiek izmantots, uz katru testējamo ķimikāliju tiek izmantot divi vai trīs ekspozīcijas laiki (attiecībā uz visiem četriem derīgajiem *RhE* modeļiem 3 min un 1 h; attiecībā uz *EpiSkin™* papildu ekspozīcijas laiks četras stundas). Atkarībā no izmantotā *RhE* testēšanas modeļa un novērtētā ekspozīcijas perioda, inkubācijas temperatūra ekspozīcijas laikā var variēt no istabas temperatūras līdz pat 37 °C.

23. Katrā izpildes reizē jāizmanto paralēlā negatīvā kontrole un pozitīvā kontrole (*PC*), lai pierādītu, ka audu dzīvotspēja (izmanto negatīvās kontroles), barjerfunkcija un no tās izrietošais audu jutīgums (izmanto *PC*) ietilpst noteiktā vēsturiskā pieņemamības diapazonā. Ierosinātās pozitīvās kontroles ķimikālijas atkarībā no izmantotā *RhE* modeļa ir ledus etiķskābe vai 8N KOH. Jāņem vērā, ka 8N KOH ir tiešs MTT reducētājs, attiecībā uz kuru varētu būt vajadzīgas 25. un 26. punktā aprakstītās pielāgotās kontroles. Ieteicamās negatīvās kontroles vielas ir 0,9 % NaCl šķīdums vai ūdens.

Šūnu dzīvotspējas mērījumi

24. Šūnu dzīvotspējas mērīšanai šajā testēšanas metodē būtu jāizmanto MTT tests, kas ir kvantitatīvs tests (27). Audu paraugu uz 3 stundām ievieto attiecīgas koncentrācijas (piemēram, 0,3–1 mg/ml) MTT šķīdumā. Pēc tam iegūtās zilas krāsas formazāna nogulsnes ekstrahē ar šķīdinātāju (piemēram, izopropanolu vai paskābinātu izopropanolu) un nosaka formazāna koncentrāciju, mērot optisko blīvumu pie viļņa garuma 570 nm ar frekvenču joslas filtru, kura maksimums ir± 30 nm, vai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 30. un 31. punktu) (38).

25. Testējamās ķimikālijas ar MTT testu var interferēties, MTT tieši reducējoties līdz zilajam formazānam un/vai notiekot krāsu interferencei, ja testējamajai ķimikālijai absorbcija dabiski vai apstrādes procedūru rezultātā notiek tajā pašā OB diapazonā kā formazānam (570 ± 30 nm, galvenokārt zilas un violetas ķimikālijas). Būtu jāizmanto tādas papildu kontroles, kurās detektē un ievērtē šādu testējamo ķimikāliju izraisītu potenciālo interferenci, kā, piemēram, nespecifiskās MTT redukcijas kontrole (NSMTT kontrole) un nespecifiskas krāsas kontrole (*NSC* kontrole) (sk. 26. līdz 30. punktu). Tas ir īpaši svarīgi tad, ja kāda konkrēta testējamā ķimikālija no audiem netiek pilnīgi noskalota vai izkļūst caur epidermu un tātad brīdī, kad tiek veikts dzīvotspējas tests ar MTT, atrodas šajos audos. Detalizēts apraksts, kā ievērtēt tiešo MTT reducēšanos un krāsvielu radītas interferences, atrodams testa modeļiem paredzētajās *SOP* (34) (35) (36) (37).

26. Lai noteiktu tiešus MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi sagatavotai MTT "barotnei" (34) (35) (36) (37). Ja testējamo ķimikāliju saturošais MTT maisījums iekrāsojas zils/violets, uzskata, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un neatkarīgi no tā, vai mēra standartabsorbciju (OB) vai izdara *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru, tālāk jāizdara funkcionāla pārbaude ar dzīvnotnespējīgu epidermu. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nonāvētus audus, kam piemīt tikai reziduāla metaboliska aktivitāte, taču testējamo ķimikāliju tie absorbē līdzīgā daudzumā kā dzīvotspējīgi audi. Katru MTT reducētāju ķimikāliju uz vienu ekspozīcijas laiku aplicē vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic pilnu ādas korozijas testu. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem, atņemot procentuālo nespecifisko MTT redukciju, kas iegūta ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nonāvētiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (*% NSMTT*).

27. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada krāsainas testējamās ķimikālijas vai testējamās ķimikālijas, kuras saskarē ar ūdeni vai izopropanolu iekrāsojas, un izlemtu, vai nav vajadzīgas papildu kontroles, jāizdara testējamās ķimikālijas spektrālanalīze ūdenī (ekspozīcijas vide) un/vai izopropanolā (ekstrakcijas šķīdums). Ja testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē gaismu 570 ± 30 nm diapazonā, jāizdara vēl papildu kontroles ar krāsvielām vai arī jāizmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūra, kuras gadījumā kontroles nav vajadzīgas (sk. 30. un 31. punktu). Mērot standartabsorbciju OB, katru interferējošo krāsaino testējamo ķimikāliju vienā ekspozīcijas laikā aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, kuriem izdara visu

ādas korozijas testu, taču, lai iegūtu nespecifiskas krāsas (NSC_{living}) kontroli, MTT inkubācijas solī tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Sakarā ar to, ka dzīviem audiem piemīt bioloģiska mainība, par katru krāsaino testējamo ķimikāliju katrā izpildes reizē uz ekspozīcijas laiku jābūt paralēlai kontrolei NSC_{living}. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem, atņemot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamam testam inkubēti barotnē bez MTT (%NSC_{living}).

28. Mērot tādu testējamo ķimikāliju standartabsorbciju OB, par kurām konstatēts, ka tās gan tieši reducē MTT (sk. 26. punktu), gan izraisa krāsu interferenci (sk. 27. punktu), papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām kontrolēm *NSMTT* un NSC_{living} jābūt arī kādam trešajam kontroļu kopumam. Tas parasti attiecas uz MTT testā interferējošām tumšas (piem., zilas, violetas, melnas) krāsas testējamajām ķimikālijām, jo raksturīgās krāsas dēļ ir grūti novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 26. punktā. Šīs testējamās ķimikālijas var piesaistīties gan dzīviem, gan nonāvētiem audiem, un tāpēc ar kontroli var *NSMTT* koriģēt ne tikai iespējamu tiešu MTT redukciju, ko izraisījusi testējamā ķimikālija, bet arī krāsas interferenci, ko radījusi testējamās ķimikālijas piesaistīšanās nonāvētajiem audiem. Tādējādi koriģēšana attiecībā uz krāsas interferenci var notikt dubultā, jo krāsas interference, ko radījusi testējamās ķimikālijas saistīšanās ar dzīviem audiem, jau tiek koriģēta ar kontroli NSC_{living}. Lai nepieļautu varbūtību, ka krāsas interference tiek koriģēta divreiz, jāizdara trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nonāvētajos audos (*NSCkilled*). Šajā papildu kontrolē testējamo ķimikāliju uz katru ekspozīcijas laiku aplicē vismaz diviem nonāvēto audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē nevis MTT šķīdumā, bet gan barotnē. Neatkarīgi no veikto testu/izpildes reižu skaita attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju pietiek ar vienu kontroli NSC_{killed}, taču tā jāizdara paralēli kontrolei *NSMTT* un, ja iespējams, ar to pašu audu partiju. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot % *NSMTT* un % NSC_{living} un pieskaitot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nonāvētajiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (% NSC_{killed}).

29. Svarīgi ievērot, ka nespecifiskas MTT redukcijas un nespecifiskas krāsas interferenču dēļ var tikt iegūti audu ekstrakta rādījumi, kas pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu. Tādēļ katrai laboratorijai, pirms regulatīvos nolūkos sākt testēt testējamas ķimikālijas, jānosaka sava spektrofotometra linearitātes diapazons, izmantojot komerciāli pieejamu MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7). Ja tādu audu ekstraktu optiskais blīvums, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju, neveicot korekciju attiecībā uz tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, ir spektrofotometra lineārā diapazona robežās vai ar testējamo ķimikāliju iegūtā nekoriģētā procentuālā dzīvotspēja jau ir ≤ 50 %, tiešo MTT reducētāju un interferējošas krāsas testējamo ķimikāliju novērtēšanai ar spektrofotometru ir lietderīgi mērīt standartabsorbciju (OB). Tomēr rezultāti attiecībā uz tādām testējamām ķimikālijām, kurām % *NSMTT* un/ vai % NSC_{living} > 50 % no negatīvās kontroles, jāinterpretē piesardzīgi.

30. Attiecībā uz testējamām krāsainām ķimikālijām, kuras standartabsorbcijas (OB) mērījumiem nav piemērotas, jo pārāk stipri interferē ar MTT testu, MTT formazāna mērīšanai var izmantot alternatīvo *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 31. punktu) (37). *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēma dod iespēju MTT formazānu pirms tā kvantitatīvas noteikšanas atdalīt no testējamās ķimikālijas (38). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC/UPLC* spektrofotometrija, NSC_{living} vai NSC_{killed} kontroles nav jāveic. Taču, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, vai tai ir krāsa, kas traucē novērtēt ķimikālijas spēju tieši reducēt MTT (kā aprakstīts 26. punktā), ir jāizmanto *NSMTT* kontroles. MTT formazāna mērīšanai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju, kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, aprēķina audu procentuālo dzīvotspēju. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši

reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot % *NSMTT*. Visbeidzot jāatzīmē, ka nav iespējams novērtēt tādus tiešus MTT reducētājus, kuri arī var radīt krāsas interferenci, kuri pēc apstrādes saglabājas audos un kuri MTT reducē tik spēcīgi, ka testētā audu ekstrakta OB (izmantojot standarta OB mērīšanu) vai smailes laukumi (izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju) pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu, taču šādi gadījumi ir ļoti reti.

31. Ar jebkāda veida testējamām ķimikālijām (krāsainas, bezkrāsainas, MTT reducētājas un MTT nereducētājas) MTT formazāna mērīšanai var izmantot arī *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju (38). Tā kā *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmas ir daudzveidīgas, pirms *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmanto, lai kvantitatīvi noteiktu MTT formazānu no audu ekstraktiem, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācija, izpildot pieņemamības kritērijus, kas noteikti attiecībā uz tādu kvalifikācijas standartparametru kopumu, kuru pamatā ir ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu aprakstītie parametri (38) (39). Šie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 4. papildinājumā. Kad 4. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji izpildīti, *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu tam, lai noteiktu MTT formazāna daudzumu, ievērojot šīs testēšanas metodes aprakstā sniegtos eksperimentēšanas nosacījumus.

Pieņemamības kritēriji

32. Attiecībā uz jebkuru testēšanas metodi, kurā tiek izmantoti derīgi *RhE* modeļi, ar negatīvo kontroli apstrādātu audu optiskajam blīvumam vajadzētu atbilst 2. tabulā aprakstīto audu kvalitātei un tas nedrīkstētu būt mazāks par vēsturiski noteiktajām robežvērtībām. Ar PK, proti, ledus etiķskābi vai 8N KOH apstrādātajiem audiem būtu jāatspoguļo audu spēja reaģēt uz kodīgu ķimikāliju apstākļos, kur ievēroti testēšanas modeļa nosacījumi (sk. 2. papildinājumu). Testējamai ķimikālijai un/vai kontrolķimikālijām izmantoto audu replikātu mainībai jābūt robežās, kas pieņemtas attiecībā uz katru derīgo *RhE* modeli izvirzītajās prasībās (sk. 2. papildinājumu) (piem., divu audu replikātu mainības starpība nedrīkst pārsniegt 30 %). Ja kādā izpildes reizē iekļautā negatīvā kontrole vai pozitīvā kontrole ir ārpus pieņemtajiem diapazoniem, izpildes reizi uzskata par nederīgu un tā jāatkārto. Ja ārpus definētā diapazona ir mainība attiecībā uz testējamām ķimikālijām, tās jātestē atkārtoti.

Rezultātu interpretēšana un prognozēšanas modelis

33. Par katru testējamo ķimikāliju iegūtās OB vērtības var izmantot dzīvotspējīgo šūnu procentuālā īpatsvara aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kurai to pieņem par 100 %. Ja izmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju, audu procentuālo dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli. Procentuālās šūnu dzīvotspējas robežvērtības, kas korozīvas testējamās ķimikālijas šķir no nekorozīvām (vai dod iespēju atšķirt dažādas kodīgu vielu apakškategorijas), attiecībā uz katru šīs testēšanas metodes aptverto testa modeli ir definētas zemāk 35. un 36. punktā un šīs vērtības būtu jāizmanto rezultātu interpretēšanai.

34. Ja rezultātā iegūtā klasifikācija nav nepārprotama, attiecībā uz testējamu ķimikāliju vajadzētu pietikt ar vienu testēšanas izpildes reizi, kurā ietilpst vismaz divi audu replikāti. Tomēr, ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, ja nesakrīt replikātu mērījumi, var apsvērt, vai neveikt otru izpildes reizi, bet, ja divu pirmo izpildes reižu rezultāti nesakrīt, arī trešo.

35. Ar ANO *GHS* / *CLP* asociētais prognozēšanas modelis attiecībā uz *EpiSkin™* ādas korozijas testēšanas modeli (9)(34)(22), ir sniegts 4. tabulā.

4. tabula

EpiSkin™ prognozēšanas modelis

Pa ekspozīcijas laikpunktiem mērītā dzīvotspēja (t = 3, 60 un 240 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
Pēc 3 min ekspozīcijas < 35 %	**kodīga:** •fakultatīvā 1.A apakškategorija (*)
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 35 % **UN** pēc 60 min ekspozīcijas < 35 % **VAI** pēc 60 min ekspozīcijas ≥ 35 % **UN** pēc 240 min ekspozīcijas < 35 %	**kodīga:** •fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija
pēc 240 min ekspozīcijas ≥ 35 %	**nekodīga**

(*) Saskaņā ar datiem, kas radīti, lai novērtētu, kā *RhE* testēšanas modeļi noder par atbalstu vielu iedalīšanai apakškategorijās, tika pierādīts, ka attiecībā uz testēšanas modeli *EpiSkin™* apmēram 22 % 1.A apakškategorijas rezultātu faktiski var būt 1.B apakškategorijas vai 1.C apakškategorijas vielas vai maisījumi (proti, pārspīlēta klasifikācija) (sk. 3. papildinājumu).

36. Ar ANO *GHS*/*CLP* klasifikācijas sistēmu asociētajiem ādas korozijas testēšanas modeļiem *EpiDerm™ SCT* (10)(23)(35), *SkinEthic™ RHE* (17)(18) (23) (36), un *epi*CS® (16)(23)(37) 5. tabula sniedz prognozēšanas modeļus.

5. tabula

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE un epiCS®

Pa ekspozīcijas laikpunktiem mērītā dzīvotspēja (t = 360 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
1. SOLIS attiecībā uz *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* un *epiCS®*	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 50 %	kodīga
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 50 % **UN** Pēc 60 min ekspozīcijas < 15 %	kodīga
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 50 % **UN** Pēc 60 min ekspozīcijas ≥ 15 %	nekodīga
2. SOLIS attiecībā uz *EpiDerm™ SCT* sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 25 %	fakultatīvā 1.A apakškategorija *

Pa ekspozīcijas laikpunktiem mērītā dzīvotspēja (t = 360 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
1. SOLIS attiecībā uz *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* un *epiCS®*	
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 25 %	fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija
2. SOLIS attiecībā uz *SkinEthic™ RHE* sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 18 %	fakultatīvā 1.A apakškategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 18 %	fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija
2. SOLIS attiecībā uz *epiCS®* sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 15 %	fakultatīvā 1.A apakškategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 15 %	fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

37. Par katru testu, arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tos veic, visus datus par atsevišķajiem audu replikātiem (piemēram, optiskā blīvuma vērtības, datus par testējamās vielas ietekmi uz šūnu dzīvotspēju un tās klasifikācijas datus) apkopo tabulas veidā. Turklāt ziņojumā attiecībā uz katru testu būtu jāiekļauj audu replikātu dzīvotspējas un mainības koeficienta vidējās vērtības un diapazoni. Par katru testējamo ķimikāliju ziņojumā jāatspoguļo tiešu MTT reducētāju vai testējamu krāsainu ķimikāliju novērotā mijiedarbība ar MTT reaģentu.

Testēšanas pārskats

38. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamās un kontroles ķimikālijas:

— Vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

— Daudzkomponentu vielas, UVCB un maisījumi: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

— izskats, šķīdība ūdenī un papildu relevantās fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Izmantotais RhE modelis un protokols un attiecīgās izvēles pamatojums (attiecīgā gadījumā)

Testa apstākļi:

— izmantotais *RhE* modelis (arī sērijas numurs);

— MTT kvantitatīvajai noteikšanai izmantotās mērierīces (piemēram, spektrofotometra) kalibrēšanas dati, viļņa garums un frekvenču joslas filtrs (attiecīgā gadījumā), un mērierīces linearitātes diapazons;

— MTT formazāna kvantitatīvajai noteikšanai izmantotās metodes apraksts;

— *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalifikācijas apraksts (attiecīgā gadījumā);

— pietiekama papildinformācija par izmantoto konkrēto *RhE* modeli, arī tā veiktspēju. No tiem jānorāda vismaz:

i) dzīvotspēja,

ii) barjerfunkcija,

iii) morfoloģija,

iv) reproducējamība un prognozēšanas spēja,

v) modeļa kvalitātes kontroles (*QC*);

— norāde uz modeļa vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz kvalitātes kontroles datu pieņemamība attiecībā uz vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem,

— Apliecināta testēšanas metodes izmantošanas kompetence, kas pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, testējot standartvielas.

Testa procedūra:

— detalizēta informācija par izmantoto testēšanas procedūru (arī par mazgāšanas procedūrām, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda);

— izmantotās testējamās ķimikālijas un kontrolķimikāliju devas;

— ekspozīcijas laiks vai laiki un temperatūra vai temperatūras;

— attiecībā uz tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām krāsojošām ķimikālijām izmantotās kontroles; norādes (attiecīgā gadījumā);

— uz katru testējamo ķimikāliju un kontrolēm (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un *NSMTT*, *NSCliving* un *NSCkilled*, attiecīgā gadījumā) izmantoto audu replikātu skaits uz vienu ekspozīcijas laiku;

— apraksts par lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozēšanas modeli, kas izmantots, pamatojoties uz lietoto *RhE* modeli;

— apraksts par jebkādām testa procedūras (arī mazgāšanas procedūru) modifikācijām.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji:

— pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem;

— pieņemamā mainība pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem;

— pieņemamā mainība testējamai ķimikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Rezultāti:

— tabulās apkopoti dati par atsevišķām testējamām ķimikālijām un kontrolēm par katru ekspozīcijas laiku, katru izpildes reizi un katru replikāta mērījumu, norādot arī OB vai MTT formazāna smailes laukumu, audu procentuālo dzīvotspēju, audu vidējo procentuālo dzīvotspēju, replikātu atšķirības, standartnovirzi un/vai mainības koeficientu (attiecīgā gadījumā);

— attiecīgā gadījumā to kontroļu rezultāti, kas izmantotas tiešiem MTT reducētājiem un/vai krāsojošām testējamām ķimikālijām, norādot arī OB vai MTT formazāna smailes laukumu, % *NSMTT*, % NSC_{living}, % $_{NSCkilled}$, standartnovirzi un/vai mainības koeficientu (attiecīgā gadījumā) un audu galīgo pareizo procentuālo dzīvotspēju;

— rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolķimikālijām, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem;

— citu novērotu ietekmju apraksts;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozēšanas modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

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

(2) Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation, Corrosion.

(3) Chapter B.40 of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion.

(4) Chapter B.65 of this Annex, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method.

(5) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1 000 (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*. In: *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). Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo rezultātu īpatsvaru (25).

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti, piemēram, šūnu mitohondriju dehidrogenāžu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais), kas atkarībā no nosakāmā testēšanas beigupunkta un izmantotā testēšanas plāna korelē ar dzīvo šūnu kopējo skaitu un/vai dzīvotspēju.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veiktspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums ir lielā mērā atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (25).

ET_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc ekspozīcijas laika, kas pēc specifiskas noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (sk. arī IC_{50}).

***GHS*(Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma)**: sistēma, kas piedāvā ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasifikāciju pa standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi(1).

HPLC.: augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfija.

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

IC_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc etalonķimikālijas koncentrācijas, pie kuras audu dzīvotspēja pēc noteikta ekspozīcijas laika samazinās par 50 % (IC_{50}) (sk. arī ET_{50}).

Nefiksēta deva: uz epidermas aplicētas testējamās ķimikālijas daudzums, kas lielāks par epidermas virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu. Maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilā tetrazolija bromīds.

Daudzkomponentu viela:: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

Kontrole NSC_{killed}: nespecifiskas krāsas kontrole nonāvētos audos.

Kontrole NSC_{living}: nespecifiskas krāsas kontrole dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiskā MTT redukcija.

OB: optiskais blīvums.

PK: pozitīvā kontrole, proti, replikāts, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārāk liela.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta (25).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (25).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību (25).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli negatīvai kontrolei un pozitīvai kontrolei.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar šo testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (25).

Ādas korozija*in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz ādas uz laiku līdz četrām stundām. Reakcijām uz kodīgumu parasti ir raksturīgas čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (25).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija:: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UPLC: īpaši augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

ĀDAS KOROZIJAS TESTĒŠANAS VAJADZĪBĀM VALIDĒTO *RHE* TESTĒŠANAS MODEĻU GALVENIE KOMPONENTI

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin*™	*EpiDerm*™ *SCT*	*SkinEthic*™ *RHE*	*epiCS*®
Modeļa virsma	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Audu replikātu skaits	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2	uz ekspozīcijas laiku 2–3	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2
Apstrādes devas un aplicēšana	Šķidrumi un viskozas vielas: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Cietas vielas: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl NaCl šķīduma (9 g/l) Vaskainas/lipīgas vielas: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) ar neilona tīkliņu	Šķidrumi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) ar neilona tīkliņu vai bez tā *Testējamās ķimikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu* Puscietas vielas: 50 µl (79.4 µl/cm^2) Cietas vielas: 25 µl H_2O (vai attiecīgā gadījumā vairāk) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vaski: plakanu “diskveida” gabalu (diametrā apm. 8. mm) novieto uz salvetes, kas samitrināta ar 15 µl H_2O.	šķidrumi un viskozas vielas: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) ar neilona tīkliņu *Testējamās ķimikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu* cietas vielas: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) vaskainas/lipīgas vielas: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) ar neilona tīkliņu	šķidrumi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) ar neilona tīkliņu *Testējamās ķimikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu* puscietas vielas: 50 µl (83,3 µl/cm^2) cietas vielas: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (vai attiecīgā gadījumā vairāk) vaskainas vielas: plakanu “diskveida” gabalu (diametrā apm. 8. mm) novieto uz salvetes, kas samitrināta ar 15 µl H_2O.

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin*™	*EpiDerm*™ *SCT*	*SkinEthic*™ *RHE*	*epiCS*®
Priekšpārbaude attiecībā uz tiešo MTT reducēšanos	50 µl (šķidruma) vai 20 mg (cietas vielas)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml šķīduma uz 180 ± 5 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas)+ 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem	40 µl (šķidruma) vai 20 mg (cietas vielas)+ 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 180 ± 15 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2 , gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas)+ 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem
Priekšpārbaude attiecībā uz krāsas interferenci	10 µl (šķidruma) vai 10 mg (cietas vielas) + 90 µl H_2O, maisīts 15 min istabas temperatūrā → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas) + 300 µl H_2O uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	40 µl (šķidruma) vai 20 mg (cietas vielas) + 300 µl H_2O, maisīts 60 min istabas temperatūrā → ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas) + 300 µl H_2O uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem
Ekspozīcijas laiks un temperatūra	3 min, 60 min (± 5 min) un 240 min (± 10 min) vēdināmā skapī istabas temperatūrā (IT, 18–28°C)	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %
Skalošana	25 ml 1 x fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (2 ml / izsviešana)	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin*™	*EpiDerm*™ *SCT*	*SkinEthic*™ *RHE*	*epiCS*®
Negatīvā kontrole	50 µl NaCl šķīduma (9 g/l) testēta ar katru ekspozīcijas laiku	50 µl H_2O testēta ar katru ekspozīcijas laiku	40 µl H_2O testēta ar katru ekspozīcijas laiku	50 µl H_2O testēta ar katru ekspozīcijas laiku
Pozitīvā kontrole	50 µl ledus etiķskābes testēšana tikai 4 stundas	50 µl 8N KOH testēta ar katru ekspozīcijas laiku	40 µl 8N KOH testēšana tikai 1 stundu	50 µl 8N KOH testēta ar katru ekspozīcijas laiku
MTT šķīdums	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubācijas laiks un temperatūra	180 min (± 15 min) 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min (± 15 min) 37°C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %
Ekstrahēšanas šķīdinātājs	500 µl paskābināta izopropanola (0,04 N HCl izopropanolā) (pilnīgi iegremdēti izolēti audi).	2 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpuses un apakšpuses)	1,5 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpuses un apakšpuses)	2 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpuses un apakšpuses)
Ekstrahēšanas laiks un temperatūra	istabas temperatūrā pa nakti, aizsargāti no gaismas	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin*™	*EpiDerm*™ *SCT*	*SkinEthic*™ *RHE*	*epiCS*®
Optiskā blīvuma lasījumi	570 nm (545 – 595 nm) bez references filtra	570 nm (vai 540 nm) bez references filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez references filtra	540 – 570 nm bez references filtra
Audu kvalitātes kontrole	18 stundas ilga apstrāde ar SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	apstrāde ar 1 % *Triton X-100* 4,08 stundas ≤ ET_{50} ≤ 8,7 stundas	apstrāde ar 1 % *Triton X-100* 4,0 stundas ≤ ET_{50} ≤ 10,0 stundas	apstrāde ar 1 % *Triton X-100* 2,0 stundas ≤ ET_{50} ≤ 7,0 stundas
Pieņemamības kritēriji	1. Ar negatīvo kontroli (NaCl) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,6 and ≤ 1,5 2. Tādiem audu replikātiem, kas 4 stundas eksponēti pozitīvajā kontrolē (ledus etiķskābe), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt ≤ 20 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB ≥ 0,3, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %.	1. Ar negatīvo kontroli (H_2O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,8 and ≤ 2,8 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt ≤ 15 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % mainības koeficientiem (*CV*) starp audu replikātiem jābūt ≤ 30 %.	1. Ar negatīvo kontroli (H_2O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,8 and ≤ 3,0 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu (un attiecīgā gadījumā 4 stundas) eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt < ≤ 15 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB ≥ 0,3, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %	1. Ar negatīvo kontroli (H_2O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,8 and ≤ 2,8 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu eksponēti pozitīvajāā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt < ≤ 20 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB ≥ 0,3, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %

3. papildinājums

TESTĒŠANAS MODEĻU VEIKTSPĒJA ATTIECĪBĀ UZ IEDALĪŠANU APAKŠKATEGORIJĀS

Tabulā zemāk norādīta šo četru testēšanas modeļu veiktspēja, kas aprēķināta uz tādu 80 ķimikāliju kopumu, kuras testējuši četri testa izstrādātāji. Aprēķinus izdarījis ESAO sekretariāts un pārskatījusi un par tiem vienojusies ekspertu apakšgrupa (21) (23).

Iedalīšana apakškategorijās ir iespējama ar testēšanas modeļiem *EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE* un *epiCS®* (proti, 1.A apakškategorija attiecībā pret 1.B un 1.C apakškategoriju un attiecībā pret NK).

Šo četru testa modeļu veiktspēja, pārspīlētas klasificēšanas rādītāji, nepietiekami prasīgas klasificēšanas rādītāji un pareizība (prognozētspēja) to 80 ķimikāliju kopumam, kuras attiecībā uz katru testa modeli testētas 2 vai 3 reizes:

STATISTIKA PAR PROGNOZĒM, KAS IEGŪTAS PAR VISU ĶIMIKĀLIJU KOPUMU

(n = 80 ķimikālijas, kas vairāk nekā divās neatkarīgās izpildes reizēs testētas ar *epiCS®* vai trijās neatkarīgās izpildes reizēs attiecībā uz *EpiDerm™ SCT, EpiSkin™* un *SkinEthic™ RhE*, proti, attiecīgi 159 (*) vai 240 klasifikācijas)

	EpiSkin™	*EpiDerm ™*	*SkinEthic™*	*epiCS®*
Pārspīlētas klasificēšanas gadījumi:				
1B un 1.C pārspīlēti klasificēti par 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
Nekodīgas vielas pārspīlēti klasificētas par 1.B un 1.C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
Nekodīgas vielas pārspīlēti klasificētas par 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Viela pārspīlēti klasificēta par kodīgu vielu.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Vispārējais pārspīlētas klasificēšanas līmenis (visām kategorijām)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Nepietiekami prasīgas klasificēšanas gadījumi:				
1.A nepietiekami prasīgi klasificēta par 1.B un 1.C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A nepietiekami prasīgi klasificēta par nekodīgu	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B un 1.C nepietiekami klasificētas par nekodīgām	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Vispārējais nepietiekami prasīgas klasificēšanas līmenis (visām kategorijām)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Pareiza klasifikācija:				
Pareizi klasificēta 1.A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Pareizi klasificēta 1.B un 1.C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Pareizi klasificēta nekodīga viela	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Kopējā pareizība	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NK: nekodīga

(*) sakarā ar nepieejamību viena ķimikālija ar *epiCS®* testēta vienreiz (23)

4. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO *RHE* AUDIEM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS *HPLC/UPLC* SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Saskaņā ar *FDA* norādījumiem izstrādāts protokols (37) (38)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem dzīviem *RhE* audiem), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem nedzīviem *RhE* audiem) analīze	$Laukums_{interference} \leq 20\ \%$ no $lauku\text{-}ma_{LLOQ}$ ([1])
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	$CV \leq 15\ \%$ vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20\ \%$
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% novirze ≤ 15 % vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20\ \%$
Matricas ietekme	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	$85\ \% \leq$ matricas ietekme % $\leq 115\ \%$
Pārnesums	Izopropanola analīze, ko izdara pēc $ULOQ^2$ standarta analīzes ([2])	$Laukums_{interference} \leq 20\ \%$ no $lauku\text{-}ma_{LLOQ}$
Reproducējamība (vienā un tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no *ULOQ*, t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % novirze ≤ 15 % vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20\ \%$ Kvalitātes kontroles: % Novirze ≤ 15 % un $CV \leq 15\ \%$
Reproducējamība (pa dienām)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīgā stabilitāte *RhE* audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	% novirze ≤ 15 %
MTT formazāna ilglaicīgā stabilitāte *RhE* audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas noteiktā temperatūrā (piem., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% novirze ≤ 15 %”

([1]) *LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu audu dzīvotspēju 1–2 %, proti, 0,8 µg/ml.
([2]) *ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas saskaņā ar definīciju vismaz divreiz pārsniedz augstāko gaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos, proti, 200 µg/ml.

(7) B daļā B.46. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.46. **ĀDAS KAIRINĀJUMA NOTEIKŠANA AR CILVĒKA EPIDERMAS REKONSTRUKCIJAS MODEĻA *IN VITRO* TESTU**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 439 (2015). Ādas kairinājums ir atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1])]. Šajā testēšanas metodē aprakstīta *in vitro* procedūra, ko var izmantot kairinošu ķimikāliju (vielu un maisījumu) bīstamības identificēšanai saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* 2. kategoriju (2). Reģionos, kas nepieņem fakultatīvo ANO *GHS* 3. kategoriju (vāji kairinātāji), šo testēšanas metodi var izmantot arī neklasificētu ķimikāliju identificēšanai. Tāpēc atkarībā no tiesiskā regulējuma un izmantotās klasifikācijas sistēmas šo testēšanas metodi var izmantot, lai noteiktu ķimikāliju spēju izraisīt ādas kairinājumu; to izmanto vai nu kā atsevišķu aizstājējtestu *in vivo* ādas kairinājuma testēšanai, vai kā daļēju aizstājējtestu testēšanas stratēģijas ietvaros (3).

2. Ādas kairinājumu parasti novērtē, izmantojot laboratorijas dzīvniekus [TM B.4, kas ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404, kura sākotnēji pieņemta 1981. gadā un pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā] (4). Kodīguma testēšanai ir pieņemtas trīs validētas *in vitro* testēšanas metodes: ES TM B.40 (ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 430), TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 431) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 435) (5) (6) (7). *ESAO* norādījumu dokuments par integrētām pieejām testēšanai un novērtēšanai attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu (*IATA*) apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (3).

3. Šī testēšanas metode pievēršas tādam cilvēka veselības beigupunktam kā ādas kairinājums. Tās pamatā ir *in vitro* testēšanas sistēma, kurā izmanto cilvēka epidermas rekonstrukcijas modeļus (*RhE*), kuru bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības ir ļoti līdzīgas cilvēka ādas virsējās daļas, t. i., epidermas, īpašībām. Lai rekonstruētu epidermas modeli, kam ir reprezentatīva histoloģija un citoloģiskā arhitektūra, *RhE* testēšanas sistēmā par šūnu avotu izmanto nepārveidotus cilvēka keratinocītus. Ir pieejami veiktspējas standarti (VS), kas atvieglo līdzīgu un modificētu *RhE* testēšanas metožu validēšanu un novērtēšanu saskaņā ar ESAO norādījumu dokumenta Nr. 34 principiem (8) (9). Attiecīgā testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2010. gadā, 2013. gadā atjaunināta, lai tajā iekļautu papildu *RhE* modeļus, un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un ieviestu alternatīvu procedūru, ko izmanto dzīvotspējas mērīšanai.

4. Pirmsvalidēšanas, optimizēšanas un validēšanas pētījumi ir pabeigti attiecībā uz četriem komerciāli pieejamiem *in vitro* testa modeļiem (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), kuru pamatā ir *RhE* testēšanas sistēma (jutība 80 %, specifiskums 70 % un precizitāte 75 %). Minētie četri testa modeļi ir iekļauti šajā TM un norādīti 2. papildinājumā, kurā sniegta arī informācija par tā validēšanas pētījuma veidu, kas izmantots attiecīgo testēšanas metožu validēšanai. Kā norādīts 2. papildinājumā, šīs testēšanas metodes un veiktspējas standartu (8) izstrādē ir izmantota validētā references metode (VRM).

5. ESAO datu savstarpējā atzīšana tiks nodrošināta tikai attiecībā uz testa modeļiem, kas validēti saskaņā ar veiktspējas standartiem (8), ja minētos testa modeļus ESAO ir pārskatījusi un pieņēmusi. Šajā testēšanas metodē iekļautos testa modeļus un attiecīgo ESAO *TG* var bez izšķirības izmantot, lai, turklāt izmantojot datu savstarpējās atzīšanas priekšrocības, izpildītu valstu prasības attiecībā uz testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot *in vitro* testēšanas metodes ādas kairinājuma noteikšanai.

6. Šajā dokumentā izmantoto terminu definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

7. Kā liecina pilnīgais provizoriskās validācijas pētījums, kurā novērtētas un raksturotas *RhE* testēšanas metodes (16), minētās testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka tā nenodrošina iespēju ķimikālijas klasificēt fakultatīvajā ANO *GHS* 3. kategorijā (vāji kairinātāji) (1). Tāpēc šīs testēšanas metodes izmantošanas veids būs atkarīgs no dalībvalstu tiesiskā regulējuma. Kas attiecas uz ES, 3. kategorija *CLP* regulā nav iekļauta. Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (3). Ir atzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst nacionālām un starptautiskām ētiskajām normām un nosacījumiem.

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

8. Šī testēšanas metode pievēršas tādam cilvēka veselības beigupunktam kā ādas kairinājums. Lai gan tā nesniedz pietiekamu informāciju par ādas koroziju, tomēr jānorāda, ka TM B.40a par ādas koroziju (līdzvērtīga ESAO *TG* Nr. 431) pamatojas uz tādu pašu *RhE* testēšanas sistēmu, bet izmanto citu protokolu (6). Šīs testēšanas metodes pamatā ir *RhE* modeļi, kuros izmanto cilvēka keratinocītus un kuri tādējādi *in vitro* pārstāv attiecīgās sugas mērķorgānu. Tā turklāt tiešā veidā aptver iekaisuma kaskādes/mehānisma sākotnējo posmu norisēs (šūnu un audu bojājumi, kuru rezultāts ir lokalizēta trauma), kuras notiek, kairinājumam rodoties *in vivo*. Ar šo testēšanas metodi saistītajā validēšanas procesā ir testēts plašs ķimikāliju spektrs, un validēšanas pētījuma datubāze aptver kopumā 58 ķimikālijas (16)(18)(23). Šī testēšanas metode ir izmantojama cietvielām, šķidrumiem, pusšķidrām vielām un vaskiem. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietvielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietvielas pirms aplicēšanas jāsamaļ smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Validācijas pētījumā vēl nav novērtētas gāzes un aerosoli (29). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar *RhE* tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

9. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt. Tomēr maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāvu spektru un patlaban par maisījumu testēšanu sevišķi daudz informācijas nav pieejams, tāpēc, ja var pierādīt, ka kādai konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, ko piedāvā *Eskes* u. c., 2012. g.) (30) attiecīgā testēšanas metode nav izmantojama, šo testēšanas metodi šai konkrētajai maisījumu kategorijai nevajag izmantot. Līdzīga rūpība jāievēro gadījumos, kad ir konstatēta konkrētu ķimikāliju klašu vai fizikālķīmisko īpašību nepiemērotība pašreizējai testēšanas metodei.

10. Testējamās ķimikālijas, kas gaismu absorbē tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns, un testējamās ķimikālijas, kas vitālo krāsvielu MTT spēj tieši reducēt (līdz MTT formazānam), var ietekmēt šūnu dzīvotspējas mērījumus un tādēļ koriģēšanai var būt nepieciešams izmantot pielāgotas kontroles (sk. 28.–34. punktu).

11. Vienai atsevišķai testēšanas reizei ar trim audu replikātiem jābūt pietiekamai gadījumos, kad testējamās ķīmiskās vielas klasifikācija ir nepārprotama. Tomēr ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, replikātu mērījumiem trūkst konkordances un/vai vidējā procentuālā dzīvotspēja ir 50 ± 5 %, jāapsver, vai nav vajadzīga otrā testēšanas reize, kā arī vai nav vajadzīga trešā, ja nesakrīt abu pirmo divu testēšanas reižu rezultāti.

TESTA PRINCIPS

12. Testējamo ķimikāliju topikāli aplicē uz trīsdimensiju *RhE* modeļa, kuru veido nepārveidoti cilvēka epidermas keratinocīti, kas kultivēti tā, lai veidotos labi diferencēts daudzslāņains cilvēka epidermas modelis. Tam ir bazālais, spinālais un granulārais slānis, vairākslāņu *stratum corneum* ar lamelāriem lipīdu starpšūnu slāņiem, kuru uzbūve ir reprezentatīva galvenajām lipīdu klasēm *in vivo*.

13. Ķimikāliju izraisīts ādas kairinājums, kas izpaužas galvenokārt kā eritēma un tūska, ir notikumu kaskādes rezultāts, kuras sākums ir ķimikāliju penetrācija caur *stratum corneum*, kur tās var radīt bojājumus apakšējos keratinocītu un citu ādas šūnu slāņos. Bojātās šūnas var vai nu izdalīt iekaisuma mediatorus, vai izraisīt iekaisuma kaskādi, kas skar arī dermā esošās šūnas, jo īpaši asinsvadu stromālās un endoteliālās šūnas. Novēroto eritēmu un tūsku izraisa endoteliālo šūnu dilatācija un pieaugošā caurlaidība (29). Uz *RhE* balstītas testēšanas metodes ļauj bez vaskularizācijas *in vitro* testēšanas sistēmā, izmantojot šūnu dzīvotspējas rādījumus, mērīt kaskādes iniciācijas notikumus, piemēram, šūnu/audu bojājumus (16) (17).

14. Šūnu dzīvotspēju *RhE* modeļos mēra pēc vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais; *CAS* Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu audu ekstraktā nosaka kvantitatīvi (31). Kairinošas ķimikālijas tiek klasificētas pēc to spējas šūnu dzīvotspēju samazināt zemāk par noteiktu robežvērtību (t. i., ≤ 50 %, ANO *GHS* / *CLP* 2. kategorija). Atkarībā no tiesiskā regulējuma un testēšanas metodes piemērojamības ķimikālijas, kuru iedarbībā šūnu dzīvotspēja pārsniedz noteikto robežvērtību, var uzskatīt par kairinājumu neizraisošām (t. i., > 50 %, neklasificētas vielas).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

15. Pirms kādu no četriem šai testēšanas metodei atbilstošajiem validētajiem testa modeļiem (2. papildinājumā) sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, izmantojot 1. tabulā ieteiktās 10 standartvielas. Gadījumos, kad, piemēram, kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (8)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji. Alternatīvas standartvielas izmantošana ir jāpamato.

16. Ieteicams, lai kompetences pārbaudes ietvaros lietotāji pēc audu saņemšanas verificētu šo audu barjerfunkciju, kā precizējis *RhE* modeļa ražotājs. Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audu sūtījums veicis tālu ceļu vai aizņēmis ilgu laiku. Kad testēšanas metode ir sekmīgi ieviesta un tās izmantošanas prasme apgūta un uzskatāmi parādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt regulāri. Tomēr, ja testēšanas metodi izmanto parastajā praksē, ir ieteicams turpināt regulāri novērtēt barjerfunkciju.

1. tabula

Standartvielas ([1])

Viela	*CAS* Nr.	*In vivo* punkti ([2])	Agregātstāvoklis	ANO *GHS* kategorija
NEKLASIFICĒTAS VIELAS (ANO *GHS* nekategorizētas vielas)				
naftalīnetiķskābe	86-87-3	0	Ciets	Nekat.
izopropanols	67-63-0	0,3	Šķidrs	Nekat.
metilstearāts	112-61-8	1	Ciets	Nekat.
heptilbutirāts	5870-93-9	1,7	Šķidrs	Nekat. (*Fakult. 3. kat.*) ([3])
heksilsalicilāts	6259-76-3	2	Šķidrs	Nekat. (*Fakult. 3. kat.*) ([3])
KLASIFICĒTAS VIELAS (ANO *GHS* 2. kategorija)				
ciklamenaldehīds	103-95-7	2,3	Šķidrs	2. kat.
1-bromheksāns	111-25-1	2,7	Šķidrs	2. kat.
kālija hidroksīds (5 % ūd.)	1310-58-3	3	Šķidrs	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazīns	5271-27-2	3,3	Ciets	2. kat.
heptanāls	111-71-7	3,4	Šķidrs	2. kat.

([1]) Standartvielas ir validēšanas pētījumā izmantotu vielu apakškopa, un tās izraugās pēc šādiem kritērijiem: i) ķīmiskās vielas ir komerciāli pieejamas, ii) tās ir visam Dreiza [*Draize*] kairinājuma skalas diapazonam reprezentatīvas (no nekairinošām līdz stipri kairinošām), iii) tās ir ar precīzi noteiktu ķīmisko struktūru, iv) vielas ir reprezentatīvas validēšanas procesā izmantotajām ķīmiskajām funkcijām, v) tās vairākās testēšanas reizēs un vairākās laboratorijās devušas reproducējamus *in vitro* rezultātus, vi) par tām ir iegūtas pareizas prognozes *in vitro* un vii) tās nav ārkārtīgi toksiskas (piem., kancerogēnas vai reproduktīvajai sistēmai toksiskas) un to utilizācijas izmaksas nav pārlieku augstas.

([2]) *In vivo* punkti saskaņā ar TM B.4 (4).

([3]) Pēc šīs testēšanas metodes atsevišķi neklasificē vielas, ko var klasificēt ANO *GHS* 3. kat. (vāji kairinātāji) (1).

PROCEDŪRA

17. Turpmāk aprakstīti ādas kairinājuma noteikšanai izmantojamās *RhE* testēšanas metodes komponenti un procedūras (sk. arī 3. papildinājumu par parametriem, kas attiecas uz katru testa modeli). Par četriem šai testēšanas metodei atbilstīgajiem modeļiem ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*) (32) (33) (34) (35).

RHE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgi nosacījumi

18. Epitēlija rekonstruēšanai jāizmanto nepārveidoti cilvēka keratinocīti. Zem funkcionāla *stratum corneum* jābūt vairākiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu slāņiem (bazālajam slānim, *stratum spinosum, stratum granulosum*). *Stratum corneum* jābūt vairākslāņainam, ar tādu esenciālo lipīdu profilu, lai izveidotos funkcionējoša barjera, kura ir pietiekami robusta, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, nātrija dodecilsulfāta (SDS) vai *Triton X-100*, ātru penetrēšanos. Barjerfunkcija ir uzskatāmi jāparāda, un to var novērtēt, nosakot koncentrāciju, kurā etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika samazina audu dzīvotspēju par 50 % (IC_{50}), vai nosakot ekspozīcijas laiku, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (ET_{50}). *RhE* modeļa aizturēšanas īpašībām jānovērš ap *stratum corneum* esošā materiāla pāreja dzīvotspējīgos audos, kuras dēļ var tikt nepareizi modelēta ekspozīcija uz ādu. *RhE* modelis nedrīkst būt kontaminēts ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Funkcionāli nosacījumi

Dzīvotspēja

19. Dzīvotspējas kvantificēšanai izmanto MTT testu (31). *RhE* audu modeļa dzīvotspējīgās šūnas var vitālo krāsvielu MTT reducēt par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm, kuras pēc tam tiek ekstrahētas no audiem, izmantojot izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju). Ekstrakcijas šķīdinātāja optiskajam blīvumam (*OD*) jābūt pietiekami mazam, t. i., $OD < 0,1$. Ekstrahēto MTT formazānu var kvantificēt, izmantojot vai nu standartabsorbcijas (*OD*) mērīšanu, vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (36). *RhE* modeļa lietotājiem jānodrošina, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst negatīvās kontroles vajadzībām definētajiem kritērijiem. *RhE* modeļa izstrādātājs/piegādātājs nosaka negatīvās kontroles *OD* vērtību pieņemamības diapazonu (augšējā un apakšējā robežvērtība) (ādas kairinājuma noteikšanai izmantojamās testēšanas metodes apstākļos). Pieņemamības diapazoni šajā testēšanas metodē iekļautajiem četriem validētajiem *RhE* modeļiem ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam negatīvās kontroles *OD* diapazoni, kas norādīti 2. tabulā, jāizmanto par negatīvās kontroles pieņemšanas kritēriju. Jādokumentē ar negatīvo kontroli apstrādāto audu stabilitāte kultūrā (jābūt ar salīdzināmiem dzīvotspējas rādītājiem) visas testa ekspozīcijas perioda laikā.

2. tabula

Šajā TM iekļauto testa modeļu negatīvās kontroles *OD* vērtību pieņemamības diapazoni

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
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

Barjerfunkcija

20. *Stratum corneum* un tā lipīdsastāvam jābūt pietiekamam, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, SDS vai *Triton X-100*, strauju penetrēšanos, un to nosaka ar IC_{50} vai ET_{50} (3. tabula).

Morfoloģija

21. Jāveic *RhE* modeļa histoloģiski izmeklējumi, kas uzskatāmi parāda modeļa līdzību cilvēka epidermas struktūrai (ieskaitot vairākslāņu *stratum corneum*).

Reproducējamība

22. Testēšanas metodes pozitīvās un negatīvās kontroles rezultātiem uzskatāmi jāparāda reproducējamība laikā.

Kvalitātes kontrole (QC)

23. *RhE* modelis jāizmanto tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs uzskatāmi parāda, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst definētajiem produkcijas pieņemamības kritērijiem, kuru vidū svarīgākie ir *dzīvotspēja* (19. punkts), *barjerfunkcija* (20. punkts) un *morfoloģija* (21. punkts). Šie dati jādara pieejami testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju iekļautu testēšanas pārskatā. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka IC_{50} vai ET_{50} vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Kairinātāja klasifikācijas prognozēšanai ir derīgi tikai ar prasībām atbilstošiem audu modeļiem iegūtie rezultāti. Pieņemamības diapazoni šajā TM iekļautajiem četriem testa modeļiem ir norādīti 3. tabulā.

3. tabula

Šajā TM iekļauto testa modeļu partiju *QC* pieņemamības kritēriji

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™ (SM) (18 stundu apstrāde ar SDS)(32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % *Triton X-100*)(33)	ET_{50} = 4,0 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 stundu apstrāde ar SDS)(35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Testējamo un kontroles ķimikāliju aplicēšana

24. Katrai testējamai ķimikālijai un kontrolei katrā izpildes reizē vajadzīgi vismaz trīs replikāti. Testējamās ķimikālijas, kas ir šķidras vai cietas vielas, uz epidermas virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, t. i., no 26 līdz 83 µl/cm^2 vai mg/cm^2, raugoties, lai deva nebūtu pārmērīga (sk. 3. papildinājumu). Pirms cietu ķimikāliju aplicēšanas epidermas virsma jāsamitrina ar dejonizētu vai destilētu ūdeni, lai nodrošinātu labāku testējamās ķimikālijas un epidermas virsmas kontaktu. Ja iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Dažos gadījumos vielas izlīdzināšanai var izmantot neilona tīkliņu (sk. 3. papildinājumu). Ekspozīcijas perioda beigās testējamā ķimikālija no epidermas virsmas rūpīgi jānoskalo ar buferšķīdumu vai 0,9 % NaCl. Atkarībā no izmantotā *RhE* testa modeļa ekspozīcijas periods ilgst no 15 līdz 60 minūtēm un inkubācijas temperatūra ir no 20 līdz 37 °C. Minētos ekspozīcijas periodus un temperatūras optimizē katrai *RhE* testēšanas metodei atsevišķi, un tie reprezentē testa modeļu atšķirīgās būtiskās īpašības (piemēram, barjerfunkcija) (sk. 3. papildinājumu).

25. Katrā izpildes reizē jāizmanto paralēlā negatīvā kontrole (*NC*) un pozitīvā kontrole (*PC*), lai uzskatāmi parādītu, ka audu dzīvotspēja (izmanto *NC*), barjerfunkcija un no tās izrietošais audu jutīgums (izmanto *PC*) atbilst noteiktam vēsturiskam pieņemamības diapazonam. Ieteicamā *PC* ir SDS 5 % šķīdums ūdenī. Ieteicamā NK ir ūdens vai fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (PBS).

Šūnu dzīvotspējas mērījumi

26. Saskaņā ar testa procedūru ir svarīgi, lai dzīvotspējas mērīšana tiktu veikta nevis tūlīt pēc testējamās ķimikālijas ekspozīcijas, bet gan pēc tam, kad ir pagājis pietiekami ilgs noskaloto audu pēcapstrādes inkubācijas periods jaunā barotnē. Minētajā periodā izzūd vājas citotoksiskas iedarbības pazīmes un parādās nepārprotamas citotoksiskas iedarbības izpausmes. Optimizējot divus no šai testēšanas metodei pamatā esošajiem *RhE* testa modeļiem, tika konstatēts, ka optimāls ir 42 stundu ilgs pēcapstrādes inkubācijas periods (11) (12) (13) (14) (15).

27. Šūnu dzīvotspējas mērīšanai saskaņā ar šo testēšanas metodi izmantojamā standartizētā kvantitatīvā metode ir MTT tests. Tā ir audu trīsdimensiju modelim piemērota metode. Audu paraugu uz 3 stundām ievieto atbilstošas koncentrācijas (piemēram, 0,3–1 mg/ml) MTT šķīdumā. Dzīvotspējīgās šūnas pārveido MTT par zilas krāsas formazānu. Pēc tam veic nogulsnētā zilas krāsas formazāna produkta ekstrakciju ar šķīdinātāju (piemēram, izopropanolu vai paskābinātu izopropanolu) un nosaka formazāna koncentrāciju, mērot optisko blīvumu pie viļņa garuma 570 nm ± 30 nm vai izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 34. punktu) (36).

28. Testējamās ķimikālijas optiskās īpašības vai ķīmiskā iedarbība uz MTT (piemēram, ķimikālija var gan kavēt, gan veicināt krāsas veidošanos vai atkrāsošanos) var traucēt testu, un tāpēc dzīvotspēja var būt noteikta nepareizi. Tas var notikt gadījumos, kad testējamo ķimikāliju pilnībā nenoskalo no audiem vai tad, ja tā penetrējas epidermā. Ja testējamā ķimikālija tieši iedarbojas uz MTT (piemēram, MTT reducētājs), tai ir dabiska krāsa vai krāsa izveidojas ekspozīcijas laikā, testējamās ķimikālijas radīto dzīvotspējas mērījumu traucējumu noteikšanai un korekcijām jāizmanto papildu kontroles (sk. 29. un 33. punktu). Darba standartprocedūrās par šajā testēšanas metodē iekļautajiem četriem validētajiem modeļiem ir pieejams sīks apraksts par to, kā koriģēt tiešo MTT redukciju un interferenci, ko rada krāsvielas (32) (33) (34) (35).

29. Lai noteiktu tiešos MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi sagatavotam MTT šķīdumam. Ja testējamo ķimikāliju saturošais MTT maisījums iekrāsojas zilā/violetā krāsā, uzskata, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un jāveic no standartabsorbcijas (*OD*) mērīšanas vai *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūras neatkarīga nedzīvotspējīgo *RhE* šūnu funkcionāla pārbaude. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nedzīvus audus, kam piemīt tikai reziduāla metaboliska aktivitāte, taču tie testējamo ķimikāliju absorbē līdzīgi kā dzīvotspējīgi audi. Katru MTT reducējošu testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem nedzīvo audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru ar mērķi ģenerēt nespecifisku MTT redukciju (*NSMTT*) (32) (33) (34) (35). Neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu/izpildes reižu skaita katrai testējamajai ķimikālijai ir pietiekami veikt vienu *NSMTT* kontroli. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem, atņemot nespecifiskas MTT redukcijas procentus, kas iegūti ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nedzīviem audiem un aprēķināti attiecībā pret negatīvo kontroli, kas veikta paralēli koriģējamajam testam (*%NSMTT*).

30. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas, kurām ir krāsa, vai testējamās ķimikālijas, kuras krāsu iegūst, nonākot saskarē ar ūdeni vai izopropanolu, un lemtu par papildu kontroļu nepieciešamību, jāveic testējamās ķimikālijas spektrālanalīze ūdenī (ekspozīcijas vide) un/vai izopropanolā (ekstrakcijas šķīdums). Ja testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē gaismu 570 ± 30 nm diapazonā, jāveic turpmākas krāsvielu kontroles vai arī jāizmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūra, kuras gadījumā kontroles nav vajadzīgas (sk. 33. un 34. punktu). Mērot standartabsorbciju (OD), katru interferējošo iekrāsoto testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču, lai iegūtu nespecifiskas krāsas (NSC_{living}) kontroli, MTT inkubācijas solī tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Ņemot vērā dzīvajiem audiem raksturīgo bioloģisko mainību, NSC_{living} kontrole jāveic paralēli iekrāsotās ķimikālijas testēšanai un vairākkārtējas testēšanas gadījumā katram veiktajam testam (katrā izpildes reizē) jāveic neatkarīga NSC_{living} kontrole. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem, atņemot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamajam testam inkubēti barotnē bez MTT ($\%NSC_{living}$).

31. Mērot tādu testējamo ķimikāliju standartabsorbciju (*OD*), par kurām konstatēts, ka tās gan tieši reducē MTT (sk. 29. punktu), gan izraisa krāsu interferenci (sk. 30. punktu), papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām *NSMTT* un NSC_{living} kontrolēm jābūt arī kādam trešajam kontroļu kopumam. Tas parasti attiecas uz MTT testu traucējošām tumšas (piem., zilas, violetas, melnas) krāsas testējamajām ķimikālijām, jo tām raksturīgās krāsas dēļ ir grūti novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 29. punktā. Šīs testējamās ķimikālijas var piesaistīties gan

dzīviem, gan nedzīviem audiem, un tāpēc ar *NSMTT* kontroli var koriģēt ne tikai iespējamu tiešu MTT redukciju, ko izraisa testējamā ķimikālija, bet arī krāsas interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas piesaistīšanās nedzīviem audiem. Tā rezultātā var notikt dubulta krāsas interferences korekcija, jo ar NSC_{living} kontroli jau tiek koriģēta krāsas interference, ko rada testējamās ķimikālijas piesaistīšanās dzīviem audiem. Lai izvairītos no iespējamas dubultas krāsas interferences korekcijas, ir jāveic trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nedzīvos audos (NSC_{killed}). Šajā papildu kontrolē testējamo ķimikāliju izmanto vismaz diviem nedzīvu audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Katrai ķimikālijai neatkarīgi no veikto testu/izpildes reižu skaita ir pietiekami veikt vienu NSC_{killed} kontroli, taču tā jāveic paralēli *NSMTT* kontrolei un, ja iespējams, ar to pašu audu partiju. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *%NSMTT* un $\%NSC_{living}$ un pieskaitot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nedzīviem audiem un aprēķināti attiecībā pret negatīvo kontroli, kas veikta paralēli koriģējamajam testam ($\%NSC_{killed}$).

32. Svarīgi atzīmēt, ka nespecifiskas MTT redukcijas un nespecifiskas krāsas interferenču dēļ var tikt iegūti audu ekstrakta rādījumi, kas pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu. Tādēļ katrai laboratorijai pirms regulatīvos nolūkos veicamas testējamo ķimikāliju testēšanas sākšanas jānosaka sava spektrofotometra linearitātes diapazons, izmantojot komerciāli pieejamu MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7). Gadījumos, kad tādu audu ekstraktu optiskais blīvums, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju, neveicot korekcijas par tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, ir spektrofotometra lineārā diapazona robežās vai ar testējamo ķimikāliju iegūtā nekoriģētā dzīvotspēja procentos jau ir ≤ 50 %, tiešo MTT reducētāju un interferējošas krāsas testējamo ķimikāliju novērtēšanai ir atbilstoši veikt standartabsorbcijas (*OD*) mērījumus ar spektrofotometru. Tomēr par testējamām ķimikālijām iegūtie rezultāti, kas uzrāda *%NSMTT* un/vai $\%NSC_{living} \geq 50\ \%$ no negatīvās kontroles, būtu jāuztver piesardzīgi, jo tos izmanto par robežvērtību klasificēto un neklasificēto ķimikāliju nošķiršanai (sk. 36. punktu).

33. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa un kuras nav piemērotas standarta absorbcijas (*OD*) mērījumiem, jo pārāk lielā mērā interferē ar MTT testu, MTT formazāna mērīšanai var izmantot alternatīvo *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 34. punktu) (36). *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēma ļauj pirms kvantificēšanas MTT formazānu atdalīt no testējamās ķimikālijas (36). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrija, NSC_{living} vai NSC_{killed} kontroles nav jāveic. Taču, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, vai tai ir krāsa, kas traucē novērtēt ķimikālijas spēju tieši reducēt MTT (kā aprakstīts 29. punktā), ir jāizmanto *NSMTT* kontroles. Izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai, audu dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, un MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, attiecību procentos. Testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *%NSMTT*. Visbeidzot jāatzīmē, ka tiešos MTT reducētājus, kuri arī var radīt krāsas interferenci, kurus pēc apstrādes saglabā audos un kuri reducē MTT tik spēcīgi, ka testētā audu ekstrakta *OD* (izmantojot standarta *OD* mērīšanu) vai smailes laukumi (izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju) pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu, nevar novērtēt, taču šādi gadījumi ir ļoti reti.

34. *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai var izmantot arī ar visa veida ķimikālijām (ar krāsu, bez krāsas, MTT reducētāji un MTT nereducētāji) (36). Ņemot vērā *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu daudzveidību, pirms *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmanto, lai kvantificētu no audu ekstraktiem iegūtu MTT formazānu, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācijas atbilstība pieņemamības kritērijiem, kas noteikti kvalifikācijas standartparametru kopumam, kuru pamatā ir parametri, kas aprakstīti ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātājās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu (36) (37). Minētie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 4. papildinājumā. Ja ir izpildīti 4. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji, *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu MTT formazāna mērījumu veikšanai ar šajā testēšanas metodē aprakstītajiem eksperimentēšanas nosacījumiem.

Pieņemamības kritēriji

35. Katrai testēšanas metodei, kurā izmanto testēšanai derīgas *RhE* modeļu partijas (sk. 23. punktu), ar negatīvās kontroles vielu apstrādātajiem audiem noteiktajām optiskā blīvuma vērtībām jāraksturo šo audu kvalitāte visos nosūtīšanas un saņemšanas cikla posmos un visos protokola procesos. Optiskā blīvuma kontrolvērtības nedrīkst būt zemākas par vēsturiski noteiktajām robežvērtībām. Tāpat arī audiem, kas apstrādāti ar pozitīvās kontroles vielām, piemēram, SDS 5 % šķīdumu ūdenī, būtu jāatspoguļo to spēja reaģēt uz kairinošu ķimikāliju šīs testa metodes apstākļos (sk. 3. papildinājumu un papildinformāciju šajā *TG* iekļauto četru testa modeļu *SOP* (32) (33) (34) (35)). Saistītajiem attiecīgajiem audu replikātu mainības mērījumiem, t. i., standartnovirzēm, ir jāatbilst pieņemamības robežvērtībām, kas noteiktas izmantotajam testa modelim (sk. 3. papildinājumu).

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

36. Katrai testējamajai ķimikālijai iegūtās *OD* vērtības var izmantot dzīvotspējīgo šūnu daļas aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kuru pieņem par 100 %. Ja izmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju, audu dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, un MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, attiecību procentos. Precīzi jānosaka un jādokumentē šūnu dzīvotspējas robežvērtība, pēc kuras identificē un atšķir testējamās kairinošās ķimikālijas no šādi neklasificētajām ķimikālijām, kā arī testēšanas rezultātu izvērtēšanai izmantotās statistiskās procedūras, un uzskatāmi jāparāda to piemērotība (informācijai sk. testa modeļu *SOP*). Kairināmības prognozēšanas robežvērtības ir šādas:

— ja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas vidējā audu dzīvotspēja procentos ir mazāka nekā vai vienāda ar (≤) 50 %, ķimikāliju identificē kā tādu, kas jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* (2. kategorija vai 1. kategorija). Tā kā ar šajā testēšanas metodē iekļautajiem *RhE* testa modeļiem nav iespējams noteikt, vai ķimikālija ietilpst ANO *GHS* / *CLP* 1. vai 2. kategorijā, lēmuma pieņemšanai par galīgo klasifikāciju ir vajadzīga papildinformācija par ādas koroziju [sk. arī ESAO norādījumu dokumentu par *IATA* (3)]. Ja tiek konstatēts, ka testējamā ķimikālija nav kodīga (piemēram, pamatojoties uz *TM* 40, B.40a vai B.65), un audu dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas ir mazāka nekā vai vienāda ar (≤) 50 %, uzskata, ka testējamā ķimikālija izraisa tādu ādas kairinājumu, ka tā jāklasificē ANO *GHS* / *CLP* 2. kategorijā;

— ja audu dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas ir lielāka par (>) 50 %, atkarībā no dalībvalstu tiesiskā regulējuma var uzskatīt, ka testējamā ķimikālija neizraisa ādas kairinājumu un ANO *GHS* / *CLP* sistēmā ir neklasificēta viela.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

37. Par katru izpildes reizi, arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tos veic, tabulas veidā apkopo visus datus par visiem audu replikātiem (piemēram, optiskā blīvuma vērtības, procentos aprēķinātas šūnu dzīvotspējas datus par katru ķimikāliju un tās klasifikācijas datus). Par katru izpildes reizi jānorāda rezultāta vidējā vērtība ± standartnovirze. Par katru testējamo ķimikāliju jādokumentē novērotā iedarbība ar MTT reaģentu un testējamo ķimikāliju, kurai ir krāsa.

Testēšanas pārskats

38. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles ķimikālijas:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un papildu relevantās fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontroles ķimikāliju pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Izmantotais *RhE* modelis un protokols (un attiecīgās izvēles pamatojums)

Testa apstākļi:

— izmantotais *RhE* modelis (arī partijas numurs);

— MTT kvantificēšanai izmantotās mērierīces (piemēram, spektrofotometra) kalibrēšanas dati, viļņa garums un frekvenču joslas filtrs (attiecīgā gadījumā), un mērierīces linearitātes diapazons; MTT formazāna kvantificēšanai izmantotās metodes apraksts;

— *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalifikācijas apraksts (attiecīgā gadījumā); pilnīga papildinformācija par izmantoto *RhE* modeli un tā veiktspējas raksturlielumiem. No tiem jānorāda vismaz:

  i) dzīvotspēja;

  ii) barjerfunkcija;

  iii) morfoloģija;

  iv) reproducējamība un prognozējamība;

  v) modeļa kvalitātes kontroles (*QC*);

— vēsturiskie dati par modeli. No tiem jānorāda vismaz kvalitātes kontroles datu pieņemamība saskaņā ar vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem;

— apliecināta kompetence testēšanas metodes veikšanā, kura pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, veicot standartvielu testēšanu.

Testa procedūra:

— detalizēta informācija par izmantoto testa procedūru (arī par mazgāšanas procedūrām, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda); testējamās ķimikālijas deva un izmantotās kontroles;

— ekspozīcijas ilgums un temperatūra un pēcekspozīcijas inkubēšanas laiks;

— kontroles, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa (attiecīgā gadījumā);

— izmantoto audu replikātu skaits katrai ķimikālijai un kontrolei (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un *NSMTT*, NSC_{living} un NSC_{killed}, ja tāda veikta);

— apraksts par lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozes modeli, kas piemērots, pamatojoties uz izmantoto *RhE* modeli;

— testa procedūras (arī mazgāšanas procedūru) modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji:

— pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem; pieņemama mainība starp pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem;

— pieņemama mainība starp testējamai ķimikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Rezultāti:

— tabulā apkopoti dati par individuālu testējamo ķimikāliju par katru izpildes reizi un katru replikāta mērījumu, tostarp *OD* vai MTT formazāna smailes laukums, audu dzīvotspēja procentos, vidējā audu dzīvotspēja procentos un standartnovirze;

— attiecīgā gadījumā — to kontroļu rezultāti, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa, tostarp *OD* vai MTT formazāna smailes laukums, *%NSMTT*, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, standartnovirze, pareiza galīgā audu dzīvotspēja procentos;

— rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolēm, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem;

— jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: 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. Available at: 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) Šā pielikuma B.4. nodaļa "Akūts ādas kairinājums/korozija".

(5) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānā elektriskā pretestība (TEP)".

(6) Šā pielikuma B.40a nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: rekonstruētas cilvēka epidermas *RHE* tests"

(7) Šā pielikuma B.65. nodaļa "*In vitro* barjermembrānas testa metode".

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: 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. *N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

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

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

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

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

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (9).

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti, piemēram, šūnu mitohondriju dehidrogenāžu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais), kas atkarībā no nosakāmā testēšanas beigupunkta un izmantotā testēšanas plāna korelē ar dzīvo šūnu kopējo skaitu un/vai dzīvotspēju.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādu testa modeļu veiktspējas mērs, ar kuriem iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (9).

ET_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc ekspozīcijas laika, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (sk. arī IC_{50}).

***GHS* (Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma)**: sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

HPLC: augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija.

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

IC_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc etalonķimikālijas koncentrācijas, kurā audu dzīvotspēja pēc noteikta ekspozīcijas laika samazinās par 50 % (IC_{50}) (sk. arī ET_{50}).

Pārmērīga deva: uz epidermas aplicētās testējamās ķimikālijas daudzums, kas ir lielāks par epidermas virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilā tetrazolija bromīds.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NSC_{killed}: nespecifiska krāsa nedzīvos audos.

NSC_{living}: nespecifiska krāsa dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiska MTT redukcija.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testēšanas metodi, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (9).

PC: pozitīvā kontrole, replikāts, kuram ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (9).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorisko un starplaboratorisko reproducējamību (9).

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķimikālijām (9).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas vienlaikus testē ar negatīvu kontroli un pozitīvu kontroli.

Jutība: tā visu pozitīvo/aktīvo testējamo ķimikāliju daļa, kas ar testu tiek pareizi klasificētas. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Ādas kairinājums *in vivo*: atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām. Ādas kairinājums ir lokāla skarto ādas audu reakcija, kas parādās neilgi pēc kairinātāja iedarbības (38). To izraisa lokāla iekaisuma reakcija, kas saistīta ar ādas audu dabisko (nespecifisko) imūnsistēmu. Tā svarīgākā iezīme ir procesu atgriezeniskums, kas saistīti ar iekaisuma reakcijām un ar iekaisuma procesu saistītā kairinājuma raksturīgo klīnisko pazīmju (eritēma, tūska, nieze un sāpes) lielāko daļu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām testējamajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UPLC: īpaši augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

Šajā Testēšanas Metodē Iekļautie Testa Modeļi

Nr.	Testa modeļa nosaukums	Validācijas pētījuma veids	Atsauces
1	*EpiSkin™*	Pilnīgs provizoriskās validācijas pētījums (2003–2007). Šā modeļa komponenti tika izmantoti, lai noteiktu sākotnējo un atjaunināto *ECVAM* VS (39) (40) (21) (*) būtiskos testēšanas metodes komponentus. Turklāt metodes dati, kas saistīti ar neklasificēto/klasificēto vielu identifikāciju, veidoja galveno pamatu sākotnējo VS (*) specifiskuma un jutības vērtību noteikšanai.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	*EpiDerm™ SIT (EPI-200)*	*EpiDerm™* (*oriģināls*): šim testa modelim, tāpat kā 1. modelim, pilnīga provizoriskā validācija veikta 2003.–2007. gadā. Šā modeļa komponenti tika izmantoti, lai noteiktu sākotnējo un atjaunināto *ECVAM* VS (39) (40) (21) (*) būtiskos testēšanas metožu komponentus. ***EpiDerm™ SIT (EPI-200):*** Oriģinālā modeļa *EpiDerm™* modifikācija validēta, izmantojot sākotnējos *ECVAM* VS (21) 2008. gadā (*).	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	*SkinEthic™ RHE*	Validācijas pētījums balstīts uz sākotnējiem *ECVAM* veiktspējas standartiem (21) 2008. gadā (*) .	(2) (21) (22) (23) (31)
4	*LabCyte EPI-MODEL24 SIT*	Validācijas pētījums (2011–2012) balstīts uz ESAO *TG* Nr. 439 (8) veiktspējas standartiem (VS), kuri balstīti uz atjauninātajiem *ECVAM* VS (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) un šīs *TG* (8) veiktspējas standarti. (*)

(*) Sākotnējie *ECVAM* veiktspējas standarti (VS) (21) tika izstrādāti 2007. gadā pēc tam, kad bija pabeigts provizoriskās validācijas pētījums (16), kurā novērtēta 1. un 2. testa modeļa veiktspēja, pamatojoties uz klasifikācijas sistēmu, kas aprakstīta ES Bīstamo vielu direktīvas 28. grozījumā (41). 2008. gadā tika ieviesta ANO *GHS* (1) un ES *CLP*, un robežvērtība, ko izmanto neklasificētu vielu nošķiršanā no klasificētām vielām, mainīta no 2.0 uz 2.3 *in vivo* punktiem. Lai pielāgotos šīm mainītajām regulatīvajām prasībām, 2009. gadā tika atjauninātas *ECVAM* VS pareizības vērtības un references ķimikāliju saraksts (2) (39) (40). Tāpat kā sākotnējie VS, arī atjauninātie VS bija lielā mērā balstīti uz 1. un 2. modeļa datiem (16), taču papildus izmantoti 3. modeļa dati par references ķimikālijām. Atjauninātos *ECVAM* VS 2010. gadā izmantoja ar šo *TG* (8) saistīto VS noteikšanai. Šajā testēšanas metodē *EpiSkin™* tiek uzskatīts par *VRM*, jo to izmantoja visu VS kritēriju izstrādē. Detalizēta informācija par validācijas pētījumiem, iegūto datu apkopojums un pamatinformācija par VS pielāgojumiem, kas veicami pēc ANO *GHS*/*CLP* ieviešanas, atrodama *ECVAM*/*BfR* paskaidrojošajā pamatdokumentā, kas pievienots atbilstīgajai ESAO *TG* Nr. 439 (23).

SIT: ādas kairinājuma tests.

RHE: cilvēka epidermas rekonstrukcija.

3. papildinājums

PROTOKOLA PARAMETRI KATRAM ŠAJĀ TESTĒŠANAS METODĒ IEKĻAUTAJAM TESTA MODELIM

RhE modeļiem ir ļoti līdzīgi protokoli, un jo īpaši tiem visiem ir 42 stundu ilgs pēcinkubācijas periods (32) (33) (34) (35). Galvenokārt atšķiras trīs parametri, kas saistīti ar dažādajām testa modeļu barjerfunkcijām, proti, A) pirmsinkubācijas laiks un tilpums, B) testējamo ķimikāliju aplicēšana un C) pēcinkubācijas tilpums.

	EpiSkin™ (SM)	*EpiDerm™ SIT (EPI-200)*	*SkinEthic RHE™*	*LabCyte EPI-MODEL24 SIT*
A) Pirmsinkubācija				
Inkubācijas laiks	18–24 stundas	18–24 stundas	< 2 stundas	15–30 stundas
Vidējs tilpums	2 ml	0,9 ml	0,3 vai 1 ml	0,5 ml
B) Testējamās Ķimikālijas Aplicēšana				
Šķidrumi	10µl (26µl/cm^2)	30µl (47µl/cm^2)	16µl (32µl/cm^2)	25µl (83 µl/cm^2)
Cietvielas	10 mg (26 mg/cm^2) + *DW* (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + *DPBS* (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + *DW* (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + *DW* (25 µl)
Vai izmanto neilona tīkliņu?	Neizmanto	Vajadzības gadījumā izmanto	Izmanto	Neizmanto
Kopējais aplicēšanas laiks	15 minūtes	60 minūtes	42 minūtes	15 minūtes
Aplicēšanas temperatūra	*RT*	a) *RT* 25 minūtes b) 37°C 35 minūtes	*RT*	*RT*
C) Pēcinkubācijas tilpums				
Vidējs tilpums	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maksimālais pieļaujamais mainīgums				
Standartnovirze (*SD*) starp audu replikātiem	*SD*18	*SD*18	*SD*18	*SD*18

RT: istabas temperatūra.
DW: destilēts ūdens.
DPBS: Dulbeko fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums

4. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO RHE AUDIEM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS HPLC UPLC SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Protokols saskaņā ar *FDA* norādījumiem (36) (37)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem dzīviem *RhE* audiem), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem nedzīviem *RhE* audiem) analīze	$Laukums_{interference} \leq 20\ \%$ no $laukuma_{LLOQ}$ [1]
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	*CV* ≤ 15 % vai ≤ 20 % attiecībā uz *LLOQ*
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% novirze ≤ 15 % vai ≤ 20 % attiecībā uz *LLOQ*
Matrices efekts	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	85 % ≤ matrices efekts % ≤ 115 %
Pārnese	Izopropanola analīze pēc *ULOQ* [2] standarta	$Laukums_{interference} \leq 20\ \%$ no $laukuma_{LLOQ}$
Reproducējamība (tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no *ULOQ*, t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % novirze ≤ 15 % vai ≤ 20 % attiecībā uz *LLOQ* Kvalitātes kontroles: % novirze ≤ 15 % un *CV* ≤ 15 %
Reproducējamība (no vienas dienas otrā)	1. diena:: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena:: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena:: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīga stabilitāte *RhE* audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	%Novirze ≤ 15 %
MTT formazāna ilglaicīga stabilitāte *RhE* audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas noteiktā temperatūrā (piem., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	%Novirze ≤ 15 %”

[1] *LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu 1–2 % audu dzīvotspēju, proti, 0,8 µg/ml.
[2] *ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas ir vismaz divas reizes augstāka par lielāko sagaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos, proti, 200 µg/ml.

(8) B daļā pievieno šādas nodaļas:

"B.63. **REPRODUKTĪVĀS / ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 421 (2016). ESAO vadlīnijas par ķimikāliju testēšanu periodiski tiek pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Sākotnējā vadlīnija Nr. 421 par skrīninga testu tika pieņemta 1995. gadā, pamatojoties uz protokolu par "Sākotnējo reproduktīvā toksiskuma skrīninga testu", kas apspriests divās ekspertu sanāksmēs Londonā 1990. gadā (1) un Tokijā 1992. gadā (2).

2. Pēc tam, kad 1998. gadā ESAO tika sākta prioritāra darbība ar mērķi pārskatīt esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par endokrīno disruptoru skrīningu un testēšanu (3), šī testēšanas metode tika atjaunināta, iekļaujot tajā endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus. Piemēram, ESAO *TG* Nr. 407 (Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem, šā pielikuma B.7. nodaļa) 2008. gadā tika papildināta ar parametriem, kas piemēroti testējamo ķimikāliju endokrīnās aktivitātes noteikšanai. *TG* Nr. 421 tika atjaunināta, lai skrīninga *TG*, kur ekspozīcijas periodi aptver dažus jutīgos attīstības periodus (prenatālais vai agrīns postnatālais periods), iekļautu dažus endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus.

3. Izvēlētie endokrīnajiem disruptoriem relevantie papildu beigupunkti, kas ir daļa arī no *TG* Nr. 443 (Paplašinātais vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījums, šā pielikuma B.56. nodaļa), tika iekļauti *TG* Nr. 421, pamatojoties uz priekšizpēti, kurā aplūkoti zinātniski un tehniski jautājumi par minēto beigupunktu iekļaušanu, kā arī iespējamie testēšanas plānojuma pielāgojumi, kas vajadzīgi minēto beigupunktu iekļaušanai (4).

4. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai iegūtu ierobežotu informāciju par testējamās ķimikālijas ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām. Tā nav nedz alternatīva B.31., B.34., B.35. vai B.56. testēšanas metodei, nedz tās aizstāj.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Šo skrīninga testa metodi var izmantot, lai iegūtu sākotnējo informāciju par iespējamo ietekmi uz reprodukciju un/vai attīstību vai nu ķimikāliju toksikoloģisko īpašību novērtēšanas agrīnā posmā, vai par ķimikālijām, kas rada bažas. To var izmantot arī kā daļu no sākotnējo skrīninga testu kopuma attiecībā uz esošajām ķimikālijām, par kurām pieejams maz toksikoloģiskās informācijas vai tā nav pieejama vispār, vai kā devu diapazona noteikšanas pētījumu plašākiem reprodukcijas/ontoģenēzes pētījumiem; to var izmantot citos relevantos gadījumos. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un apsvērumi, kas noteikti ESAO norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (5).

6. Šī testēšanas metode nesniedz pilnīgu informāciju par visiem reprodukcijas un attīstības aspektiem. Konkrētāk, tā piedāvā tikai ierobežotus līdzekļus, ar ko detektēt prenatālās ekspozīcijas postnatālās izpausmes vai ietekmi, kas var rasties postnatālās ekspozīcijas laikā. Ņemot vērā dzīvnieku salīdzinoši mazo skaitu devas grupās, beigupunktu selektivitāti, pētījuma īso ilgumu un citus iemeslus, šī metode nesniedz pierādījumus galīgajiem apgalvojumiem par ietekmes neesību. Turklāt, ja nav datu no citiem reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes testiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku.

7. Rezultāti, kas iegūti par endokrīnajiem parametriem, ir jāaplūko ESAO endokrīni disruptīvu ķimikāliju testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara (6) kontekstā. Atjauninātā ESAO *TG* Nr. 421 ir iekļauta minētā konceptuālā satvara 4. līmenī, kur ietilpst *in vivo* testi, kas sniedz datus par nelabvēlīgu ietekmi uz endokrīnajiem beigupunktiem. Endokrīnu signālu pašu par sevi tomēr nevar uzskatīt par pietiekamu pierādījumu tam, ka testējamā ķimikālija ir endokrīnais disruptors.

8. Šajā testēšanas metodē izmanto perorālo testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Citu ekspozīcijas ceļu izmantošanas gadījumā var būt vajadzīgas modifikācijas.

9. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

10. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

11. Testējamo ķimikāliju pakāpeniski pieaugošās devās saņem vairākas tēviņu un mātīšu grupas. Tēviņiem testējamās ķimikālijas jādod vismaz četras nedēļas līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot); minētais laikposms aptver vismaz divas nedēļas pirms pārošanas, pārošanas periodu un aptuveni divas nedēļas pēc pārošanas. Ņemot vērā ierobežoto pirmspārošanas devu došanas periodu tēviņiem, auglība var nebūt precīzs testikulārās toksicitātes rādītājs. Tāpēc būtiska ir sēklinieku detalizēta histopatoloģiska izmeklēšana. Divu nedēļu ilgais pirmspārošanas devu došanas periods apvienojumā ar turpmākiem pārošanās/auglības novērojumiem ar kopējo devu došanas periodu vismaz četras nedēļas, kam seko tēviņu gonādu detalizēta histopatoloģija, tiek uzskatīts par pietiekamu, lai varētu noteikt lielāko daļu ietekmes uz tēviņu auglību un spermatoģenēzi.

12. Mātītēm devas dod visu pētījuma laiku, kas aptver divas nedēļas pirms pārošanas (aptverot divus pilnus estrālos ciklus), laiku līdz apaugļošanās brīdim, grūsnības laiku un vismaz trīspadsmit dienas pēc dzemdībām, līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot).

13. Pētījuma ilgums pēc aklimatizācijas un estrālā cikla izvērtējuma, ko veic pirms devu došanas, ir atkarīgs no mātīšu rādītājiem un ir aptuveni 63 dienas [vismaz 14 dienas pirms pārošanas, (ne vairāk kā) 14 dienas pārošana, 22 dienas gestācija, 13 dienas laktācija].

14. Devu došanas perioda laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksiskuma pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa periodā nobeigušies vai ir nonāvēti, izdara autopsiju, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

15. Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar žurkām. Ja šajā testēšanas metodē noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīno disruptoru detektēšanai saskaņā ar ESAO *TG* Nr. 407 (šā pielikuma B.7. nodaļa) tika izmantotas tikai žurkas. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai līnijas, par kurām ir labi zināms, ka tām ir bieži sastopami attīstības defekti. Jāizmanto veselīgi iepriekš nepāroti dzīvnieki, kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas. Jānorāda testa dzīvnieku suga, līnija, dzimums, masa un vecums. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā sākotnēju pētījumu ilgtermiņa pētījumam vai pētījumam, kas aptver visu paaudzi, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

16. Visām procedūrām jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Telpā, kurā tur izmēģinājuma dzīvniekus, jābūt 22 ° C (± 3 ° C) temperatūrai. Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams nepārsniegt 70 %, jāorientējas uz 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā.

17. Dzīvniekus ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās; ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Ja dzīvniekus tur grupās, dzīvnieku skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Grūsnas mātītes jātur atsevišķi, un tām jānodrošina migas ierīkošanai vajadzīgie materiāli. Mātītes laktācijas periodā tiks turētas atsevišķi kopā ar to pēcnācēju.

18. Barība regulāri jāanalizē, lai noteiktu kontaminantu klātbūtni. Barības paraugs jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

19. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti iedala kontrolgrupās un apstrādes grupas. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Dzīvniekus unikāli identificē un pirms pētījuma sākšanas vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

20. Testējamo ķimikāliju ieteicams ievadīt perorāli, ja vien par piemērotākiem netiek uzskatīti citi ievadīšanas ceļi. Ja izvēlēts perorālais ievadīšanas ceļš, testējamo ķimikāliju parasti ievada ar gavāžu; tomēr testējamo ķimikāliju var ievadīt arī ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni.

21. Ja vajadzīgs, testējamo ķimikāliju izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Kad vien iespējams, ieteicams lietošanai izvēlēties ūdens šķīdumu/suspensiju vai, ja tas nav iespējams, šķīdumu/emulsiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā), vai, ja arī tas nav iespējams, šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testējamās ķimikālijas stabilitāte un homogenitāte nesējā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

22. Ieteicams, lai katrā grupā sākumā būtu vismaz 10 tēviņi un 12–13 mātītes. Pirms ekspozīcijas izvērtē mātīšu estrālos ciklus, un dzīvniekus, kam nav novērojami tipiski 4–5 dienu cikli, pētījumā neiekļauj; tāpēc ieteicams izmantot lielāku skaitu mātīšu, lai katrā grupā būtu 10 mātītes. Izņemot izteiktas toksiskās ietekmes gadījumus, sagaidāms, ka katrā grupā būs vismaz 8 grūsnas mātītes, kas parasti ir minimālais pieļaujamais grūsno mātīšu skaits grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūsnu mātīšu un pietiekamu daudzumu pēcnācēju, lai varētu ticami izvērtēt testējamās ķimikālijas spēju ietekmēt auglību, grūsnību, mātišķo uzvedību un zīdīšanu, kā arī F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz 13. dienai pēc piedzimšanas.

Devas

23. Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un kontrolgrupa. Devu līmeņus var noteikt, pamatojoties uz informāciju, kas iegūta akūta toksiskuma testos, vai atkārtotas devas pētījumu rezultātiem. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, izņemot attiecībā uz testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Ja testējamās ķimikālijas ievadīšanai izmanto nesēju, kontrolgrupa saņem lielāko izmantoto nesēja daudzumu.

24. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā visus pieejamos toksiskuma un (toksiko)kinētiskos datus. Jāņem vērā arī tas, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība var atšķirties. Augstākais devas līmenis jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksisku ietekmi, bet ne nobeigšanos vai smagas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas tāda lejupēja devas līmeņu virkne, lai ar to varētu parādīt jebkādas ar devu saistītas atbildreakcijas, kā arī to, ka zemākajā devas līmenī nelabvēlīga ietekme nav novērojama (*NOAEL*). Devu līmeņu noteikšanai to samazinājuma virzienā optimums bieži vien ir divkārši līdz četrkārši intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).

25. Ja ir novērota vispārēja toksicitāte (piemēram, ķermeņa masas samazināšanās, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildreakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz jutīgiem endokrīnajiem beigupunktiem.

Robežtests

26. Ja perorālajā pētījumā, kurā izmanto vienu devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa masas dienā, vai — ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni — līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzirdināmajā ūdenī, un kuru veic, ievērojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav sagaidāma, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar vairākiem devu līmeņiem nav vajadzīgs. Robežtestu neizmanto gadījumos, kad cilvēka ekspozīcija norāda uz to, ka ir jāizmanto augstāks perorālās devas līmenis. Ja izmanto citus ievadīšanas veidus, tādus kā ieelpošana vai aplicēšana uz ādas, maksimālā sasniedzamā koncentrācija bieži vien ir atkarīga no testējamo ķimikāliju fizikālķīmiskajām īpašībām.

Devu došana

27. Dzīvnieki testējamās ķimikālijas devu saņem katru dienu 7 dienas nedēļā. Ja izmanto gavāžu, dzīvniekiem testējamā ķimikālija jāsaņem vienreizējā devā, ko ievada ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot tādus ūdens šķīdumus, kur var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Izņemot kairinošas vai kodīgas testējamās ķimikālijas, kam lielākās koncentrācijās parasti ir saasināta ietekme, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos saglabātos konstants tilpums.

28. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, ka testējamās ķimikālijas daudzums neizjauc normālu uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa masu; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar gavāžu, deva jādod katru dienu vienādā laikā un vismaz reizi nedēļā jākoriģē tā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa masu.

Eksperimenta grafiks

29. Devas abu dzimumu dzīvniekiem jāsāk dot vismaz 2 nedēļas pirms pārošanas, pēc tam, kad tie vismaz piecas dienas tikuši aklimatizēti un mātītēm ir novēroti normāli estrālie cikli (divu nedēļu ilgā priekšapstrādes periodā). Pētījums jāplāno tā, lai estrālā cikla izvērtēšana sāktos drīz pēc tam, kad dzīvnieki ir sasnieguši pilnīgu dzimumgatavību. Dažādām žurku līnijām pilnīgas dzimumgatavības sasniegšanas vecums dažādās laboratorijās var nedaudz atšķirties, piemēram, *Sprague Dawley* līnijas žurkas to sasniedz 10 nedēļu vecumā, *Wistar* līnijas žurkas — 12 nedēļu vecumā. Mātes ar pēcnācēju jānonāvē 13. pēcdzemdību dienā vai drīz pēc tam. Dzimšanas diena (proti, dienā, kurā dzemdības ir beigušās) ir 0. pēcdzemdību diena. Mātītes, kam nav novērojamas kopulācijas pazīmes, nonāvē 24–26 dienas pēc pēdējās pārošanas perioda dienas. Pārošanas perioda laikā abu dzimumu dzīvniekiem devas turpina dot. Pēc pārošanas perioda tēviņiem devas jāturpina dot vismaz līdz minimālā kopējā devu došanas perioda (28 dienas) beigām. Pēc tam tos vai nu nonāvē, vai arī patur dzīvus un tiem turpina dot devas, lai tos, iespējams, izmantotu otrai pārošanai, ja tāda vajadzīga.

30. Vecākpaaudzes mātītēm devas turpina dot katru dienu visu grūsnības laiku un vismaz līdz 13. pēcdzemdību dienai vai dienai pirms nonāvēšanas (minētās dienas ieskaitot). Pētījumos, kuros testējamo ķīmisko vielu ievada inhalācijas ceļā vai caur ādu, devas jāturpina dot vismaz līdz gestācijas 19. dienai (ieskaitot) un jāatsāk dot pēc iespējas drīz, bet ne vēlāk kā 4. dienā pēc dzemdībām.

31. Eksperimenta grafika shēma ir dota 2. papildinājumā.

Pārošanas procedūra

32. Parasti šajā pētījumā jāizmanto pārošanas shēma 1:1 (viens tēviņš uz vienu mātīti). Izņēmumi pieļaujami tēviņu nāves gadījumā. Mātīte jātur kopā ar to pašu tēviņu, līdz tiek novērotas kopulācijas pazīmes vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūsnību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies kopulācijas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Ja pārošana ir neveiksmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas tēviņiem.

Metiena lielums

33. Ceturtajā dienā pēc piedzimšanas katra metiena lielumu var koriģēt, nejaušināti izņemot liekos mazuļus tā, lai katrā metienā pēc iespējas būtu četri vai pieci katra dzimuma mazuļi atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma. No diviem liekajiem mazuļiem jāņem asins paraugi, kurus apkopo un izmanto seruma T4 līmeņu noteikšanai. Mazuļu selektīva izņemšana, piemēram, pēc ķermeņa masas vai anoģenitālā attāluma (*AGD*), nav piemērota. Ja vīrišķā vai sievišķā dzimuma mazuļu skaita dēļ nav iespējams nodrošināt, ka katrā metienā ir četri vai pieci katra dzimuma mazuļi, ir pieļaujama metiena lieluma daļēja koriģēšana (piemēram, seši tēviņi un četras mātītes). Ja metiena lielums ir mazāks par korekcijas robežvērtību (8 vai 10 mazuļi vienā metienā), mazuļus no metiena neizņem. Ja korekcijas robežvērtību pārsniedz tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

34. Ja metiena lielums netiek koriģēts, 4. dienā pēc piedzimšanas divus mazuļus no katra metiena nonāvē un no tiem ņem asins paraugus, ko izmanto tiroīdhormona seruma koncentrācijas mērīšanai. Ja iespējams, diviem mazuļiem katrā metienā jābūt sievišķā dzimuma mazuļiem, lai vīrišķā dzimuma mazuļus rezervētu zīdekļu retencijas izvērtējumiem, izņemot gadījumus, kad šo mazuļu izņemšanas rezultātā galējam novērtējumam nepaliek neviena mātīte. Mazuļus no metiena neizņem, ja tā lielums būs mazāks nekā 8 vai 10 mazuļi vienā metienā (atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma). Ja, pamatojoties uz parasto metiena lielumu, lieks ir tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

NOVĒROJUMI DZĪVES LAIKĀ

Klīniskie novērojumi

35. Visā testa periodā vismaz reizi dienā jāizdara klīniskie novērojumi; ja ir novērotas toksiskuma pazīmes, tie jāizdara biežāk. Klīniskie novērojumi katru dienu jāizdara, vēlams, vienā un tajā pašā laikā vai laikos, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc devu došanas. Jāreģistrē acīm redzamas izmaiņas uzvedībā, grūtas vai novēlotas atnešanās pazīmes un visas toksiskuma pazīmes, kā arī mirstība. Šajos datos jāiekļauj toksiskuma pazīmju parādīšanās laiks, pakāpe un ilgums.

Ķermeņa masa un barības/ūdens patēriņš

36. Tēviņi un mātītes jānosver pirmajā devas došanas dienā, tad vismaz reizi nedēļā un pētījuma beigās. Grūsnības laikā mātītes jānosver 0., 7., 14. un 20. dienā un 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. pēcdzemdību diena), kā arī vismaz 4. un 13. pēcdzemdību dienā. Novērojumu rezultāti jāreģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

37. Pirmspārošanas, grūsnības un laktācijas laikā barības patēriņš jāmēra vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērīšana pārošanas laikā ir fakultatīva. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, minētajos laikposmos ir jāmēra arī ūdens patēriņš.

Estrālie cikli

38. Lai pētījumam atlasītu mātītes ar regulāru cikliskumu, pirms apstrādes sākšanas jānovēro estrālie cikli (sk. 22. punktu). No apstrādes perioda sākuma līdz brīdim, kad ir novērotas pārošanās pazīmes, katru dienu jāveic arī vaginālo uztriepju monitorings. Ja pastāv bažas par akūta stresa ietekmi, kas, uzsākot devu došanu, var mainīt estrālos ciklus, laboratorijas var testa dzīvniekus divas nedēļas pakļaut ekspozīcijai un pēc tam reizi dienā ievākt vaginālās uztriepes, lai pirmspārošanas periodā vismaz divas nedēļas veiktu estrālo ciklu novērošanu, ko turpina veikt arī pārošanas periodā, līdz ir iegūti pārošanās pierādījumi. Iegūstot maksts / dzemdes kakla šūnas, jārūpējas par to, lai nepieļautu gļotādas bojājumus, kas var inducēt viltus grūsnību (7) (8).

Pēcnācēju parametri

39. Jāreģistrē gestācijas ilgums, ko aprēķina no 0. grūsnības dienas. Pēc atnešanās katru metienu iespējami drīz pārbauda, lai noteiktu mazuļu, nedzīvi dzimušo, dzīvi dzimušo un nīkuļu (mazuļi, kas ir ievērojami mazāki nekā atbilstīgie kontrolmazuļi) skaitu un dzimumu un acīmredzamu anomāliju klātbūtni.

40. 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. diena pēc piedzimšanas) un vismaz 4. un 13. dienā pēc piedzimšanas jāsaskaita dzīvie mazuļi un jānosaka to dzimums, un jānosver metieni. Papildus 35. punktā aprakstītajiem novērojumiem jāreģistrē pēcnācēju uzvedības anomālijas.

41. Katra mazuļa *AGD* jāmēra vienā un tajā pašā dienā pēc piedzimšanas no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts *AGD*, un *AGD* ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (9). Kā ieteikts ESAO *GD* 151 (10), 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas ir jāsaskaita vīrišķā dzimuma mazuļu zīdekļi/areolas.

Klīniskā bioķīmija

42. Asins paraugus no noteiktas vietas ņem saskaņā ar šādu grafiku:

— 4. dienā pēc piedzimšanas — no vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, ja mazuļu skaits to ļauj (sk. 33.–34. punktu),

— pētījuma beigās 13. dienā — no visām mātēm un vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, un

— pētījuma beigās — no visiem pieaugušiem tēviņiem.

Visus asins paraugus glabā piemērotos apstākļos. Asins paraugos, kas ņemti no mazuļiem 13. dienā un pieaugušiem tēviņiem, nosaka tiroīdhormonu (T4) seruma līmeņus. Ja vajadzīgs, T4 līmeņus nosaka arī asins paraugos, kas ņemti no mātēm un 4. dienas mazuļiem. Attiecīgā gadījumā var fakultatīvi mērīt citus hormonus. Tiroīdhormona analīžu veikšanai mazuļu asinis var apkopot pa metieniem. Tiroīdhormonus (T4 un TSH) vēlams mērīt kopējā formā (kopējais T4 un kopējais TSH).

43. Noteikto hormonu mainību un absolūto koncentrāciju var ietekmēt šādi faktori:

— nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,

— nonāvēšanas metode, kurā dzīvniekiem netiek radīts nevajadzīgs stress, kas varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,

— hormonu noteikšanas testa komplekti, kas var atšķirties pēc standartlīknēm.

44. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem.

Patoloģija

Makroskopiskā autopsija

45. Tūlīt pēc nonāvēšanas vai nāves, kas iestājusies pētījuma laikā, pieaugušie dzīvnieki makroskopiski jāpārbauda attiecībā uz anomālijām vai patoloģiskām pārmaiņām. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Jāreģistrē implantācijas vietu skaits. Lai noteiktu estrālā cikla fāzi un ļautu to saistīt ar olnīcu histopatoloģiju, vaginālās uztriepes jāizmeklē autopsijas dienas rītā.

46. Visu pieaugušo tēviņu sēklinieki un sēklinieku piedēkļi, kā arī prostata un sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām (kopā) pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem, un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Turklāt fakultatīvos orgānu masas mērījumos var ietvert arī tūpļa cēlājmuskuļa un briedumķermeņa muskuļa kompleksu, Kupera dziedzerus un dzimumlocekļa galviņu tēviņiem un abas olnīcas (slapjais svars) un dzemdi (ar dzemdes kaklu) mātītēm; ietveršanas gadījumā minētie masas mērījumi jāveic iespējami drīz pēc disekcijas.

47. Nedzīvi mazuļi un mazuļi, kas nonāvēti 13. dienā pēc piedzimšanas vai drīz pēc tam, vismaz rūpīgi ārēji jāpārbauda, lai konstatētu iespējamas acīmredzamas anomālijas. Īpaša uzmanība jāpievērš ārējām reproduktīvajām ģenitālijām, kuras jāpārbauda, meklējot attīstības izmaiņu pazīmes. 13. dienā jāsaglabā vairogdziedzeris, kas izņemts no 1 vīrišķā un 1 sievišķa dzimuma mazuļa katrā metienā.

48. Jāsaglabā visu pieaugušo dzīvnieku olnīcas, sēklinieki, iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata, sēklas pūslīši un prostatas priekšējās daivas), vairogdziedzeris un visi orgāni, kam ir redzami makroskopiski bojājumi. Sēklinieku un sēklinieku piedēkļu parastai pārbaudei nav ieteicams izmantot formalīna fiksāciju. Attiecībā uz šiem audiem pieņemama metode ir izmantot Buēna fiksatoru vai modificētu Davidsona fiksatoru (11). Lai nodrošinātu fiksatora ātru penetrēšanos, bālgano apvalku (*tunica albuginea*) var abos orgāna polos uzmanīgi un sekli pārdurt ar adatu.

Histopatoloģija

49. Veic lielākās devas grupas dzīvnieku un kontrolgrupas dzīvnieku olnīcu, sēklinieku un sēklinieku piedēkļu detalizētu histopatoloģisku izmeklēšanu (īpašu uzsvaru liekot uz sēklinieku intersticiālo šūnu struktūras spermatoģenēzi un histopatoloģiju). Vajadzības gadījumā var izmeklēt pārējos saglabātos mazuļu un pieaugušo dzīvnieku orgānus, arī vairogdziedzeri. Vairogdziedzera masu var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no piegulošiem audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai izvairītos no audu bojājumiem. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi. Ja lielākās devas grupā ir novērotas pārmaiņas, minētās izmeklēšanas jāveic arī citu devu grupu dzīvniekiem. Norādījumos par histopatoloģiju (11) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu disekciju, fiksāciju, secēšanu un histopatoloģiju.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

50. Jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, kurā redzams testa sākumā katrā testā grupā esošo dzīvnieku skaits, to dzīvnieku skaits, kas atrasti miruši testa laikā vai nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, nāves iestāšanās vai humānās nonāvēšanas laiks, auglīgo dzīvnieku skaits, grūsno mātīšu skaits, to dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, arī toksiskās darbības sākuma laiks, ilgums un stiprums, histopatoloģisko pārmaiņu veidi un visi relevantie dati par metienu. Tabulas veidā sagatavotā kopsavilkuma ziņojuma paraugs, kas ir ļoti noderīgs ietekmes uz reprodukciju/attīstību izvērtēšanai, ir sniegts 3. papildinājumā.

51. Tā kā pētījuma tvērums ir ierobežots, statistiskajai analīzei, ko veic, lai izvērtētu rezultātu nozīmīgumu, ir ierobežota vērtība attiecībā uz daudziem beigupunktiem, jo īpaši reproduktīvajiem beigupunktiem. Ja tiek izmantota statistiskā analīze, izvēlētajai metodei jābūt atbilstošai pārbaudāmā mainīgā lieluma sadalījumam, un tā jāizvēlas pirms pētījuma sākšanas. *AGD* un zīdekļu retencijas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā ietekmi uz metienu. Vajadzības gadījumā analīzes vienība ir metiens. Mazuļu ķermeņa masas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā metiena lielumu. Ņemot vērā grupu mazo lielumu, pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskos kontroles datus (piemēram, datus par metiena lielumu), ja tādi ir pieejami.

Rezultātu izvērtēšana

52. Šā toksicitātes pētījuma konstatējumi jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, autopsiju un mikroskopiskos konstatējumus. Vērtējums ietver testējamās ķimikālijas devas saistību ar anomāliju — to vidū makroskopisko bojājumu, identificēto mērķorgānu, neauglības, klīnisko anomāliju, ietekmes uz reproduktīvajiem un metiena rādītājiem, ķermeņa masas pārmaiņu, ietekmes uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – esību vai neesību, incidenci un smagumu.

53. Tēviņu apstrādes periods ir īss, tāpēc, novērtējot ietekmi uz tēviņu reproduktīvo funkciju, papildus auglības datiem jāņem vērā sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija. Pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskus kontroles datus par reprodukciju/ontoģenēzi (piemēram, datus par metiena lielumu, *AGD*, zīdekļu retenciju, seruma T4 līmeņiem), ja tādi pieejami.

54. Kvalitātes kontroles vajadzībām ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

55. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma;

vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.;

daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnijas,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.,

— katra dzīvnieka masa testa sākumā,

— sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas nosacījumi:

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu,

— attiecīgā gadījumā testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa masas dienā),

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— detalizēts apraksts par nejaušināšanas procedūru, kas izmantota, lai atlasītu mazuļus izņemšanai no metiena, ja šāda izņemšana notikusi.

Rezultāti:

— ķermeņa masa / ķermeņa masas izmaiņas,

— barības patēriņš un ūdens patēriņš (ja šādi dati ir pieejami),

— dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī dati par auglību, gestāciju un citām toksicitātes pazīmēm,

— gestācijas ilgums,

— toksiska vai cita iedarbība uz reprodukciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,

— klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),

— pieaugušu mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,

— dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudums,

— mazuļu ķermeņa masas dati,

— visu mazuļu *AGD* (un ķermeņa masa *AGD* mērīšanas dienā),

— zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem,

— vairogdziedzera hormonu līmenis 13 dienu veciem mazuļiem un pieaugušiem tēviņiem (un mātēm un 4 dienas veciem mazuļiem, ja šādi mērījumi veikti),

— to mazuļu skaits, kam ir makroskopiskas anomālijas, ārējo ģenitāliju makroskopisks izvērtējums, nīkuļu skaits,

— nāves iestāšanās laiks testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,

— implantāciju skaits, metiena lielums un masa datu reģistrēšanas laikā,

— ķermeņa masa nonāvēšanas laikā un dati par vecākpaaudzes dzīvnieku orgānu masu,

— autopsijas konstatējumi,

— histopatoloģiskas izmeklēšanas rezultātu detalizēts apraksts,

— absorbcijas dati (ja pieejami),

— rezultātu statistiskā apstrāde (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Rezultātu interpretēšana

56. Pētījums sniegs izvērtējumu par reproduktīvo/ontoģenētisko toksicitāti, kas saistīta atkārtotu devu došanu (sk. 5. un 6. punktu). Tas varētu norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākas izmeklēšanas un sniedz norādījumus turpmāko pētījumu plānošanā. Ar reprodukciju un ontoģenēzi saistīto rezultātu interpretēšanā par palīglīdzekli jāizmanto ESAO norādījumu dokuments Nr. 43 (12). ESAO norādījumu dokumentā Nr. 106 par grauzēju endokrīno un reproduktīvo testu histoloģisko izvērtēšanu (11) sniegta informācija par (endokrīno) orgānu un vaginālo uztriepju sagatavošanu un izvērtēšanu; minētā informācija var būt noderīga saistībā ar šo *TG*.

LITERATŪRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) 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.

(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.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS (SK. ARĪ ESAO *GD 150 (6)*)

Androgenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17ß) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska tiroīdhormona (piemēram, $T_{3)}$ darbību.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ontoģenētiskā toksicitāte: reproduktīvās toksicitātes izpausme, kas liecina par pēcnācēju prenatāliem, perinatāliem, postnatāliem, strukturāliem vai funkcionāliem traucējumiem.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Deva ir ievadītās testējamās ķimikālijas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķimikālijas masu uz testa dzīvnieka ķermeņa masas vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa masas dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Izteikta toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt bīstamību, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksicitātes pazīmes un, iespējams, mirstību.

Fertilitātes traucējumi ir tēviņu vai mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Maternālā toksicitāte: nelabvēlīgā ietekme uz gravidām mātītēm, kas ir specifiska (tieša ietekme) vai nespecifiska (netieša ietekme).

NOAEL ir saīsinājums, kas apzīmē nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17ß).

Reproduktīvā toksicitāte ir kaitīga ietekme uz pēcnācējiem un/vai tēviņu un mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

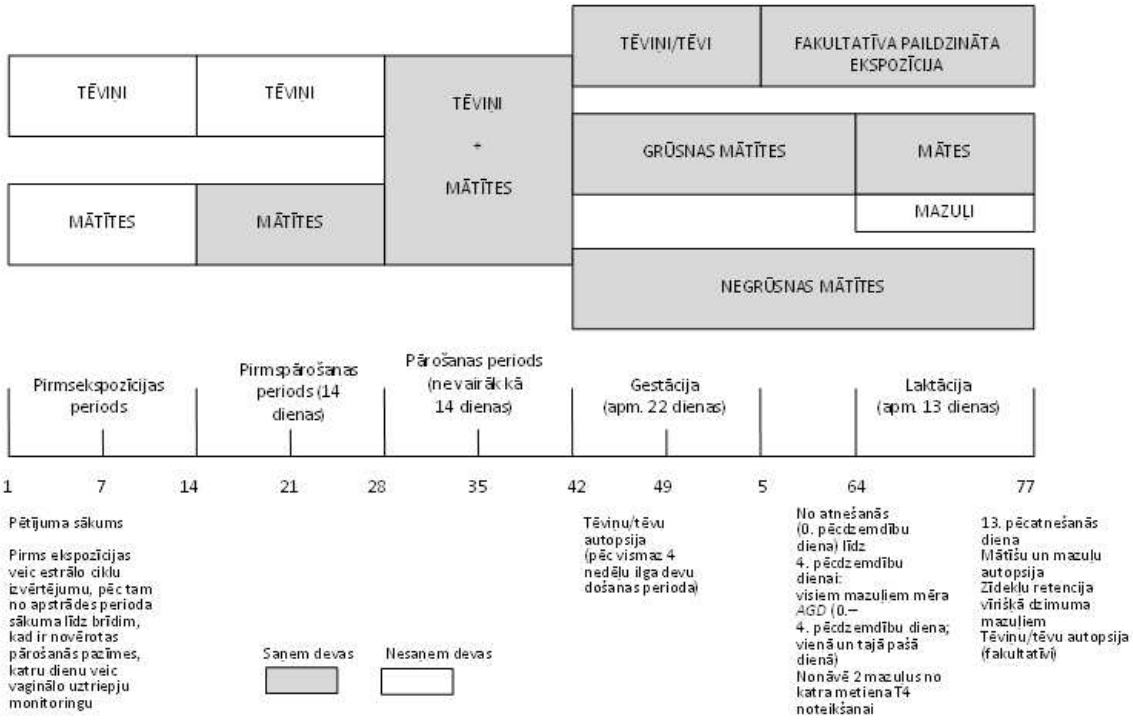
Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Tireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam tiroīdhormonam (piemēram, $T_{3)}$.

Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās ticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

2. papildinājums

EKSPERIMENTA GRAFIKA SHĒMA, KURĀ NORĀDĪTS MAKSIMĀLAIS PĒTĪJUMA ILGUMS, KURA PAMATĀ IR 14 DIENU ILGS PĀROŠANAS PERIODS



3. papildinājums

TABULAS VEIDĀ SAGATAVOTS KOPSAVILKUMA ZIŅOJUMS PAR IETEKMI UZ REPRODUKCIJU/ONTOĢENĒZI

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrole)	…	…	…	…
Dzīvnieku pāri (N)					
Estrālais cikls (vismaz vidējais neregulāru ciklu ilgums un biežums)					
Mātītes, kam novērojamas kopulācijas pazīmes (N)					
Grūsnas mātītes (N)					
Apaugļošanās dienas 1–5 (N)					
Apaugļošanās dienas 6–...([1]) (N)					
Grūsnība ≤ 21 diena (N)					
Grūsnība = 22 dienas (N)					
Grūsnība ≥ 23 dienas (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem 4. dienā pēc dzemdībām (N)					
Implanti vienai mātei (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei piedzimšanas brīdī (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei 4. dienā (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) piedzimstot (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa piedzimstot (vidēji)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Mazuļu masa piedzimstot (vidēji)					
Mazuļu masa *AGD* mērīšanas laikā (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrole)	…	…	…	…
Mazuļu *AGD* tajā pašā postnatālajā dienā, laikā no dzimšanas līdz 4. dienai (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem 13. dienā (vidēji)					
Metiena masa 13. dienā (vidēji)					
MAZUĻI AR ANOMĀLIJĀM					
Mātes, kam nav neviena šāda mazuļa					
Mātes ar 1 šādu mazuli					
Mātes ar ≥ 2 šādiem mazuļiem					
PĒCNĀCĒJU ZUDUMI					
Prenatāli / pēc implantācijām (implantāciju skaits mīnus dzīvi dzimušo skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					
Postnatāli (dzīvi dzimušo skaits mīnus 13. postnatālajā dienā dzīvo mazuļu skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					

([1]) pārošanas perioda pēdējā diena

B.64. KOMBINĒTS ATKĀRTOTAS DEVAS TOKSISKUMA PĒTĪJUMS AR REPRODUKTĪVĀS/ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 422 (2016). ESAO vadlīnijas par ķimikāliju testēšanu periodiski tiek pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Sākotnējā vadlīnija Nr. 422 par skrīninga testu tika pieņemta 1996. gadā, pamatojoties uz protokolu par "Kombinēto atkārtotas devas un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga testu", kas apspriests divās ekspertu sanāksmēs Londonā 1990. gadā (1) un Tokijā 1992. gadā (2).

2. Šī testēšanas metode apvieno reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga daļu, kuras pamatā ir pieredze, kas gūta dalībvalstīs, izmantojot sākotnējo metodi ar lielā apjomā ražotām esošajām ķimikālijām, un pieredze, kas gūta izpētes testos ar pozitīvās kontroles vielām (3) (4), un atkārtotas devas toksiskuma daļu saskaņā ar ESAO testēšanas vadlīniju Nr. 407 (Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem), kura atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai.

3. Pēc tam, kad 1998. gadā ESAO tika sākta prioritāra darbība ar mērķi pārskatīt esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par endokrīno disruptoru skrīningu un testēšanu (5), šī testēšanas metode tika atjaunināta, iekļaujot tajā endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus. Šajā kontekstā *TG* Nr. 407 (kas atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai) 2008. gadā tika papildināta ar parametriem, kas piemēroti testējamo ķimikāliju endokrīnās aktivitātes noteikšanai. *TG* Nr. 422 tika atjaunināta, lai skrīninga *TG*, kur ekspozīcijas periodi aptver dažus jutīgos attīstības periodus (prenatālais vai agrīns postnatālais periods), iekļautu dažus endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus.

4. Izvēlētie endokrīnajiem disruptoriem relevantie papildu beigupunkti, kas ir daļa arī no *TG* Nr. 443 (Paplašinātais vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījums, šā pielikuma B.56. nodaļa), tika iekļauti *TG* Nr. 422, pamatojoties uz priekšizpēti, kurā aplūkoti zinātniski un tehniski jautājumi par minēto beigupunktu iekļaušanu, kā arī iespējamie testēšanas plānojuma pielāgojumi, kas vajadzīgi minēto beigupunktu iekļaušanai (6).

5. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai iegūtu ierobežotu informāciju par testējamās ķimikālijas ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām. Tā nav nedz alternatīva B.31., B.34., B.35. vai B.56. testēšanas metodei, nedz tās aizstāj.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Novērtējot un izvērtējot testējamās ķimikālijas toksiskās īpašības, orālo toksicitāti ar atkārtotām devām var noteikt pēc tam, kad akūtās toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Šis pētījums sniedz informāciju par iespējamajiem veselības apdraudējumiem, kas varētu rasties no atkārtotas ekspozīcijas relatīvi ierobežotā laikposmā. Metodē ietilpst atkārtotas devas toksiskuma pamatpētījums, ko var izmantot attiecībā uz ķimikālijām, par kurām nav pamatoti veikt 90 dienu pētījumu (piemēram, ja ražošanas apjoms nepārsniedz noteiktas robežvērtības), vai par provizorisku pētījumu ilgtermiņa pētījumam. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un apsvērumi, kas noteikti ESAO norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (7).

7. Šī metode ietver arī reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga testu, un tāpēc to var izmantot arī, lai sniegtu sākotnējo informāciju par iespējamo ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām, vai nu ķimikāliju toksikoloģisko īpašību novērtēšanas agrīnā posmā, vai par ķimikālijām, kas rada bažas. Šī testēšanas metode nesniedz pilnīgu informāciju par visiem reprodukcijas un attīstības aspektiem. Konkrētāk, tā piedāvā tikai ierobežotus līdzekļus, ar ko detektēt prenatālās ekspozīcijas postnatālās izpausmes vai ietekmi, kas var rasties postnatālās ekspozīcijas laikā. Beigupunktu selektivitātes, pētījuma īsā ilguma un citu iemeslu dēļ šī metode nesniedz pierādījumus galīgajiem apgalvojumiem par reproduktīvās/ontoģenētiskās ietekmes neesību. Turklāt, ja nav datu no citiem reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes testiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku.

8. Rezultāti, kas iegūti par endokrīnajiem parametriem, ir jāaplūko ESAO endokrīni disruptīvu ķimikāliju testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara (8) kontekstā. Atjauninātā ESAO *TG* Nr. 422 ir iekļauta minētā konceptuālā satvara 4. līmenī, kur ietilpst *in vivo* testi, kas sniedz datus par nelabvēlīgu ietekmi uz endokrīnajiem beigupunktiem. Endokrīnu signālu pašu par sevi tomēr nevar uzskatīt par pietiekamu pierādījumu tam, ka testējamā ķimikālija ir endokrīnais disruptors.

9. Šajā testēšanas metodē uzsvars likts arī uz neiroloģisko ietekmi kā īpašu beigupunktu un uzsvērta vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami daudz informācijas. Ar šo metodi jāidentificē ķimikālijas ar neirotoksisku potenciālu, saistībā ar kuru varētu būt pamatoti veikt turpmāku padziļinātu izpēti. Turklāt metode var dot arī pamatnorādes uz imunoloģisko ietekmi.

10. Ja nav datu no citiem sistēmiskās toksicitātes, reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes, neirotoksicitātes un/vai imūntoksicitātes pētījumiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku. Tests var būt īpaši noderīgs kā daļa no ESAO skrīninga informācijas datu kopas (*SIDS*), lai novērtētu esošās ķimikālijas, par kurām ir pieejams maz toksikoloģiskās informācijas vai tā nav pieejama vispār, un tas var kalpot par alternatīvu divu atsevišķu testu, proti, atkārtotas devas toksiskuma testa (ESAO *TG* Nr. 407, kas atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai) un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes testa (ESAO *TG* Nr. 421, kas atbilst šā pielikuma B.63. nodaļai) veikšanai. To var izmantot arī par devu diapazona noteikšanas pētījumu plašākiem reprodukcijas/ontoģenēzes pētījumiem vai citos relevantos gadījumos.

11. Parasti tiek pieņemts, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība atšķiras. Tāpēc šajā kombinētajā testā var būt grūti noteikt devu līmeņus, kas ir pietiekami gan vispārējas sistēmiskas toksicitātes, gan specifiskas reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes izvērtēšanai; to vieglāk izdarīt, ja individuālos testus veic atsevišķi. Turklāt testa rezultātus attiecībā uz vispārējo sistēmisko toksicitāti var būt sarežģītāk interpretēt nekā tad, ja veic atsevišķu atkārtotas devas pētījumu, jo īpaši gadījumos, kad seruma un histopatoloģijas parametri pētījumā netiek izvērtēti vienlaicīgi. Šo tehnisko sarežģījumu dēļ šā kombinētā skrīninga testa veikšanai ir vajadzīga liela pieredze toksicitātes testēšanā. No otras puses, papildus tam, ka testā tiek izmantots mazāks skaits dzīvnieku, kombinētais tests var nodrošināt labāku veidu, kā tiešo ietekmi uz reprodukciju/ontoģenēzi nošķir no ietekmes, kas ir sekundāra citiem (sistēmiskas) ietekmes veidiem.

12. Šajā testā devu došanas periods ir ilgāks nekā parastā 28 dienu ilgā atkārtotas devas pētījumā. Tomēr salīdzinājumā ar situāciju, kad papildus reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga testam tiek veikts 28 dienu ilgs atkārtotas devas pētījums, šajā testā katrā grupā tiek izmantots mazāks skaits katra dzimuma dzīvnieku

13. Šajā testēšanas metodē izmanto perorālo testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Citu ekspozīcijas ceļu izmantošanas gadījumā var būt vajadzīgas modifikācijas.

14. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

15. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

16. Testējamo ķimikāliju pakāpeniski pieaugošās devās saņem vairākas tēviņu un mātīšu grupas. Tēviņiem testējamās ķimikālijas jādod vismaz četras nedēļas līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot); minētais laikposms aptver vismaz divas nedēļas pirms pārošanas, pārošanas periodu un aptuveni divas nedēļas pēc pārošanas. Ņemot vērā ierobežoto pirmspārošanas devu došanas periodu tēviņiem, auglība var nebūt īpaši precīzs testikulārās

toksicitātes rādītājs. Tāpēc būtiska ir sēklinieku detalizēta histopatoloģiska izmeklēšana. Divu nedēļu ilgais pirmspārošanas devu došanas periods apvienojumā ar turpmākiem pārošanās/auglības novērojumiem ar kopējo devu došanas periodu vismaz četras nedēļas, kam seko tēviņu gonādu detalizēta histopatoloģija, tiek uzskatīts par pietiekamu, lai varētu noteikt lielāko daļu ietekmes uz tēviņu auglību un spermatoģenēzi.

17. Mātītēm devas dod visu pētījuma laiku, kas aptver divas nedēļas pirms pārošanas (aptverot divus pilnus estrālos ciklus), laiku līdz apaugļošanās brīdim, grūsnības laiku un vismaz trīspadsmit dienas pēc dzemdībām, līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot).

18. Pētījuma ilgums pēc aklimatizācijas un estrālā cikla izvērtējuma, ko veic pirms devu došanas, ir atkarīgs no mātīšu rādītājiem un ir aptuveni 63 dienas [vismaz 14 dienas pirms pārošanas, (ne vairāk kā) 14 dienas pārošana, 22 dienas gestācija, 13 dienas laktācija].

19. Devu došanas perioda laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksiskuma pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa laikā nobeigušies vai ir nonāvēti, izdara autopsiju, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

20. Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar žurkām. Ja šajā *TG* Nr. 422 noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīno disruptoru detektēšanai saskaņā ar *TG* Nr. 407 izmantoja tikai žurkas. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai līnijas, par kurām ir labi zināms, ka tām ir bieži sastopami attīstības defekti. Jāizmanto veselīgi iepriekš nepāroti dzīvnieki, kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas. Jānorāda testa dzīvnieku suga, līnija, dzimums, masa un vecums. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā sākotnēju pētījumu ilgtermiņa pētījumam vai pētījumam, kas aptver visu paaudzi, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

21. Visām procedūrām jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °). Relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā.

22. Dzīvniekus ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās; ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Ja dzīvniekus tur grupās, dzīvnieku skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Grūsnas mātītes jātur atsevišķi, un tām jānodrošina migas ierīkošanai vajadzīgie materiāli. Mātītes laktācijas periodā tiks turētas atsevišķi kopā ar to pēcnācēju.

23. Barība regulāri jāanalizē, lai noteiktu kontaminantu klātbūtni. Barības paraugs jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

24. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti iedala apstrādes grupās un ievieto būros. Būri jāizvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Dzīvniekus unikāli identificē un pirms pētījuma sākšanas vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

25. Testējamo ķimikāliju ieteicams ievadīt perorāli, ja vien par piemērotākiem netiek uzskatīti citi ievadīšanas ceļi. Ja izvēlēts perorālais ievadīšanas ceļš, testējamo ķimikāliju parasti ievada ar gavāžu; tomēr testējamo ķimikāliju var ievadīt arī ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni.

26. Ja vajadzīgs, testējamo ķimikāliju izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Kad vien iespējams, ieteicams lietošanai izvēlēties ūdens šķīdumu/suspensiju vai, ja tas nav iespējams, šķīdumu/suspensiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā), vai, ja arī tas nav iespējams, šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testējamās ķimikālijas stabilitāte un homogenitāte nesējā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

27. Ieteicams, lai katrā grupā sākumā būtu vismaz 10 tēviņi un 12–13 mātītes. Pirms ekspozīcijas izvērtē mātīšu estrālos ciklus, un dzīvniekus, kam nav novērojami tipiski 4–5 dienu cikli, pētījumā neiekļauj; tāpēc ieteicams izmantot lielāku skaitu mātīšu, lai katrā grupā būtu 10 mātītes. Izņemot izteiktas toksiskās ietekmes gadījumus, sagaidāms, ka katrā grupā būs vismaz 8 grūsnas mātītes, kas parasti ir minimālais pieļaujamais grūsno mātīšu skaits grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūsnu mātīšu un pietiekamu daudzumu pēcnācēju, lai varētu ticami izvērtēt testējamās ķimikālijas spēju ietekmēt auglību, grūsnību, mātišķo uzvedību un zīdīšanu, kā arī F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz 13. dienai pēc piedzimšanas. Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana pētījuma gaitā, skaits jāpalielina par dzīvnieku skaitu, ko paredzēts nonāvēt pirms pētījuma pabeigšanas. Jāapsver papildu satelītgrupas (pieci dzīvnieki no katra dzimuma) iekļaušana kontrolgrupā un lielākās devas grupā, lai vismaz 14 dienas pēc apstrādes novērotu sistēmiskas toksiskās ietekmes atgriezeniskumu, noturību vai vēlīnu parādīšanos. Satelītgrupas dzīvniekus nepāro un līdz ar to neizmanto reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes novērtēšanai.

Devas

28. Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un kontrolgrupa. Ja piemēroti vispārējās toksicitātes dati nav pieejami, var izdarīt diapazona noteikšanas pētījumu (ar vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem), kas palīdzētu noteikt izmantojamās devas. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, izņemot attiecībā uz testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Ja testējamās ķimikālijas ievadīšanai izmanto nesēju, kontrolgrupa saņem lielāko izmantoto nesēja daudzumu.

29. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā visus pieejamos toksiskuma un (toksiko)kinētiskos datus. Jāņem vērā arī tas, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība var atšķirties. Augstākais devas līmenis jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksisku ietekmi, bet ne nobeigšanos vai acīmredzamas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas tāda lejupēja devas līmeņu virkne, lai ar to varētu parādīt jebkādas ar devu saistītas atbildreakcijas, kā arī to, ka zemākajā devas līmenī nelabvēlīga ietekme nav novērojama. Optimums bieži vien ir divkārši līdz četrkārši intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).

30. Ja ir novērota vispārēja toksicitāte (piemēram, ķermeņa masas samazināšanās, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildreakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz jutīgiem endokrīnajiem beigupunktiem.

Robežtests

31. Ja perorālajā pētījumā, kurā izmanto vienu devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa masas dienā, vai – ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu – līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzirdināmajā ūdenī (aprēķināts pēc ķermeņa masas), un kuru veic, ievērojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav sagaidāma, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar vairākiem devu līmeņiem nav vajadzīgs. Robežtestu neizmanto gadījumos, kad cilvēka ekspozīcija norāda uz to, ka ir jāizmanto augstāks devas līmenis. Ja izmanto citus ievadīšanas veidus, tādus kā ieelpošana vai aplicēšana uz ādas, maksimālā sasniedzamā ekspozīcija bieži vien ir atkarīga no testējamo ķimikāliju fizikālķīmiskajām īpašībām.

Devu došana

32. Dzīvnieki testējamās ķimikālijas devu saņem katru dienu 7 dienas nedēļā. Ja izmanto gavāžu, dzīvniekiem testējamā ķimikālija jāsaņem vienreizējā devā, ko ievada ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml

uz 100 g ķermeņa masas, izņemot tādus ūdens šķīdumus, kur var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Izņemot kairinošas vai kodīgas testējamās ķimikālijas, kam lielākās koncentrācijās parasti ir saasināta ietekme, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos saglabātos konstants tilpums.

33. Ja testējamās ķimikālijas ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, ka testējamās ķimikālijas daudzums neizjauc normālu uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa masu; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar gavāžu, deva jādod katru dienu vienādā laikā un vismaz reizi nedēļā jākoriģē tā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa masu. Ja kombinēto pētījumu izmanto par provizorisku pētījumu ilgtermiņa vai pilnīgam reproduktīvās toksicitātes pētījumam, abos pētījumos jāizmanto līdzīgs uzturs.

Eksperimenta grafiks

34. Devas abu dzimumu dzīvniekiem jāsāk dot 2 nedēļas pirms pārošanas, pēc tam, kad tie vismaz piecas dienas tikuši aklimatizēti un mātītēm ir novēroti normāli estrālie cikli (divu nedēļu ilgā priekšapstrādes periodā). Pētījums jāplāno tā, lai estrālā cikla izvērtēšana sāktos drīz pēc tam, kad dzīvnieki ir sasnieguši pilnīgu dzimumgatavību. Dažādām žurku līnijām pilnīgas dzimumgatavības sasniegšanas vecums dažādās laboratorijās var nedaudz atšķirties, piemēram, *Sprague Dawley* līnijas žurkas to sasniedz 10 nedēļu vecumā, *Wistar* līnijas žurkas — 12 nedēļu vecumā. Mātes ar pēcnācēju jānonāvē 13. pēcdzemdību dienā vai drīz pēc tam. Lai nodrošinātu, ka mātes nakti pirms asins ņemšanas (ja izvēlēts šis variants) nav barojušās, mātes un to pēcnācējs nav obligāti jānogalina tajā pašā dienā. Dzimšanas diena (proti, dienā, kurā dzemdības ir beigušās) ir 0. pēcdzemdību diena. Mātītes, kam nav novērojamas kopulācijas pazīmes, nonāvē 24–26 dienas pēc pēdējās pārošanas perioda dienas. Pārošanas perioda laikā abu dzimumu dzīvniekiem devas turpina dot. Pēc pārošanas perioda tēviņiem devas jāturpina dot vismaz līdz minimālā kopējā devu došanas perioda (28 dienas) beigām. Pēc tam tos vai nu nonāvē, vai arī patur dzīvus un tiem turpina dot devas, lai tos, iespējams, izmantotu otrai pārošanai, ja tāda vajadzīga.

35. Vecākpaaudzes mātītēm devas turpina dot katru dienu visu grūsnības laiku un vismaz līdz 13. pēcdzemdību dienai vai dienai pirms nonāvēšanas (minētās dienas ieskaitot). Pētījumos, kuros testējamo ķīmisko vielu ievada inhalācijas ceļā vai caur ādu, devas jāturpina dot vismaz līdz gestācijas 19. dienai (ieskaitot) un jāatsāk dot pēc iespējas drīz, bet ne vēlāk kā 4. dienā pēc dzemdībām.

36. Satelītgrupas dzīvniekus (ja tie iekļauti), kas paredzēti papildu novērojumiem, nepāro. Pēc pirmās plānotās mātīšu nonāvēšanas tie jātur vēl vismaz 14 dienas bez apstrādes, lai detektētu toksiskās ietekmes vēlīnu parādīšanos vai noturību, vai atgūšanos no tās.

37. Eksperimenta grafika shēma ir dota 2. papildinājumā.

Estrālie cikli

38. Lai pētījumam atlasītu mātītes ar regulāru cikliskumu, pirms apstrādes sākšanas jānovēro estrālie cikli (sk. 27. punktu). No apstrādes perioda sākuma līdz brīdim, kad ir novērotas pārošanās pazīmes, katru dienu jāveic arī vaginālo uztriepju monitorings. Ja pastāv bažas par akūta stresa ietekmi, kas, uzsākot devu došanu, var mainīt estrālos ciklus, laboratorijas var testa dzīvniekus divas nedēļas pakļaut ekspozīcijai un pēc tam reizi dienā ievākt vaginālās uztriepes, lai pirmspārošanas periodā vismaz divas nedēļas veiktu estrālo ciklu monitoringu, ko turpina veikt arī pārošanas periodā, līdz ir iegūti pārošanās pierādījumi. Iegūstot maksts / dzemdes kakla šūnas, jārūpējas par to, lai nepieļautu gļotādas bojājumus, kas var inducēt viltus grūsnību (8) (9).

Pārošanas procedūra

39. Parasti šajā pētījumā jāizmanto pārošanas shēma 1:1 (viens tēviņš uz vienu mātīti). Izņēmumi pieļaujami tēviņu nāves gadījumā. Mātīte jātur kopā ar to pašu tēviņu, līdz tiek novērotas kopulācijas pazīmes vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūsnību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies kopulācijas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Ja pārošana ir nesekmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas tēviņiem.

Metiena lielums

40. Ceturtajā dienā pēc piedzimšanas katra metiena lielumu var koriģēt, nejaušināti izņemot liekos mazuļus tā, lai katrā metienā pēc iespējas būtu četri vai pieci katra dzimuma mazuļi atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma. No diviem liekajiem mazuļiem jāņem asins paraugi, tie jāapkopo un jāizmanto seruma T4 līmeņu noteikšanai. Mazuļu selektīva izņemšana, piemēram, pēc ķermeņa masas vai anoģenitālā attāluma (*AGD*), nav piemērota. Ja vīrišķā vai sievišķā dzimuma mazuļu skaita dēļ nav iespējams nodrošināt, ka katrā metienā ir četri vai pieci katra dzimuma mazuļi, ir pieļaujama metiena lieluma daļēja koriģēšana (piemēram, seši tēviņi un četras mātītes). Ja metiena lielums ir mazāks par korekcijas robežvērtību (8 vai 10 mazuļi vienā metienā), mazuļus no metiena neizņem. Ja korekcijas robežvērtību pārsniedz tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

41. Ja metiena lielums netiek koriģēts, 4. dienā pēc piedzimšanas divus mazuļus no katra metiena nonāvē un no tiem ņem asins paraugus, ko izmanto tiroīdhormona seruma koncentrācijas mērīšanai. Ja iespējams, diviem mazuļiem katrā metienā jābūt sievišķā dzimuma mazuļiem, lai vīrišķā dzimuma mazuļus rezervētu zīdekļu retencijas izvērtējumiem, izņemot gadījumus, kad šo mazuļu izņemšanas rezultātā galējam novērtējumam nepaliek neviena mātīte. Mazuļus no metiena neizņem, ja tā lielums būs mazāks nekā 8 vai 10 mazuļi vienā metienā (atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma). Ja, pamatojoties uz parasto metiena lielumu, lieks ir tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

Novērojumi

42. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc devu došanas, jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi. Jāreģistrē dzīvnieku veselības stāvoklis. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību.

43. Vienu reizi pirms pirmās ekspozīcijas (lai varētu izdarīt salīdzinājumus vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vismaz reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojumi visiem vecākpaaudzes dzīvniekiem. Šie novērojumi jāizdara standartnožogojumā ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, katru dienu vienā un tajā pašā laikā. Tie rūpīgi jāreģistrē, ieteicams, izmantojot punktu sistēmas, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Jācenšas nodrošināt, lai testēšanas apstākļu mainība būtu minimāla un lai novērojumus izdarītu novērotāji, kas nav informēti par apstrādi. Jāreģistrē šādas pazīmes (neizsmeļošs saraksts): izmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, sekrētu un ekskrētu parādīšanās un veģetatīvās nervu sistēmas reakcijas (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas, neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska uzvedība (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana), grūtas vai ilgstošas dzemdības vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (10).

44. Kādā brīdī pētījuma laikā jānovērtē piecu tēviņu un piecu mātīšu, kas nejauši izvēlētas no katras grupas, sensorā reaktivitāte uz dažāda veida kairinājumiem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioreceptīvajiem kairinājumiem) (8) (9) (11), satvēriena spēks (12) un kustību aktivitāte (13). Papildinformācija par izmantojamajām procedūrām ir atrodama attiecīgajos atsauces materiālos. Tomēr norādīto procedūru vietā var izmantot arī citas procedūras. Tēviņiem šie funkcionālie novērojumi jāveic, tuvojoties devu došanas perioda beigām, neilgi pirms plānotās nonāvēšanas, bet pirms asins paraugu ņemšanas hematoloģijai vai klīniskās ķīmijas izmeklējumiem (sk. 53.–56. punktu, arī 1. zemsvītras piezīmi). Mātītēm šo funkcionālo testu laikā jābūt fizioloģiski līdzīgā stāvoklī, un tās vēlams testēt vienu reizi pēdējās laktācijas nedēļas laikā (piemēram, 6.–13. laktācijas dienā), neilgi pirms plānotās nonāvēšanas. Māšu un mazuļu atšķiršanas laikiem jābūt pēc iespējas īsākiem.

45. Funkcionālos novērojumus, kas veicami vienu reizi pētījuma beigās, var neveikt, ja pētījums ir provizorisks pētījums turpmākam subhroniskam (90 dienas) vai ilgtermiņa pētījumam. Tādā gadījumā funkcionālie novērojumi ir jāiekļauj minētajā turpmākajā pētījumā. Tomēr šajā atkārtotas devas pētījumā iegūtie funkcionālo novērojumu dati var atvieglot devu līmeņu izvēli turpmākajam subhroniskajam vai ilgtermiņa pētījumam.

46. Izņēmuma kārtā funkcionālos novērojumus var neveikt arī tām grupām, kurām toksicitātes pazīmes izpaužas tādā mērā, kas varētu ievērojami traucēt funkcionālā testa veikšanu.

47. Jāreģistrē gestācijas ilgums, ko aprēķina no 0. grūsnības dienas. Pēc atnešanās katru metienu iespējami drīz pārbauda, lai noteiktu mazuļu, nedzīvi dzimušo, dzīvi dzimušo un nīkuļu (mazuļi, kas ir ievērojami mazāki nekā atbilstīgie kontrolmazuļi) skaitu un dzimumu un acīmredzamu anomāliju klātbūtni.

48. 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. diena pēc piedzimšanas) un vismaz 4. un 13. dienā pēc piedzimšanas jāsaskaita dzīvie mazuļi un jānosaka to dzimums, un jānosver metieni. Papildus vecākpaaudzes dzīvnieku novērojumiem (sk. 43. un 44. punktu) jāreģistrē pēcnācēju uzvedības anomālijas.

49. Katra mazuļa *AGD* jāmēra vienā un tajā pašā dienā pēc piedzimšanas no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts *AGD*, un *AGD* ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (14). Kā ieteikts ESAO *GD* 151 (15), 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas ir jāsaskaita vīrišķā dzimuma mazuļu zīdekļi/areolas.

Ķermeņa masa un barības/ūdens patēriņš

50. Tēviņi un mātītes jānosver pirmajā devas došanas dienā, tad vismaz reizi nedēļā un pētījuma beigās. Grūsnības laikā mātītes jānosver 0., 7., 14. un 20. dienā un 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. pēcdzemdību diena), kā arī vismaz 4. un 13. pēcdzemdību dienā. Novērojumu rezultāti jāreģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

51. Pirmspārošanas, grūsnības un laktācijas laikā barības patēriņš jāmēra vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērīšana pārošanas laikā ir fakultatīva. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar ūdeni, minētajos laikposmos ir jāmēra arī ūdens patēriņš.

Hematoloģija

52. Pētījuma laikā pieciem tēviņiem un piecām mātītēm, kas nejauši izvēlētas no katras grupas, vienu reizi jāveic šādi hematoloģiski izmeklējumi: hematokrīts, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaits, retikulocīti, leikocītu skaits un leikocitārā formula, trombocītu skaits un asinsreces laika/potenciāla noteikšana. Ja testējamajai ķimikālijai vai tās iespējamajiem metabolītiem ir oksidējošas īpašības vai pastāv aizdomas, ka tiem tādas varētu būt, jānosaka arī methemoglobīna koncentrācija un Heinca ķermenīši.

53. Asins paraugi jāņem no norādītās vietas. Paraugu ņemšanas laikā mātītēm ir jābūt fizioloģiski līdzīgā stāvoklī. Lai izvairītos no praktiskām grūtībām, kas saistītas ar mainību grūsnības sākumā, asins savākšanu mātītēm var veikt pirms pārošanas perioda beigām kā alternatīvu paraugu ņemšanai tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās ietvaros. Asins paraugus no tēviņiem vēlams ņemt tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās ietvaros. Alternatīvi asins savākšanu tēviņiem var veikt arī pārošanas perioda beigās, ja šis brīdis ticis izvēlēts mātītēm.

54. Asins paraugi jāglabā piemērotos apstākļos.

Klīniskā bioķīmija

55. Asins paraugiem, kas iegūti no izvēlētiem pieciem tēviņiem un piecām mātītēm katrā grupā, veic klīniskās bioķīmijas analīzes, lai izpētītu būtisku toksisko ietekmi uz audiem un, konkrēti, uz nierēm un aknām. Ir ieteicams dzīvniekus nakti pirms asins paraugu ņemšanas nebarot ([1]). Plazmā vai serumā jānosaka nātrijs, kālijs, glikoze, kopējais holesterīns, urīnviela, kreatinīns, kopējais olbaltums un albumīns, vismaz divi fermenti, kas norāda uz hepatocelulāro ietekmi, (piemēram, alanīnaminotransferāze, aspartātaminotransferāze un sorbitoldehidrogenāze) un žultsskābes. Noteiktos apstākļos noderīgu informāciju var sniegt papildu fermentu (aknu fermentu vai citu fermentu) un bilirubīna noteikšana.

56. Asins paraugus no noteiktas vietas ņem saskaņā ar šādu grafiku:

— 4. dienā pēc piedzimšanas — no vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, ja mazuļu skaits to ļauj (sk. 40.-41. punktu),

— pētījuma beigās 13. dienā — no visām mātēm un vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, un

— pētījuma beigās — no visiem pieaugušiem tēviņiem.

Visus asins paraugus glabā piemērotos apstākļos. Asins paraugos, kas ņemti no mazuļiem 13. dienā un pieaugušiem tēviņiem, nosaka tiroīdhormonu (T4) seruma līmeņus. Ja vajadzīgs, T4 līmeņus nosaka arī asins paraugos, kas ņemti no mātēm un 4. dienas mazuļiem. Attiecīgā gadījumā var fakultatīvi mērīt citus hormonus. Tiroīdhormona analīžu veikšanai mazuļu asinis var apkopot pa metieniem. Tiroīdhormonus (T4 un TSH) vēlams mērīt kopējā formā (kopējais T4 un kopējais TSH).

([1]) Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekus nakti pirms asins ņemšanas nebarot. Tas ir vēlams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami palielinātu rezultātu mainību, kas varētu maskēt neizteiktāku ietekmi un apgrūtināt interpretēšanu. Tomēr barības nedošana uz nakti var ietekmēt (grūsno) dzīvnieku vispārējo vielmaiņu, traucēt laktāciju un zīdīšanu un jo īpaši barošanas pētījumos var ierobežot ikdienas eksponētību testējamajai ķimikālijai. Ja tiek izlemts dzīvniekus uz nakti atstāt bez barības, klīniskie bioķīmiskie mērījumi jāveic pēc pētījuma funkcionālo novērojumu izdarīšanas tēviņiem 4. nedēļā. Mātes jāpatur vēl vienu dienu pēc mazuļu izņemšanas, ko veic, piemēram, 13. dienā pēc piedzimšanas. Mātes jāatstāj uz nakti bez barības no 13. vai 14. laktācijas dienas, un pētījuma beigās ņemtie asins paraugi jāizmanto klīniskās ķīmijas parametru noteikšanai.

57. Pēdējā pētījuma nedēļā, izmantojot urīna savākšanu noteiktā laika periodā, pieciem nejauši izvēlētiem tēviņiem katrā grupā pēc izvēles var veikt šādus urīnanalīzes mērījumus: izskats, tilpums, osmolalitāte vai īpatnējais svars, pH, proteīns, glikoze un asinis/ asins šūnas.

58. Turklāt jāapsver iespēja veikt vispārēja audu bojājuma seruma marķieru izpēti. Ja testējamās ķimikālijas zināmās īpašības var ietekmēt saistītos metaboliskos profilus vai ir aizdomas par šādu ietekmi, jānosaka arī kalcijs, fosfāts, triglicerīdu līmenis tukšā dūšā un glikoze tukšā dūšā, īpaši hormoni, methemoglobīns un holīnesterāze. Tie jānosaka katrā gadījumā atsevišķi.

59. Noteikto hormonu mainību un absolūto koncentrāciju var ietekmēt šādi faktori:

— nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,

— nonāvēšanas metode, kurā dzīvniekiem netiek radīts nevajadzīgs stress, kas varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,

— hormonu noteikšanas testa komplekti, kas var atšķirties pēc standartlīknēm.

60. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem.

61. Ja vēsturiskie bāzlīnijas dati ir nepietiekami, jāapsver iespēja noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas mainīgos lielumus pirms devu došanas sākšanas vai, vēlams, dzīvniekiem, kas nav ietverti eksperimentālajās grupās. Dati par mātītēm jāiegūst no dzīvniekiem laktācijas periodā.

PATOLOĢIJA

Makroskopiskā autopsija

62. Visiem pētījumā izmantotajiem pieaugušajiem dzīvniekiem jāveic pilna, detalizēta makroskopiska autopsija, kas ietver ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa, krūšu un vēdera dobumu un to satura rūpīgu izpēti. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Jāreģistrē implantācijas vietu skaits. Autopsijas dienā jāizmeklē vaginālās uztriepes, lai noteiktu estrālā cikla fāzi un ļautu to saistīt ar mātīšu reproduktīvo orgānu histopatoloģiju.

63. Visu pieaugušo tēviņu sēklinieki un sēklinieku piedēkļi, kā arī prostata un sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām (kopā) pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem, un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Turklāt fakultatīvos orgānu masas mērījumos var ietvert arī tūpļa cēlājmuskuļa un briedumķermeņa muskuļa kompleksu, Kupera dziedzerus un dzimumlocekļa galviņu tēviņiem un abas olnīcas (slapjais svars) un dzemdi (ar dzemdes kaklu) mātītēm; ietveršanas gadījumā minētie masas mērījumi jāveic iespējami drīz pēc disekcijas. Jāsaglabā visu pieaugušo dzīvnieku olnīcas, sēklinieki, sēklinieku piedēkļi, iekšējie dzimumorgāni un visi orgāni, kam ir makroskopiski bojājumi.

64. Vairogdziedzeri, kas ņemti no visiem pieaugušajiem tēviņiem un mātītēm un viena 13 dienas veca vīrišķā dzimuma un sievišķā dzimuma mazuļa katrā metienā, vispiemērotākajā fiksējošajā vidē jāsaglabā paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai. Vairogdziedzera masu var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no pieguļošiem audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai izvairītos no audu bojājumiem. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi. Asins paraugi jāņem no precīzi norādītas vietas tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās laikā un jāglabā piemērotos apstākļos (sk. 56. punktu).

65. Turklāt vismaz piecu pieaugušu tēviņu un mātīšu, kas nejauši izvēlētas no katras grupas (izņemot dzīvniekus, kas ir nāvei tuvā stāvoklī un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām), aknas, nieres, virsnieres, tīms, liesa, smadzenes un sirds pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Šādi audi jāglabā audu tipam un paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai vispiemērotākajā fiksējošajā vidē: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvas daļas, tostarp galasmadzenes, smadzenītes un tilts), muguras smadzenes, acis, kuņģis, tievā un resnā zarna (arī Peijera plātnīte), aknas, nieres, virsnieres, liesa, sirds, tīms, traheja un plaušas (saglabātas, piepūšot ar fiksatoru un pēc tam iegremdējot), gonādas (sēklinieki un olnīcas), iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar prostatas priekšējo daivu), vagīna, urīnpūslis, limfmezgli (saskaņā ar laboratorijas pieredzi

papildus proksimālam drenējošam limfmezglam ir jāņem vēl viens limfmezgls (16)), perifērais nervs (sēžas nervs vai apakšstilba nervs), vēlams, tiešā muskuļa tuvumā, skeleta muskulis un kauls ar kaula smadzenēm (izgriezums vai, alternatīvi, svaigs kaula smadzeņu aspirāts). Sēkliniekus ieteicams fiksēt, iegremdējot tos Buēna fiksatorā vai Davidsona fiksatorā (16) (17) (18); šos audus nav ieteicams fiksēt formalīnā. Lai nodrošinātu fiksatora ātru penetrēšanos, bālgano apvalku (*tunica albuginea*) var abos orgāna polos uzmanīgi un sekli pārdurt ar adatu. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmajām testējamās ķimikālijas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem.

66. Vērtīgas norādes par endokrīnu iedarbību var gūt no šādiem audiem: gonādas (olnīcas un sēklinieki), iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām, dorsolaterālā un ventrālā prostata), vagīna, hipofīze, tēviņu krūts dziedzeris un virsnieru dziedzeris. Tēviņu krūts dziedzeru pārmaiņas nav pietiekami dokumentētas, taču šis parametrs var būt ļoti jutīgs pret vielām ar estrogēnisku iedarbību. To orgānu/audu novērošana, kas nav uzskaitīti 65. punktā, nav obligāta.

67. Nedzīvi mazuļi un mazuļi, kas nonāvēti 13. dienā pēc piedzimšanas vai drīz pēc tam, vismaz rūpīgi ārēji jāpārbauda, lai konstatētu iespējamas acīmredzamas anomālijas. Īpaša uzmanība jāpievērš ārējām reproduktīvajām ģenitālijām, kuras jāpārbauda, meklējot attīstības izmaiņu pazīmes.

Histopatoloģija

68. Saglabātajiem orgāniem un audiem, kas iegūti no atlasītajiem kontrolgrupas un lielākās devas grupas dzīvniekiem, veic pilnu histopatoloģisko izmeklēšanu (īpašu uzsvaru liekot uz spermatoģenēzes posmiem tēviņu gonādās un sēklinieku intersticiālo šūnu struktūras histopatoloģiju). Vajadzības gadījumā var izmeklēt mazuļu un pārējo pieaugušo dzīvnieku vairogdziedzeri. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar apstrādi saistītas pārmaiņas, minētie izmeklējumi jāattiecina arī uz citu devu grupu dzīvniekiem. Norādījumos par histopatoloģiju (10) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu disekciju, fiksāciju, secēšanu un histopatoloģiju.

69. Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi. Lai palīdzētu noskaidrot *NOAEL*, jāizmeklē mērķorgāni citās devu grupās, jo īpaši grupās, kas uzrāda *NOAEL*.

70. Ja izmanto satelītgrupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, uz kuriem apstrādātajās grupās ir konstatēta ietekme.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

71. Jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, kurā redzams testa sākumā katrā testā grupā esošo dzīvnieku skaits, to dzīvnieku skaits, kas atrasti miruši testa laikā vai eitanazēti humānu apsvērumu dēļ, nāves iestāšanās vai eitanāzijas laiks, auglīgo dzīvnieku skaits, grūsno mātīšu skaits, to dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, arī toksiskās darbības sākuma laiks, ilgums un stiprums, histopatoloģisko pārmaiņu veidi un visi relevantie dati par metienu. Tabulas veidā sagatavotā kopsavilkuma ziņojuma paraugs, kas ir ļoti noderīgs ietekmes uz reprodukciju/attīstību izvērtēšanai, ir sniegts 3. papildinājumā.

72. Ja iespējams, skaitliskie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Salīdzinot ietekmi visā devu diapazonā, jāizvairās no vairāku t-testu izmantošanas. Statistikas metodes jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā. *AGD* un zīdekļu retencijas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā ietekmi uz metienu. Vajadzības gadījumā analīzes vienība ir metiens. Mazuļu ķermeņa masas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā metiena lielumu. Tā kā pētījuma tvērums ir ierobežots, statistiskajai analīzei, ko veic, lai izvērtētu rezultātu nozīmīgumu, ir ierobežota vērtība attiecībā uz daudziem beigupunktiem, jo īpaši reproduktīvajiem beigupunktiem. Dažas no visplašāk izmantotajām metodēm, jo īpaši parametriskie testi centrālās tendences mērīšanai, nav piemērotas. Ja tiek izmantota statistiskā analīze, izvēlētajai metodei jābūt atbilstošai pārbaudāmā mainīgā lieluma sadalījumam, un tā jāizvēlas pirms pētījuma sākšanas.

Rezultātu izvērtēšana

73. Šā toksicitātes pētījuma konstatējumi jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, autopsiju un mikroskopiskos konstatējumus. Vērtējums ietver testējamās ķimikālijas devas saistību ar anomāliju — to vidū makroskopisko bojājumu, identificēto mērķorgānu, neauglības, klīnisko anomāliju, ietekmes uz reproduktīvajiem un metiena rādītājiem, ķermeņa masas pārmaiņu, ietekmes uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – esību vai neesību, incidenci un smagumu.

74. Tēviņu apstrādes periods ir īss, tāpēc, novērtējot ietekmi uz tēviņu reproduktīvo funkciju, papildus auglības datiem jāņem vērā sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija. Pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskus kontroles datus par reprodukciju/ontoģenēzi (piemēram, datus par metiena lielumu, *AGD*, zīdekļu retenciju, seruma T4 līmeņiem), ja tādi pieejami.

75. Kvalitātes kontroles vajadzībām ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

76. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma;

vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.;

daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnijas,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.,

— katra dzīvnieka masa testa sākumā,

— sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas nosacījumi:

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu,

— attiecīgā gadījumā testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa masas dienā),

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— detalizēts apraksts par nejaušināšanas procedūru, kas izmantota, lai atlasītu mazuļus izņemšanai no metiena, ja šāda izņemšana notikusi.

Rezultāti:

— ķermeņa masa / ķermeņa masas izmaiņas,

— attiecīgā gadījumā barības patēriņš un ūdens patēriņš,

— dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī dati par auglību, gestāciju un citām toksicitātes pazīmēm,

— gestācijas ilgums,

— toksiska vai cita iedarbība uz reprodukciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,

— klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),

— sensoriskās aktivitātes, satvēriena spēka un kustību aktivitātes novērtējums,

— hematoloģiskie testi ar attiecīgajām bāzes līnijas vērtībām,

— klīniskās bioķīmijas testi ar attiecīgajām bāzes līnijas vērtībām,

— pieaugušu mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,

— dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudums,

— to mazuļu skaits, kam ir makroskopiskas anomālijas, ārējo ģenitāliju makroskopisks izvērtējums, nīkuļu skaits,

— nāves iestāšanās laiks testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,

— implantāciju skaits, metiena lielums un masa datu reģistrēšanas laikā,

— mazuļu ķermeņa masas dati,

— visu mazuļu *AGD* (un ķermeņa masa *AGD* mērīšanas dienā),

— zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem,

— vairogdziedzera hormonu līmenis 13 dienu veciem mazuļiem un pieaugušiem tēviņiem (un mātēm un 4 dienas veciem mazuļiem, ja šādi mērījumi veikti),

— ķermeņa masa nonāvēšanas laikā un dati par vecākpaaudzes dzīvnieku orgānu masu,

— autopsijas konstatējumi,

— histopatoloģiskas izmeklēšanas rezultātu detalizēts apraksts,

— absorbcijas dati (ja pieejami),

— rezultātu statistiskā apstrāde (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Rezultātu interpretēšana

77. Pētījums sniegs izvērtējumu par reproduktīvo/ontoģenētisko toksicitāti, kas saistīta atkārtotu devu došanu. Konkrētāk, tā kā uzsvars ir likts uz vispārējās toksicitātes un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes beigupunktiem, pētījuma rezultāti ļaus reproduktīvo/ontoģenētisko ietekmi, kas radusies bez vispārējas toksicitātes, atšķirt no ietekmes, kura izpaužas tikai pie līmeņiem, kas ir toksiski arī vecākpaaudzes dzīvniekiem (sk. 7.–11. punktu). Tas varētu norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākas izmeklēšanas un sniegt norādījumus turpmāko pētījumu plānošanā. Ar reprodukciju un ontoģenēzi saistīto rezultātu interpretēšanā par palīglīdzekli jāizmanto ESAO norādījumu dokuments Nr. 43 (19). ESAO norādījumu dokumentā Nr. 106 par grauzēju endokrīno un reproduktīvo testu histoloģisko izvērtēšanu (16) sniegta informācija par (endokrīno) orgānu un vaginālo uztriepju sagatavošanu un izvērtēšanu; minētā informācija var būt noderīga saistībā ar šo testēšanas metodi.

LITERATŪRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(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. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS (SK. ARĪ (20) ESAO *GD 150*)

Androgenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17ß) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska tiroīdhormona (piemēram, T_3) darbību.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ontoģenētiskā toksicitāte reproduktīvās toksicitātes izpausme, kas liecina par pēcnācēju prenatāliem, perinatāliem, postnatāliem, strukturāliem vai funkcionāliem traucējumiem.

Deva ir ievadītās testējamās ķimikālijas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķimikālijas masu uz testa dzīvnieka ķermeņa masas vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa masas dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Izteikta toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt bīstamību, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksicitātes pazīmes un, iespējams, mirstību.

Fertilitātes traucējumi ir tēviņu vai mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Maternālā toksicitāte nelabvēlīgā ietekme uz gravidām mātītēm, kas ir specifiska (tieša ietekme) vai nespecifiska (netieša ietekme) un saistīta ar gravidu stāvokli.

NOAEL ir saīsinājums, kas apzīmē nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17ß).

Reproduktīvā toksicitāte ir kaitīga ietekme uz pēcnācējiem un/vai tēviņu un mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

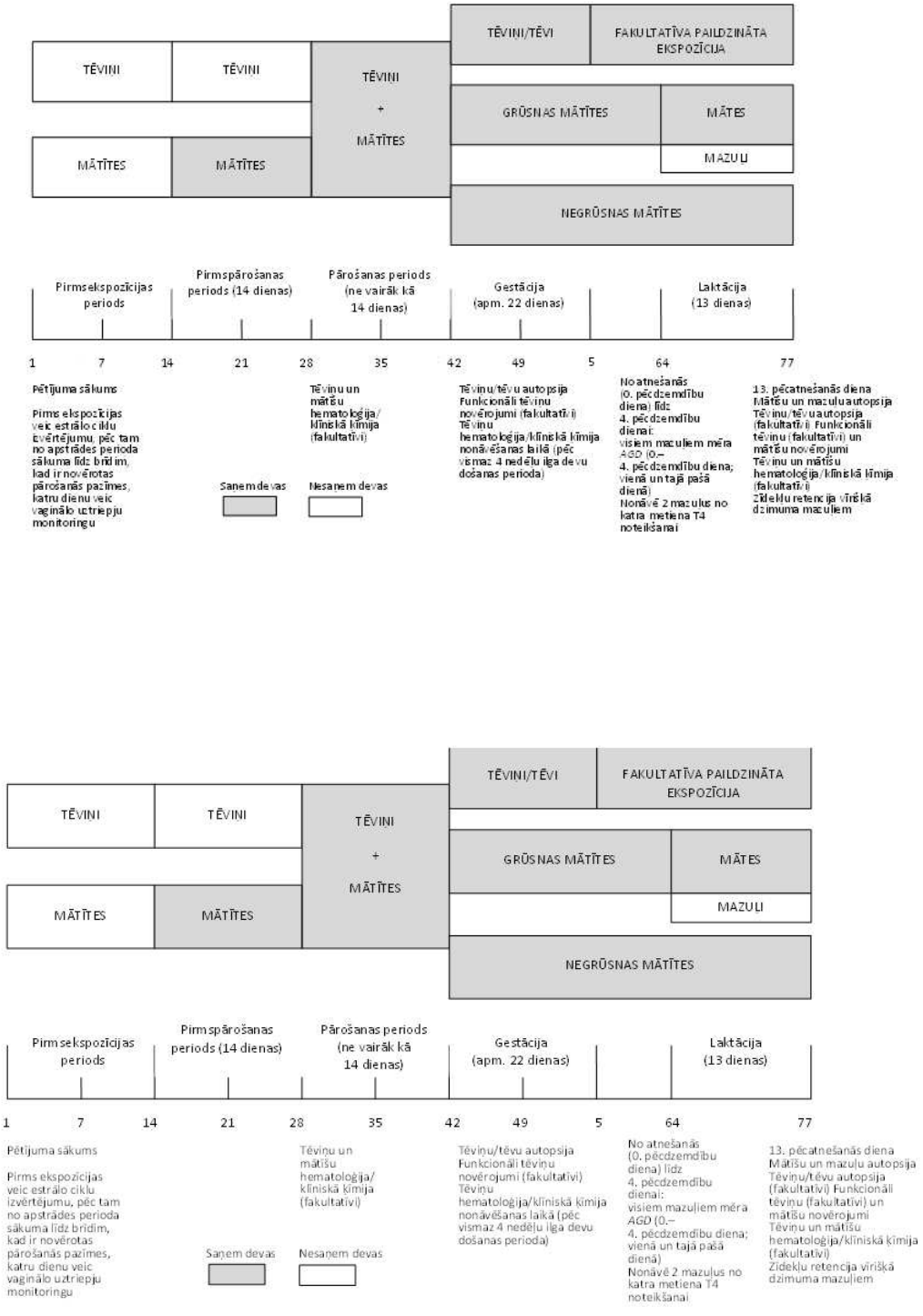
Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Tireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam tiroīdhormonam (piemēram, T_3).

Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās ticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

2. papildinājums

EKSPERIMENTA GRAFIKA SHĒMA, KURĀ NORĀDĪTS MAKSIMĀLAIS PĒTĪJUMA ILGUMS, KURA PAMATĀ IR 14 DIENU ILGS PĀROŠANAS PERIODS



3. papildinājums

TABULAS VEIDĀ SAGATAVOTS KOPSAVILKUMA ZIŅOJUMS PAR IETEKMI UZ REPRODUKCIJU/ONTOĢENĒZI

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrole)	…	…	…	…
Dzīvnieku pāri (N)					
Estrālais cikls (vismaz vidējais neregulāru ciklu ilgums un biežums)					
Mātītes, kam novērojamas kopulācijas pazīmes (N)					
Grūsnas mātītes (N)					
Apaugļošanās dienas 1–5 (N)					
Apaugļošanās dienas 6–...([1] (1)) (N)					
Grūsnība≤21 diena (N)					
Grūsnība = 22 dienas (N)					
Grūsnība ≥ 23 dienas (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem 4. dienā pēc dzemdībām (N)					
Implanti vienai mātei (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei piedzimšanas brīdī (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei 4. dienā (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) piedzimstot (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa piedzimstot (vidēji)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Mazuļu masa piedzimstot (vidēji)					
Mazuļu masa *AGD* mērīšanas laikā (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Mazuļu *AGD* tajā pašā postnatālajā dienā, laikā no dzimšanas līdz 4. dienai (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa 13. dienā (vidēji)					
Zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem 13. dienā (vidēji)					
MAZUĻI AR ANOMĀLIJĀM					
Mātes, kam nav neviena šāda mazuļa					
Mātes ar 1 šādu mazuli					
Mātes ar ≥ 2 šādiem mazuļiem					
PĒCNĀCĒJU ZUDUMI					
Prenatāli (implantāciju skaits mīnus dzīvi dzimušo skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					
Postnatāli (dzīvi dzimušo skaits mīnus 13. postnatālajā dienā dzīvo mazuļu skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					

([1]) pārošanas perioda pēdējā diena

B.65. *IN VITRO* BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODE ATTIECĪBĀ UZ ĀDAS KOROZIJU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 435 (2015). Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķimikālija atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Šī testēšanas metode, kas ir ekvivalenta atjauninātajai ESAO testēšanas vadlīnijai Nr. 435, nosaka *in vitro* barjermembrānas testa metodi, ko var izmantot kodīgu ķimikāliju identificēšanai. Testēšanas metodē izmanto mākslīgu membrānu, kas izstrādāta tā, lai tā reaģētu uz kodīgām ķimikālijām līdzīgā veidā kā dzīvnieku āda *in situ*.

2. Kodīgumu ādai parasti novērtē, aplicējot testējamo ķimikāliju uz dzīvu dzīvnieku ādas un nosakot audu bojājumu pakāpi pēc noteikta laika (2). Papildus šai testēšanas metodei ir pieņemtas vairākas citas *in vitro* testēšanas metodes, kas ir alternatīvas (3)(4) *in vivo* standartprocedūrai ar truša ādu (šā pielikuma B.4. nodaļa, ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404), kuru izmanto kodīgu ķimikāliju identificēšanai (2). ANO *GHS* secīgu pārbaužu un izvērtēšanas stratēģijā kodīguma ādai novērtēšanai un klasificēšanai un ESAO norādījumu dokumentā par integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju ieteikts izmantot validētas un pieņemtas *in vitro* testēšanas metodes, kas aprakstītas 3. un 4. modulī (1)(5). *IATA* apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana, tostarp gadījumos, kad ir iegūti negatīvi rezultāti (5). Atbilstoši šai modulārajai pieejai pozitīvos rezultātus, kas iegūti, īstenojot *in vitro* testēšanas metodi, var izmantot ķimikāliju klasificēšanai par kodīgām vielām bez nepieciešamības veikt testus ar dzīvniekiem, tādējādi samazinot un pilnveidojot dzīvnieku izmantošanu un novēršot sāpes un diskomfortu, ko dzīvniekiem var radīt to izmantošana minētajam mērķim.

3. *In vitro* barjermembrānas modeļa, kas komerciāli pieejams ar nosaukumu *Corrositex*®, validācijas pētījumi ir pabeigti (6)(7)(8), un tie liecina, ka šā modeļa vispārējā pareizība ādas korozijas paredzēšanā ir 79 % (128/163), jutība — 85 % (76/89) un specifiskums — 70 % (52/74), izmantojot 163 vielu un maisījumu datubāzi (7). Šo validēto referencmetodi (VRM), pamatojoties uz tās atzīto derīgumu, ieteicams izmantot par daļu no secīgu pārbaužu stratēģijas ķimikāliju ādas korozijas briesmu potenciāla novērtēšanai (5)(7). Pirms attiecībā uz ādas koroziju iespējams regulatīvām vajadzībām izmantot kādu *in vitro* barjermembrānas modeli, saskaņā ar iepriekš noteiktiem veiktspējas standartiem (VS) (10) būtu jānosaka tā ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tā līdzību VRM (9). ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, kad jebkāda jauna ierosināta vai atjaunināta VS atbilstoša metode būs izskatīta un iekļauta ekvivalentajā ESAO testēšanas vadlīnijā. Patlaban tikai viena *in vitro* metode ir iekļauta ESAO testēšanas vadlīnijā Nr. 435 un šajā testēšanas metodē, proti, komerciāli pieejamais *Corrositex*® modelis.

4. Citās testēšanas metodēs kodīguma ādai testēšanai izmanto rekonstruētu cilvēka ādu (ESAO *TG* Nr. 431) (3) un izolētu žurkas ādu (ESAO *TG* Nr. 430) (4). Šī testēšanas vadlīnija paredz arī kodīgo ķimikāliju iedalīšanu trīs ANO *GHS* kodīguma apakškategorijās un trīs ANO transportēšanas iepakojuma grupās attiecībā uz kodīguma risku. Šī testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2006. gadā un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un atjauninātu standartvielu sarakstu.

DEFINĪCIJAS

5. Izmantotās definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

6. Šajā testēšanas metodē aprakstītais tests dod iespēju identificēt kodīgas testējamās ķimikālijas un ļauj kodīgas testējamās ķimikālijas iedalīt apakškategorijās saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* (1. tabula). Turklāt šādu testēšanas metodi var izmantot, lai konkrētām transportēšanas testu vajadzībām pieņemtu lēmumus par konkrētu ķimikāliju klašu, piemēram, organisku un neorganisku skābju, skābju atvasinājumu ([2]) un bāžu, kodīgumu vai nekodīgumu (7)(11)(12). Šajā testēšanas metodē aprakstīta vispārēja procedūra, kas ir līdzīga validētajai testēšanas referencmetodei (7). Šī testēšanas metode gan pietiekami neinformē par ādas kairinājumu, taču jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

([2]) "Skābes atvasinājums" ir nespecifiskas klases apzīmējums, un to plaši definē kā ķimikāliju, kas iegūta no kādas skābes vai nu tieši, vai ar modificēšanu vai daļēju aizstāšanu. Šajā klasē ietilpst anhidrīdi, halogēnskābes, sāļi un citi ķimikāliju veidi.

ādas kairinājums *in vitro* īpaši pievēršas TM B.46., kas ir ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 439 (13). Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (5).

1. tabula

ANO *GHS* kategorija "Kodīgs ādai" un tās apakškategorijas [1]

Kodīguma kategorija (1. kategorija) (iestādēm, kas neizmanto apakškategorijas)	Iespējamās kodīguma apakškategorijas [1] (iestādēm, kas izmanto apakškategorijas, tostarp *CLP* regulu)	Kodīgs ≥ 1 no 3 dzīvniekiem	
		Ekspozīcija	Novērošana
Kodīgs	Kodīguma apakškategorija 1A	≤ 3 minūtes	≤ 1 stunda
	Kodīguma apakškategorija 1B	> 3 minūtes / ≤ 1 stunda	≤ 14 dienas
	Kodīguma apakškategorija 1C	> 1 stunda / ≤ 4 stundas	≤ 14 dienas

[1] Eiropas Savienībā *CLP* regula nosaka trīs kodīguma ādai apakškategorijas 1A, 1B un 1C.

7. Validētās referencmetodes (7) ierobežojums ir tāds, ka daudzas nekodīgas ķimikālijas un dažas kodīgas ķimikālijas, pamatojoties uz sākotnējā saderības testa rezultātiem (sk. 13. punktu), var netikt atzītas par derīgām testēšanai. Ķimikālijas uz ūdens bāzes, kuru pH ir diapazonā no 4,5 līdz 8,5, bieži vien nav derīgas testēšanai; tomēr 85 % no testētajām ķimikālijām, kuru pH ir minētajā diapazonā, nebija kodīgas testos ar dzīvniekiem (7). *In vitro* barjermembrānas metodi var izmantot, lai testētu cietvielas (ūdenī šķīstošas vai nešķīstošas), šķidrumus (ūdens vai neūdens) un emulsijas. Tomēr ar barjermembrānas metodi nevar testēt tādas testējamās ķimikālijas, kas neizraisa detektējamas izmaiņas saderības testā (piemēram, krāsas maiņu validētās testēšanas referencmetodes ķimikāliju detektēšanas sistēmā (*CDS*)); tās jātestē, izmantojot citas testēšanas metodes.

TESTA PRINCIPS

8. Testēšanas sistēmai ir divi komponenti: sintētiska makromolekulāra biobarjera un ķimikāliju detektēšanas sistēma (*CDS*); ar šo testēšanas metodi, izmantojot *CDS*, nosaka barjermembrānas bojājumus, kas rodas pēc kodīgas testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz sintētiskas makromolekulāras barjermembrānas (7) un ko izraisa, domājams, tie paši korozijas mehānismi, kuri iedarbojas uz dzīvu ādu.

9. Barjermembrānas penetrāciju (jeb ķimikālijas izlaušanos cauri tai) var mērīt, izmantojot vairākas procedūras vai *CDS*; to var mērīt arī pēc pH indikatorkrāsvielas krāsas izmaiņām vai kādu citu zem barjeras esoša indikatoršķīduma īpašību izmaiņām.

10. Jānosaka, vai barjermembrāna ir derīga, t. i., atbilstīga un uzticama, paredzētajam lietojumam. Šajā sakarā ir jāpārliecinās, ka dažādi preparāti nodrošina barjeras īpašības, piemēram, tie spēj saglabāt barjeru pret nekodīgām ķimikālijām, un tie dod iespēju ķimikāliju kodīgās īpašības iedalīt dažādajās ANO *GHS* kodīguma apakškategorijās (1). Piešķirtā klasifikācija pamatojas uz laiku, kādā ķimikālija caur barjermembrānu nokļūst līdz indikatoršķīdumam.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

11. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo *in vitro* barjermembrānas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 2. tabulā ieteiktās 12 standartvielas. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (10)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

2. tabula

Standartvielas [1]

Viela [2]	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase	*In Vivo* ANO *GHS* apakškategorija [3]	*In Vitro* ANO *GHS* apakškategorija [3]
Bora trifluorīddihidrāts	13319-75-0	Neorganiskas skābes	1A	1A
Slāpekļskābe	7697-37-2	Neorganiskas skābes	1A	1A
Fosfora pentahlorīds	10026-13-8	Neorganisko skābju prekursori	1A	1A
Valerilhlorīds	638-29-9	Skābju hlorīdi	1B	1B
Nātrija hidroksīds	1310-73-2	Neorganiskas bāzes	1B	1B
1-(2-aminoetil) piperazīns	140-31-8	Alifātiskie amīni	1B	1B
Benzolsulfonilhlorīds	98-09-9	Skābju hlorīdi	1C	1C
N, *N*-dimetilbenzilamīns	103-83-3	Anilīni	1C	1C
Tetraetilēnpentamīns	112-57-2	Alifātiskie amīni	1C	1C
Eigenols	97-53-0	Fenoli	NK	NK
Nonilakrilāts	2664-55-3	Akrilāti/metakrilāti	NK	NK
Nātrija bikarbonāts	144-55-8	Neorganiski sāļi	NK	NK

(1) Iepriekš sarakstā norādītās divpadsmit vielas ietver trīs vielas no katras no trim ANO *GHS* kodīgo vielu apakškategorijām un trīs nekodīgas vielas, tās ir viegli pieejamas no komerciāliem piegādātājiem un ANO *GHS* apakškategorija ir balstīta uz rezultātiem, kas iegūti, veicot kvalitatīvu testēšanu *in vivo*. Šīs vielas izvēlētas no saraksta ar 40 standartvielām, kas iekļautas to ķimikāliju minimālajā sarakstā, kuras norādītas tādu testēšanas metožu pareizības un ticamības pierādīšanai, kuras ir strukturāli un funkcionāli līdzīgas validētajai testēšanas referencmetodei, un kas atlasītas no 163 standartvielām, ko sākotnēji izmantoja testēšanas referencmetodes (*Corrositex*®) validēšanai (7) (10) (14). Minētās atlases mērķis bija, ciktāl iespējams, iekļaut ķimikālijas, kas: ir reprezentatīvas attiecībā uz tādu kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas; ANO iepakojuma grupu I, II un III kodīgas vielas), ko iespējams mērīt vai paredzēt ar validēto testēšanas referencmetodi; ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas procesos izmantotajām ķimikāliju klasēm; ir ar labi definētu ķīmisku struktūru; ar validēto testēšanas referencmetodi inducē reproducējamus rezultātus; *in vivo* referenctestā inducē skaidrus rezultātus; ir komerciāli pieejamas un ar tām nesaistās augstas likvidēšanas izmaksas (14).
(2) Vielas, kas testētas tīrā veidā vai ar tīrību ≥ 90 %.
(3) ANO *GHS* apakškategoriju 1A, 1B un 1C attiecīgās ANO iepakojuma grupas ir I, II un III. NK — nekodīgs.

PROCEDŪRA

12. Turpmākajos punktos aprakstīti kodīguma novērtēšanai paredzētās uz pašreizējo VRM, proti, komerciāli pieejamo *Corrositex*®, balstītās mākslīgas barjermembrānas testa metodes (7)(15) komponenti un procedūras. Barjermembrānu un saderības šķīdumus vai indikatoršķīdumus, kā arī šķīdumus, ko izmanto ķimikāliju kategorizēšanai, var izstrādāt, sagatavot vai iegūt tirdzniecībā, piemēram, VRM *Corrositex*® gadījumā. Validētajai testēšanas referencmetodei ir pieejams parauga testēšanas metodes protokols (7). Testēšana jāveic apkārtējās vides temperatūrā (17–25 °C), un komponentiem jāatbilst šādiem nosacījumiem.

Testējamās ķimikālijas saderības tests

13. Pirms barjermembrānas testa veikšanas veic saderības testu, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir detektējama ar *CDS*. Ja testējamo ķimikāliju ar *CDS* nevar detektēt, barjermembrānas testa metode nav piemērota konkrētās testējamās ķimikālijas iespējamā kodīguma izvērtēšanai un jāizmanto cita testēšanas metode. Saderības testā izmantotajai *CDS* un ekspozīcijas nosacījumiem jāatspoguļo ekspozīcija turpmākajā barjermembrānas testā.

Testējamās ķimikālijas laika skalas kategorijas tests

14. Ja testēšanas metode to ļauj, testējamai ķimikālijai, kas ir kvalificēta ar saderības testu, jāveic laika skalas kategorijas tests, proti, skrīninga tests, ko izmanto, lai nošķirtu vājas un stipras skābes vai bāzes. Piemēram, validētajā testēšanas referencmetodē laika skalas kategorizēšanas testu izmanto, lai atkarībā no tā, vai ir detektēta būtiska skābju vai sārmu rezerve, noteiktu, kura no divām laika skalām būtu jāizmanto. Kodīguma un ANO *GHS* kodīguma ādai apakškategorijas noteikšanai būtu jāizmanto divas atšķirīgas izlaušanās laika skalas atkarībā no testējamās ķimikālijas skābju vai sārmu rezerves.

BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODES KOMPONENTI

Barjermembrāna

15. Barjermembrāna sastāv no diviem komponentiem: makromolekulāra ūdens proteīngela un caurlaidīgas pamatmembrānas. Proteīngelam jābūt šķidrumu un cietvielas necaurlaidīgam, taču tas var korodēties un kļūt caurlaidīgs. Gatavā barjermembrāna jāuzglabā iepriekš noteiktos apstākļos, kas novērš gela bojāšanos, piemēram, izžūšanu, mikrobu augšanu, tā nobīdi un plaisāšanu, kas varētu pasliktināt tā funkciju. Jānosaka pieļaujamais glabāšanas termiņš un barjermembrānas preparāti, ko pēc minētā termiņa neizmanto.

16. Caurlaidīgā pamatmembrāna nodrošina mehānisku balstu proteīngelam sarecēšanas procesā un eksponētību testējamajai ķimikālijai. Pamatmembrānai jānovērš gela noslīdēšana vai nobīde, un tai viegli jālaiž cauri visas testējamās ķimikālijas.

17. Proteīngels, kas sastāv no proteīna, piemēram, keratīna, kolagēna vai proteīnu maisījumiem, kuri veido gela matrici, kalpo par testējamās ķimikālijas mērķi. Proteīnmateriālu novieto uz pamatmembrānas virsmas, un pirms barjermembrānas novietošanas uz indikatoršķīduma tam ļauj sarecēt. Proteīngelam jābūt viscaur vienādi biezam un blīvam un bez gaisa burbuļiem vai defektiem, kas varētu ietekmēt tā funkcionālo integritāti.

Ķimikāliju detektēšanas sistēma (*CDS*)

18. Indikatoršķīdumam, kas ir tas pats šķīdums, ko izmanto saderības testā, būtu jāreaģē uz testējamās ķimikālijas klātbūtni. Jāizmanto pH indikatorkrāsviela vai krāsvielu kombinācija, piemēram, krezolsarkanais un metiloranžais, kas, reaģējot uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, maina savu krāsu. Mērīšanas sistēma var būt vizuāla vai elektroniska.

19. Lai noteiktu detektējamo ķimikāliju klāstu un detektēšanas kvantitatīvos ierobežojumus, jānovērtē, cik relevantas un ticamas ir detektēšanas sistēmas, kas izstrādātas, lai detektētu testējamās ķimikālijas iziešanu caur barjermembrānu.

TESTA NORISE

Testēšanas metodes komponentu montāža

20. Barjermembrānu ievieto ar indikatoršķīdumu pildītā mēģenē (vai caurulē) tā, lai pamatmembrāna pilnībā saskartos ar indikatoršķīdumu un nerastos gaisa burbuļi. Jāraugās, lai tiktu saglabāta barjeras integritāte.

Testējamās ķimikālijas aplicēšana

21. Testējamo ķimikāliju pietiekamā daudzumā, piemēram, 500 µl šķidruma vai 500 mg smalki saberztas pulverveida cietvielas veidā (7), rūpīgi uzklāj uz barjermembrānas augšējās virsmas un vienmērīgi izkliedē. Katrai testējamajai ķimikālijai un to atbilstošajām kontrolēm (sk. 23.–25. punktu) sagatavo pietiekamu skaitu replikātu, piemēram, četrus (7). Reģistrē laiku, kad testējamā ķimikālija aplicēta uz barjermembrānas. Lai nodrošinātu, ka tiek precīzi reģistrēti īsi korozijas laiki, testējamās vielas replikātu mēģenēs aplicē dažādos laikos.

Barjermembrānas penetrācijas mērījumi

22. Katru mēģeni pienācīgi uzrauga, un reģistrē laiku, kad notikušas pirmās izmaiņas indikatoršķīdumā, t. i., barjeras penetrācija, un nosaka laika intervālu no aplicēšanas līdz barjermembrānas penetrācijai.

Kontroles

23. Testos, kuros testējamo ķimikāliju izmanto kopā ar nesēju vai šķīdinātāju, nesējam vai šķīdinātājam jābūt saderīgam ar barjermembrānas sistēmu, proti, tam nevajadzētu izjaukt barjermembrānas sistēmas integritāti un mainīt testējamās ķimikālijas kodīgumu. Attiecīgā gadījumā, lai noteiktu šķīdinātāja saderību ar barjermembrānas sistēmu, vienlaikus ar testējamo ķimikāliju jātestē šķīdinātāja (vai nesēja) kontrole.

24. Lai novērtētu, vai testēšanas sistēma darbojas pieņemami, vienlaikus ar testējamo ķimikāliju jātestē arī pozitīva (kodīga) kontrole ar vidēju kodīguma aktivitāti, piemēram, 110 ± 15 mg nātrija hidroksīda (ANO *GHS* 1.B kodīguma apakškategorija) (7). Lai izvērtētu kodīgas testējamās ķimikālijas relatīvo kodīguma potenciālu, var būt lietderīgi izmantot otru pozitīvo kontroli, kas pieder pie tās pašas ķimikāliju klases kā testējamā ķimikālija. Jāizvēlas vidēji kodīga pozitīvā kontrole vai kontroles (piemēram, ANO *GHS* 1.B apakškategorija), lai detektētu izmaiņas penetrēšanās laikā, kas var būt nepieņemami ilgāks vai īsāks par noteikto atsauces vērtību un tādējādi norādīt uz to, ka testēšanas sistēma nedarbojas pareizi. Ārkārtīgi kodīgas (ANO *GHS* 1.A apakškategorija) vai nekodīgas ķimikālijas šim nolūkam nav sevišķi lietderīgas. ANO *GHS* 1.B apakškategorijas ķimikālija ļautu detektēt pārāk garu vai īsu izlaušanās laiku. Lai noteiktu testēšanas metodes spēju konsekventi atšķirt vāji kodīgas un nekodīgas ķimikālijas, par pozitīvo kontroli var izmantot vāji kodīgu ķimikāliju (ANO *GHS* 1.C apakškategorija). Neatkarīgi no izmantotās pieejas jānosaka pieņemams pozitīvās kontroles atbildreakciju intervāls, kas balstīts uz izmantotās pozitīvās kontroles vai kontroļu izlaušanās laiku vēsturisko intervālu, piemēram, vidējās standartnovirzes ± 2-3. Lai varētu detektēt novirzes ārpus pieņemamā intervāla, katrā pētījumā jānosaka precīzs pozitīvās kontroles izlaušanās laiks.

25. Vienlaikus ar testējamo ķimikāliju jātestē arī negatīva (nekodīga) kontrole, piemēram, 10 % citronskābe, 6 % propionskābe (7), kas ir vēl viens kvalitātes kontroles līdzeklis, ar ko pierādīt barjermembrānas funkcionālo integritāti.

Pētījuma pieņemamības kritēriji

26. Testējamās ķimikālijas kodīguma prognozēšanai izmanto laiku (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz barjermembrānas līdz barjeras penetrācijai, atbilstīgi katrai ANO *GHS* kodīguma apakškategorijai noteiktajiem laika parametriem. Lai pētījumu uzskatītu par pieņemamu, paralēlajai pozitīvajai kontrolei jāuzrāda sagaidāmais penetrēšanās atbildreakcijas laiks (piemēram, 8–16 minūtes ilgs izlaušanās laiks, ja par pozitīvo kontroli izmanto nātrija hidroksīdu), paralēlā negatīvā kontrole nedrīkst būt kodīga un paralēlā šķīdinātāja kontrole, ja tāda ir iekļauta, nedrīkst būt kodīga un tā nedrīkst mainīt testējamās ķimikālijas kodīguma potenciālu. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, izmantojot 2. tabulā ieteiktās 12 vielas. Attiecībā uz jaunām atdarinājuma metodēm, kas izstrādātas saskaņā ar šo testēšanas metodi un ir strukturāli un funkcionāli līdzīgas validētajai referencmetodei (14), pirms jaunās metodes izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāpierāda tās ticamība un pareizība, šim nolūkam izmantojot iepriekš noteiktus veiktspējas standartus (10).

Rezultātu interpretēšana un testējamo ķimikāliju kodīguma klasifikācija

27. Testējamo ķimikāliju ANO *GHS* kodīguma apakškategorijās (1) un attiecīgā gadījumā ANO iekopojuma grupā (16) klasificē atbilstoši laikam (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķimikālijas aplicēšanas barjermembrānai līdz barjeras penetrācijai. Katrai piedāvātajai testēšanas metodei nosaka laika sliekšņvērtības katrā no trim kodīguma apakškategorijām. Pieņemot galīgos lēmumus par laika sliekšņvērtībām, jāņem vērā nepieciešamība līdz minimumam samazināt korozijas briesmu pārāk zemas klasifikācijas (t. i., šķietami negatīvu rezultātu) skaitu. Pašreizējā testēšanās vadlīnijā jāizmanto metodes *Corrositex*® laika sliekšņvērtības, kas norādītās 3. tabulā, jo tā patlaban ir vienīgā testēšanas vadlīnijā ietvertā testēšanas metode (7).

3. tabula

Corrositex® prognozes modelis

Vidējais izlaušanās laiks (minūtēs)		ANO *GHS* prognoze [3]
1. kategorijas testējamās ķimikālijas [1] (nosaka ar metodē paredzēto kategorizēšanas testu)	1. kategorijas testējamās ķimikālijas [2] (nosaka ar metodē paredzēto kategorizēšanas testu)	
0–3 min	0–3 min	Kodīgs fakultatīvā 1.A apakškategorija
> 3 līdz 60 min	> 3 līdz 30 min	Kodīgs fakultatīvā 1.B apakškategorija
> 60 līdz 240 min	> 30 līdz 60 min	Kodīgs fakultatīvā 1.C apakškategorija
> 240 min	> 60 min	Nekodīgs

[1] Testējamās ķimikālijas ar lielu skābju/sārmu rezervi (6).
[2] Testējamās ķimikālijas ar mazu skābju/sārmu rezervi (6).
[3] ANO *GHS* 1.A, 1.B un 1.C apakškategorija atbilst attiecīgi ANO I, II un III iepakojuma grupai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

28. Laiks (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķimikālijas un pozitīvās kontroles vai kontroļu aplicēšanas līdz barjeras penetrācijai, jānorāda tabulā katram replikātam atsevišķi, kā arī jānorāda katra izmēģinājuma vidējā ± standartnovirze.

Testēšanas pārskats

29. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles vielas:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Nesējs:

— identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums;

— nesēja izraudzīšanās pamatojums.

Izmantotais in vitro *barjermembrānas modelis un protokols, arī pierādīta pareizība un ticamība*

Testēšanas nosacījumi:

— izmantoto iekārtu un sagatavošanas procedūru apraksts;

— izmantotās *in vitro* barjermembrānas izcelsme un sastāvs;

— indikatoršķīduma sastāvs un īpašības;

— detektēšanas metode;

— testējamās ķimikālijas un kontroles vielas daudzumi;

— replikātu skaits;

— laika skalas kategorijas testa apraksts un pamatojums;

— aplicēšanas metode;

— novērojumu laiki;

— izmantoto izvērtēšanas un klasificēšanas kritēriju apraksts;

— apliecināta kompetence testēšanas metodes veikšanā, kura pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, veicot standartķimikāliju testēšanu.

Rezultāti:

— tabulā apkopoti individuāli jēldati, kas iegūti no katra replikāta individuāliem testa un kontroles paraugiem;

— citas novērotās ietekmes apraksts;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

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

(2) Šā pielikuma B.4. nodaļa "Akūts ādas kairinājums/korozija".

(3) Šā pielikuma B.40a nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: rekonstruētas cilvēka epidermas *RHE* tests".

(4) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānā elektriskā pretestība (TEP)".

(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. Available at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Available at: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Available at: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (9).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Ķimikāliju detektēšanas sistēma (*CDS*): vizuāla vai elektroniska mērīšanas sistēma, kurā izmanto indikatoršķīdumu, kas reaģē uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, piemēram, ar izmaiņām pH indikatorkrāsvielā vai krāsvielu kombinācijā, kam, reaģējot uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, mainīsies krāsa, vai ar cita veida ķīmiskām vai elektroķīmiskām reakcijām.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veiktspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (9).

***GHS* (Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma)**: sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairākām vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta (9).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (9).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorisko un starplaboratorisko reproducējamību (9).

Jutība: tas, cik liela daļa visu pozitīvo/aktīvo ķimikāliju ar šo testēšanas metodi tiek pareizi kvalificētas. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Ādas korozija *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz ādas uz laiku līdz četrām stundām. Tipiskas reakcijas uz kodīgumu ir čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

B.66 STABILI TRANSFICĒTAS TRANSAKTIVĀCIJAS *IN VITRO* TESTI, AR KO KONSTATĒ ESTROGĒNU RECEPTORU AGONISTUS UN ANTAGONISTUS

VISPĀRĪGS IEVADS

ESAO rezultātbalstītas testēšanas vadlīnijas

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 455 (2016) aprakstītajam. TG 455 ir veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnija (PBTG), kurā aprakstīta stabili transficētas transaktivācijas *in vitro* testēšanas metodika, ar ko konstatē estrogēnu receptoru agonistus un antagonistus (ER TA testi). Tajā ietilpst vairākas mehānistiski un funkcionāli līdzīgas testēšanas metodes, ko izmanto, lai identificētu estrogēnu receptora (t.i., ERα un/vai ERβ) agonistus un antagonistus, un tā varētu atvieglot jaunu līdzīgu vai modificētu testēšanas metožu izstrādi atbilstīgi validēšanas principiem, kas izklāstīti ESAO vadlīniju dokumentā par Bīstamības novērtēšanā izmantojamu jaunu vai atjauninātu testēšanas metožu validēšanu un starptautisku akceptēšanu (1). Pilnībā validētās references testēšanas metodes (2. un 3. papildinājums), kas ir šīs *PBTG* pamatā, ir šādas:

— stabili transficētas TA (STTA) tests (2), izmantojot šūnu līniju (h) ERα-HeLa-9903; un

— VM7Luc ER TA tests (3), izmantojot šūnu līniju VM7Luc4E2 ([1]), kur galvenokārt ir ekspresēta līnija hERα un daļēji hERβ(4)(5).

Līdzīgu testu izstrādē, kas vērsti uz to pašu apdraudējumu/iznākumu, ir pieejami un būtu jāizmanto snieguma standarti (PS) (6) (7). Tas dod iespēju savlaicīgi grozīt *PBTG* 455, proti, atjaunināto *PBTG* papildināt ar jauniem līdzīgiem testiem; tomēr līdzīgus testus pievienos tikai pēc izskatīšanas un apstiprināšanas ESAO, ka snieguma standarti ir izpildīti. TG 455 iekļautos testus tam, lai izpildītu ESAO valstu prasības pēc estrogēnu receptora transaktivācijas testa rezultātiem, vienlaikus izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, šos testus var izmantot bez izšķirības.

Testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

2. ESAO 1998. gadā sāka īstenot prioritārus pasākumus ar mērķi pārskatīt esošās un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju skrīningu un testēšanu. ESAO konceptuālais satvars (KS) potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju testēšanai un novērtēšanai 2012. gadā tika pārskatīts. Gan sākotnējais, gan pārskatītais KS ir iekļauts pielikumā ESAO Vadlīniju dokumentam par standartizētām testēšanas metodēm ķimikāliju vērtēšanai attiecībā uz endokrīnajiem disruptoriem (8). KS aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim. Šajā testēšanas metodē aprakstītie ER transaktivācijas (TA) testi atbilst 2. līmenim, kur ietilpst "*in vitro testi, kas sniedz datus par izvēlētiem endokrīniem mehānismiem/ceļiem*". Šī testēšanas metode ir paredzēta *in vitro* transaktivācijas testiem, ar ko identificē estrogēnu receptoru (ER) agonistus un antagonistus.

3. Estrogēnu un ER mijiedarbība var ietekmēt estrogēnu regulētos gēnus, un tā rezultātā var tikt inducēti vai inhibēti šūnu procesi, tostarp tie, kas saistīti ar šūnu vairošanos, normālu augļa attīstību un reproduktīvo funkciju (9)(10)(11). Normālu estrogēnisko sistēmu traucējumi var negatīvi ietekmēt normālu attīstību (ontoģenēzi), reproduktīvo veselību un reproduktīvās sistēmas integritāti.

4. *In vitro* TA testu pamatā ir vielu tieša vai netieša mijiedarbība ar specifisku receptoru, kas regulē reportiergēna produkta transkripciju. Šādi testi ir plaši izmantoti, lai izvērtētu gēnu ekspresiju, ko regulē specifiski nukleārie receptori, piem., ER (12) (13) (14) (15) (16). Ir ierosināts, ka tos varētu izmantot, lai detektētu estrogēnisku transaktivāciju, ko regulē ER (17) (18) (19). Pastāv vismaz divi lieli nukleāro ER apakštipi: α un β, un tos kodē atšķirīgi gēni. Attiecīgajiem proteīniem ir atšķirīgas bioloģiskās funkcijas, kā arī atšķirīgs sadalījums audos un atšķirīga ligandu afinitāte (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Nukleārais ERα mediē klasisko estrogēnisko reakciju (27)(28)(29)(30), tāpēc vairums modeļu, ko pašlaik izstrādā ER aktivācijas vai inhibīcijas mērīšanai, balstās uz ERα. Testus izmanto, lai identificētu ķimikālijas, kas aktivē (vai inhibē) ER ar liganda piesaisti, pēc kuras receptora-liganda komplekss piesaistās

([1]) Līdz 2016. gada jūnijam šo šūnu līniju sauca par BG1Luc šūnu līniju. BG-1 šūnas pirmoreiz aprakstīja Geisinger et al. (1998) (35), un pēc tam tās sīkāk raksturoja Nacionālā Vides veselības zinātņu institūta (NIEHS) pētnieki (36). Salīdzinoši nesen atklāts, ka pētnieki izmanto divus dažādus BG-1 šūnu variantus — BG-1 Fr un BG-1 NIEHS. Li un līdzstrādnieku veiktā padziļinātā analīzē (2014) (37) atklājās, ka BG-1 Fr ir unikāla un ka BG-1 NIEHS, t.i., sākotnējā šūnu līnija, ko izmantoja testa izstrādē, nav vis BG1 cilvēka olnīcu karcinomas šūnu līnija, bet gan MCF7 cilvēka krūts vēža šūnu līnijas variants. Testā izmantoto šūnu līniju, ko sākotnēji sauca par BG1Luc4E2 (38), tagad apzīmēs kā VM7Luc4E2 ("V" = variants; "M7" = MCF7 šūnas). Tāpat testu tagad apzīmēs kā VM7Luc ER TA. Lai gan mainās testa pamatā esošās šūnu līnijas izcelsme, tas neietekmē ne publicētos validācijas pētījumus, ne šā testa izmantošanas lietderību estrogēnisko/antiestrogēnisko ķimikāliju skrīningā.

specifiskiem DNS reakcijas elementiem un transaktivē reportiergēnu, kā rezultātā palielinās marķierproteīna ekspresija šūnās. Testos var izmantot dažādas reportiergēnu reakcijas. Uz luciferāzes balstītās sistēmās luciferāzes enzīms luciferīna substrātu pārveido bioluminiscējošā produktā, ko var kvantitatīvi izmērīt ar luminometru. Citi izplatīti marķieri ir fluorescējošais proteīns un *LacZ* gēns, kas kodē β-galaktozidāzi — enzīmu, kas bezkrāsaino substrātu X-gal (5- brom-4-hlor-indolil-galaktopiranozīdu) pārveido zilā produktā, ko var kvantificēt ar spektrofotometru. Šos marķierus var ātri un lēti izvērtēt ar komerciāli pieejamiem testa komplektiem.

5. STTA un VM7Luc TA testu validācijas pētījumi apliecina, ka šie testi ir ticami un relevanti konkrētajam nolūkam (3)(4)(5)(30). Veiktspējas standarti uz luminiscenci balstītiem ER TA testiem, kuros izmanto krūšu šūnas, ir iekļauti ziņojumā ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Šie veiktspējas standarti ir grozīti tā, lai tos varētu izmantot gan STTA, gan VM7Luc TA testiem (2).

6. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TA testu tvērums un ierobežojumi

7. Šos testus ierosināts izmantot skrīninga un prioritizēšanas vajadzībām, tomēr tie var sniegt arī mehānistisku informāciju, ko var izmantot pierādījumu izsvēršamas pieejā. Tie attiecas uz TA, ko inducē ķīmiska piesaiste ER *in vitro* sistēmā. Tāpēc rezultātus nevajadzētu tieši ekstrapolēt uz neskartas endokrīnās sistēmas kompleksajiem signalizēšanas un regulēšanas mehānismiem *in vivo*.

8. Uzskata, ka ER mediēta TA ir viens no nozīmīgākajiem endokrīnās disrupcijas (ED) mehānismiem, lai gan ED izraisa arī citi mehānismi, t. sk. i) mijiedarbība ar citiem endokrīnās sistēmas receptoriem un enzīmu sistēmām, ii) hormonu sintēze, iii) hormonu metaboliskā aktivācija/inaktivācija, iv) hormonu sadalījums mērķaudos un v) hormonu izvadīšana no organisma. Neviens pie šīs testēšanas metodes apskatītais tests neattiecas uz šiem darbības modiem.

9. Šī testēšanas metode attiecas uz ķimikāliju spēju aktivēt (t. i., darboties kā agonistam) un nomākt (t. i., darboties kā antagonistam) ER regulētu transkripciju. Dažas ķimikālijas — atkarībā no izmantotajām šūnām — var iedarboties gan kā agonisti, gan kā antagonisti, un tās sauc par selektīvajiem estrogēnu receptora modulatoriem (SERM). Ja ķimikālijas šajos testos uzrāda negatīvus rezultātus, tad, pirms izdarīt secinājumu, ka tās receptoram nepiesaistās, tās varētu būt lietderīgi novērtēt ER piesaistīšanas testos. Turklāt šie testi sniedz tikai informāciju par vecākmolekulas aktivitāti, ņemot vērā *in vitro* šūnu sistēmu ierobežotās metabolizēšanas spējas. Tā kā validācijas pētījumā tika izmantotas tikai atsevišķas vielas, nav informācijas par testa izmantojamību ar maisījumiem. Tomēr šī testēšanas metode teorētiski ir piemērojama daudzkomponentu vielu, UVCB un maisījumu testēšanai. Pirms datu iegūšanai normatīvām vajadzībām šo testēšanas metodi izmanto attiecībā uz daudzkomponentu vielu, UVCB vai maisījumu, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.

10. Informatīvā nolūkā 1. tabulā ir sniegti agonista testa rezultāti 34 vielām, kas testētas ar abām pilnībā validētajām references testēšanas metodēm, kuras aprakstītas šajā testēšanas metodē. No šīm vielām 26 nešaubīgi klasificētas kā ER agonisti, un, kā iziet no publicētajiem pārskatiem, 8 vielas uzrādīja negatīvus rezultātus, t. sk. *in vitro* ER piesaistes un TA testos un/vai uterotrofiskajā testā (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). 2. tabulā ir sniegti antagonista testa rezultāti 15 vielām, kas testētas ar abām pilnībā validētajām references testēšanas metodēm, kuras aprakstītas šajā testēšanas metodē. No šīm vielām 4 nešaubīgi/potenciāli klasificētas kā ER antagonisti, un, kā iziet no publicētajiem pārskatiem, 10 vielas uzrādīja negatīvus rezultātus, t. sk. *in vitro* ER piesaistes un TA testos (2)(3)(18)(31). Runājot par 1. un 2. tabulā apkopotajiem datiem, abas references testēšanas metodes ļauj izdarīt 100 % vienādus secinājumus par visu vielu klasifikāciju (izņemot vienu vielu — mifepristonu — antagonista testā), un katra viela ir pareizi klasificēta kā ER agonists/antagonists vai negatīvs rezultāts. Papildu informācija par šo ķimikāliju grupu un par vēl citām ķimikālijām, kas validācijas pētījumu gaitā testētas STTA VM7Luc ER TA testos, ir sniegta ERTA veiktspējas standartu (6)(7), 2. papildinājumā (1., 2. un 3. tabula).

1. tabula

Pārskats par STTA un VM7Luc ER TA testu rezultātiem attiecībā uz vielām, kas testētas abos agonista testos un klasificētas kā ES agonisti (POS) vai kā negatīvi rezultāti (NEG)

	Viela	CAS Nr.	STTA tests (2)			VM7Luc ER TA tests (3)		Klasifikācijas datu avots (5)		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība (b), (4) (M)	Citi ER TA testi (1)	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
1	17ß-estradiols (a)	50-28-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiols (a)	57-91-0	POZ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestradiols (a)	57-63-6	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolons	10161-33-8	POZ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POZ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterons (a)	434-22-0	POZ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenols (a)	599-64-4	POZ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NT
7	4-*terc*-oktilfenols (a)	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POZ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenīns (a)	520-36-5	POZ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NT

	Viela	CAS Nr.	STTA tests (2)			VM7Luc ER TA tests (3)		Klasifikācijas datu avots (5)		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība (b), (4) (M)	Citi ER TA testi (1)	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
9	Atrazīns (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenols A (a)	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POZ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenols B (a)	77-40-7	POZ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzilftalāts (a)	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosterons (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrols (a)	479-13-0	POZ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POZ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NT
15	Daidzeīns (a)	486-66-8	POZ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POZ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrols (a)	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POZ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NT
17	Di-n-butilftalāts	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etilparabēns	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	PC_{50} nav	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NT
19	Estrons (a)	53-16-7	POZ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POZ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genisteīns (a)	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POZ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ

	Viela	CAS Nr.	STTA tests (2)			VM7Luc ER TA tests (3)		Klasifikācijas datu avots (5)		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība (b), (4) (M)	Citi ER TA testi (1)	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
21	Haloperidols	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kampferols (a)	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NT
23	Kepons (a)	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NT
24	Ketokonazols	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linurons (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*mezo*-heksestrols (a)	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POZ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NT
27	Metiltestosterons (a)	58-18-4	POZ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NT
28	Morīns	480-16-0	POZ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NT
29	Noretinodrels (a)	68-23-5	POZ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POZ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NT
30	*p,p'*-metoksihlors (a)	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(PC_{50} nav) (b)	POZ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbitāls (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT

	Viela	*CAS* Nr.	STTA tests (2)			VM7Luc ER TA tests (3)		Klasifikācijas datu avots (5)		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība (b), (4) (M)	Citi ER TA testi (1)	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
32	Rezerpīns	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolaktons (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosterons	58-22-0	POZ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NT

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC_{50} = testējamās vielas 50 % efektīvā koncentrācija; NEG = negatīvs; POZ = pozitīvs; NT = nav testēts; PC_{10} (un PC_{50}) = testējamās vielas koncentrācija, pie kuras aktivitāte ir 10 % (vai 50 % PC_{50} gadījumā) no aktivitātes, ko izraisa pozitīvs rezultāts (E2, 1nM) katrā platē.

(a) Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER agonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tabula 4-1 (3)).

(b) Maksimālā koncentrācija, kas testēta bez ierobežojumiem citotoksicitātes vai nešķīdības dēļ, bija 1×10^{-5} M (STTA) un 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA).

(1) Skaitļi iekavās norāda pozitīvo (POZ) vai negatīvo (NEG) rezultātu skaitu attiecībā pret kopējo references pētījumu skaitu.

(2) Vērtības, par kurām ziņots dokumentā "Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)".

(3) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

(4) Vidējās EC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratroijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

(5) Vielas klasificētas ER agonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Piezīmes. Pie šīs testēšanas metodes aprakstītajos testos netiek izmantoti tie paši mērījumi. Dažos gadījumos EC_{50} nav iespējams aprēķināt, jo nav ģenerēta pilna devas-efekta līkne. Lai gan STTA testā galvenais mērījums ir PC_{10} vērtība, ir iespējami vēl citi gadījumi, kur derīgu informāciju sniedz PCx vērtība.

2. tabula

Salīdzinājums par STTA un VM7Luc ER TA testu rezultātiem attiecībā uz vielām, kas testētas abos antagonista testos un klasificētas kā ES antagonisti (POS) vai kā negatīvi rezultāti (NEG)

	Viela [a]	CAS Nr.	ER STTA tests [1]		VM7Luc ER TA tests [2]		ER STTA sagaidāmie rezultāti [4]	ICCVAM [5] saskaņotā klasifikācija	MeSH [6] ķimikāliju klase	Produktu klase [7]
			ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība [b] (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība [b], [3] (M)				
1	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
2	Dibenz[a,h]antracēns	53-70-3	POZ	Nav IC_{50}:	POZ	Nav IC_{50}:	POZ	PP	Policiklisks savienojums	Laboratoriju ķimikālija, dabisks produkts
3	Mifepristons	84371-65-3	POZ	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	vāji POZ	NEG	Steroīds	Farmaceitisks līdzeklis
4	Raloksifēns HCl	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
5	Tamoksifēns	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
6	17β-estradiols	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
7	Apigenīns	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklisks savienojums	Krāsviela, dabisks produkts, farmaceitisks starpprodukts

	Viela ([a])	CAS Nr.	ER STTA tests ([1])		VM7Luc ER TA tests ([2])		ER STTA sagaidāmie rezultāti ([4])	ICCVAM ([5]) saskaņotā klasifikācija	MeSH ([6]) ķimikāliju klase	Produktu klase ([7])
			ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība ([b]) (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība ([b]), ([3]) (M)				
8	Atrazīns	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterociklisks savienojums	Herbicīds
9	Di-n-butilftalāts	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Esteris, ftalskābe	Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļa, rūpnieciska ķimikālija, plastifikators
10	Fenarimols	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nav testēts;	PN	Heterociklisks savienojums, pirimidīns	Fungicīds
11	Flavons	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
12	Flutamīds	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
13	Genisteīns	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
14	p-n-nonilfenols	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nav testēts	NEG	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts

	Viela ([a])	CAS Nr.	ER STTA tests ([1])		VM7Luc ER TA tests ([2])		ER STTA sagaidāmie rezultāti ([4])	ICCVAM ([5]) saskaņotā klasifikācija	MeSH ([6]) ķimikāliju klase	Produktu klase ([7])
			ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība ([b]) (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratrols	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Dabisks produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC_{50} = testējamās vielas 50 % maksimālā inhibējošā koncentrācija; NEG = negatīvs; PN = pieņem, ka negatīvs; POZ = pozitīvs; PP = pieņem, ka pozitīvs.

([a]) Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER antagonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (2) (3).

([b]) Maksimālā koncentrācija, kas testēta bez ierobežojumiem citotoksicitātes vai nešķīdības dēļ, bija 1×10^{-3} M (STTA) un 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Vidējās IC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

([4]) ER STTA gaidāmā aktivitāte, pamatojoties uz to zināmo ietekmi, kas secināma no CERI vēsturiskajiem datiem par ER receptoru testu un uterotrofisko testu un no informācijas, kas apkopota brīvpieejamā literatūrā (2)

([5]) Vielas klasificētas ER antagonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31).

([6]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

ER TA TESTA KOMPONENTI

Nepieciešamie testa komponenti

11. Šo testēšanas metodi piemēro testiem, kuros izmanto stabili transficētu vai endogēnisku ERα receptoru un stabili transficētu reportiergēnu konstruktu viena vai vairāku estrogēniskas reakcijas elementu kontrolē; tomēr klātesoši var būt arī citi receptori, piemēram, ERβ. Tie ir nepieciešamie testa komponenti.

Kontroles

12. Apraksta ierosinātos paralēlos references standartus katram agonista un antagonista testam. Paralēlās kontroles (negatīvs, šķīdinātājs, pozitīvs) vajadzības gadījumā kalpo kā indikators, ka tests funkcionē pie testēšanas nosacījumiem, un ļauj savstarpēji salīdzināt eksperimentus; parasti tie ir daļa no konkrētā eksperimenta pieņemamības kritērijiem (1).

Standarta kvalitātes kontroles procedūras

13. Katram testam veic aprakstītās standarta kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu, ka šūnu līnija vairāku pasāžu gaitā saglabājas stabila, nesatur mikoplazmu (t.i., nav kontaminēta ar baktērijām) un saglabā spēju laika gaitā nodrošināt gaidītās ER mediētās reakcijas. Jāpārbauda arī, vai šūnu līnijas identitāte ir pareiza un vai nav citu kontaminantu (piem., sēnīšu, raugu un vīrusu).

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

14. Pirms nezināmu ķimikāliju testēšanas ar kādu no šajā testa metodē aprakstītajiem testiem katrai laboratorijai ir jāpierāda sava kompetence testa izmantošanā. Kompetences pierādīšanas labad katra laboratorija testē 14 standartvielas, ko izmanto agonistu testēšanā un kas norādītas 3 tabulā, un 10 standartvielas, ko izmanto antagonistu testēšanā un kas norādītas 4. tabulā. Kompetences pierādīšana arī ļauj pārliecināties par testa sistēmas reaģētspēju. Standartvielu testēšanas saraksts ir daļa no references vielām, kas norādītas ER TA testu veiktspējas standartos (6). Šīs vielas ir komerciāli pieejamas, tās ir reprezentatīvas tādu ķimikāliju klasēm, ko parasti saista ar ER agonistu vai antagonistu aktivitāti, tām ir pienācīgs potences diapazons, kas sagaidāms no ER agonistiem/antagonistiem (t.i., no spēcīga līdz vājam) un tās ietver negatīvas vielas. Standartvielas testē vismaz divas reizes dažādās dienās. Kompetence ir pierādīta, ja katra standartviela tiek pareizi klasificēta (pozitīva/negatīva reakcija). Kompetences testēšanu atkārto katrs laborants, kas apgūst testēšanas metodi. Atkarībā no šūnu tipa dažas standartvielas var izpausties kā SERM, proti, gan kā agonisti, gan kā antagonisti. Tomēr standartvielas 3. un 4. tabulā ir klasificētas pēc to zināmās dominējošās aktivitātes, un tieši pēc tās vadās kompetences izvērtēšanā.

15. Kompetences pierādīšanas un kvalitātes kontroles vajadzīgām katra laboratorija izveido agonistu un antagonistu vēsturisko datubāzi ar šādiem datiem: references standartvielas (piem., 17β-estradiols un tamoksifēns), pozitīvās un negatīvās kontrolķimikālijas un šķīdinātāja kontrole (piem., DMSO). Sākumā datubāzi ģenerē no vismaz 10 neatkarīgām testa izpildes reizēm ar agonistiem (piem., 17β-estradiolu) un 10 neatkarīgām testa izpildes reizēm ar antagonistiem (piem., tamoksifēnu). Lai datubāzi paplašinātu un tādējādi nodrošinātu laboratorijas konsekventu sniegumu un kompetenci biotestu veikšanā, datubāzi papildina ar vēlāku references standartvielu un šķīdinātāja kontroļu analīžu rezultātiem.

3. tabula

Saraksts ar (14) standartvielām, ko izmanto agonistu testā (1)

Nr. (7)	Viela	*CAS* Nr.	Sagaidāmā reakcija (2)	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķimikāliju klase (6)	Produktu klase (7)
				PC_{10} vērtība (M) (3)	PC_{50} vērtība (M) (3)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC_{50} vērtība (M) (4)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) (5)		
14	Dietilstilbestrols	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis, veterinārfarmaceitisks līdzeklis
12	17α-estradiols	57-91-0	POZ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
15	*mezo*-heksestrols	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
11	4-*terc*-oktilfenols	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts
9	Genisteīns	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
6	Bisfenols A	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts

Nr. (7)	Viela	*CAS* Nr.	Sagaidāmā reakcija (2)	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķimikāliju klase (6)	Produktu klase (7)
				PC_{10} vērtība (M) (3)	PC_{50} vērtība (M) (3)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC_{50} vērtība (M) (4)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) (5)		
2	Kampferols	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts
3	Butilbenzilftalāts	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karbonskābe, esteris, ftalskābe	Plastifikators, rūpnieciska ķimikālija
4	*p,p'*- metoksihlors	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Ogļūdeņradis (halogenēts)	Pesticīds, veterinārfarmaceitisks līdzeklis
1	Etilparabēns	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karbonskābe, fenols	Farmaceitisks līdzeklis
17	Atrazīns	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterociklisks savienojums	Herbicīds
20	Spironolaktons	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktons, steroīds	Farmaceitisks līdzeklis

Nr. (7)	Viela	*CAS* Nr.	Sagaidāmā reakcija (2)	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķimikāliju klase (6)	Produktu klase (7)
				PC_{10} vērtība (M) (3)	PC_{50} vērtība (M) (3)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC_{50} vērtība (M) (4)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) (5)		
21	Ketokonazols	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterociklisks savienojums	Farmaceitisks līdzeklis
22	Rezerpīns	50-55-5	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterociklisks savienojums, indols	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs EC_{50} = testējamās vielas 50 % efektīvā koncentrācija; NEG = negatīvs; POZ = pozitīvs; PC_{10} (un PC_{50}) = testējamās vielas koncentrācija, pie kuras aktivitāte ir 10 % (vai 50 % PC_{50} gadījumā) no aktivitātes, ko izraisa pozitīvs rezultāts (E2, 1nM) katrā platē.

(1) Vielas klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas ER agonista aspektā, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays" (31), empīriskiem datiem un informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Vērtības, par kurām ziņots dokumentā "Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30)".

(3) Vidējās EC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

(4) Norādītās koncentrācijas atbilst augstākajām testētajām koncentrācijām (diapazona noteikšanas tests) VM7Luc ER TA testa validēšanas gaitā. Ja dažādās laboratorijās koncentrācijas atšķīrās, norādīta augstākā koncentrācija. Sk. tabulu 4-10 dokumentā "ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

(5) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

(7) Saskaņā ar veiktspējas standartu (List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy) 1. tabulu (6).

(7) Ja standartviela vairs nav komerciāli pieejama, var izmanot vielu, kurai ir tāda pati klasifikācija un salīdzināma potence, darbības mods un ķīmiskā klase.

4. tabula

Saraksts ar (10) standartvielām, ko izmanto antagonistu testā

	Viela [a]	CAS Nr.	ER STTA tests [1]			VM7Luc ER TA tests [2]			ER STTA [1] sagaidāmie rezultāti	ICCVAM [5] saskaņotā klasifikācija	MeSH [6] ķimikāliju klase	Produktu klase [7]
			ER TA aktivitāte	IC_{50} (M)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} [3] (M)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) [4]				
1	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12} – 10^{-7}	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
2	Raloksifēns HCl	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12} – 10^{-7}	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
3	Tamoksifēns	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10} – 10^{-5}	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
4	17β-estradiols	50-28-2	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	potenciāli negatīvs (*)	PN	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
5	Apigenīns	520-36-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklisks savienojums	Krāsviela, dabisks produkts, farmaceitisks starpprodukts
6	Di-n-butilftalāts	84-74-2	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Esteris, ftalskābe	Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļa, rūpnieciska ķimikālija, plastifikators

	Viela ([a])	CAS Nr.	ER STTA tests ([1])			VM7Luc ER TA tests ([2])			ER STTA ([1]) sagaidāmie rezultāti	ICCVAM ([5]) saskaņotā klasifikācija	MeSH ([6]) ķimikāliju klase	Produktu klase ([7])
			ER TA aktivitāte	IC_{50} (M)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} ([3]) (M)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) ([4])				
7	Flavons	525-82-6	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs (*)	PN	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
8	Genisteīns	446-72-0	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs (*)	NEG	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
9	p-n-nonilfenols	104-40-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nav testēts	NEG	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts
10	Resveratrols	501-36-0	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs (*)	NEG	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Dabisks produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC_{50} = testējamās vielas 50 % maksimālā inhibējošā koncentrācija; NEG = negatīvs; PN = pieņem, ka negatīvs; POZ = pozitīvs.

(*) klasificēts kā negatīvs saskaņā ar literatūras apskatu (2).

([a]) Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER antagonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (2) (3).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Vidējās IC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

([4]) Norādītās koncentrācijas atbilst augstākajām testētajām koncentrācijām (diapazona noteikšanas tests) VM7Luc ER TA testa validēšanas gaitā. Ja dažādās laboratorijās koncentrācijas atšķīrās, norādīta augstākā koncentrācija. Sk. tabulu 4-11 dokumentā "ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

([5]) Vielas klasificētas ER antagonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and test methods" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31).

([6]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Testa pieņemamības kritēriji

16. Testa pieņemšana vai noraidīšana ir atkarīga no rezultātiem, kas iegūti ar katrā eksperimentā izmantotajiem references standartiem un kontrolēm. References standartvielu vērtībām PC_{50} (EC_{50}) vai IC_{50} būtu jāatbilst pieņemamības kritērijiem, kas paredzēti izvēlētajam testam (par STTA sk. 2. papildinājumu, par VM7Luc ER TA sk. 3. papildinājumu), un visas pozitīvās/negatīvās kontroles būtu pareizi jāklasificē attiecībā uz katru eksperimentu, kas atzīts par pieņemamu. Laboratorija savu spēju pastāvīgi veikt testu pierāda, izveidojot un uzturot datubāzi, kurā apkopoti references standartvielu un kontroļu vēsturiskie rezultāti (sk. 15. punktu). Kā pasākumu, ar ko nodrošina reproducējamību laboratorijas robežās, var izmantot references standartu līknes piemeklēšanas parametru vidējo vērtību standartnovirzes (SN) vai variācijas koeficientus (VK), kas iegūti daudzos eksperimentos. Bez tam attiecībā uz pieņemamības kritērijiem ir jāievēro šādi principi.

— Datiem jābūt pietiekamiem, lai varētu kvantitatīvi novērtēt ER aktivāciju (agonistu testā) vai inhibīciju (antagonistu testā) (t.i., efektivitāti un potenci).

— Lai garantētu adekvātu jutību, marķiera vidējai aktivitātei pie references estrogēna references koncentrācijas jābūt vismaz testēšanas metodes paredzētajai minimālajai aktivitātei attiecībā pret nesēja (šķīdinātāja) kontroles marķiera vidējo vērtību. Testos STTA un VM7Luc ER TA šī minimālā vērtība ir četras reizes lielāka par nesēja kontroles vidējo vērtību katrā platē.

— Testētajām koncentrācijām jāsaglabājas testa ķimikāliju šķīdības diapazonā un tās nedrīkst būt citotoksiskas.

Datu analīze

17. Lai noteiktu, vai reakcija ir pozitīva vai negatīva, izmanto katram testam definēto datu interpretēšanas procedūru.

18. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji (16. punkts), tas nozīmē, ka tests darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu replicēšana. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti reproducējami rezultāti (piem., rezultāti abās izpildes reizēs liecina, ka testa ķimikālija ir pozitīva), nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi.

19. Ja divās izpildes reizēs netiek netiek iegūti reproducējami rezultāti (piem., testa ķimikālija ir pozitīva vienā izpildes reizē, bet negatīva otrā) vai ka ir nepieciešama lielāka pārliecība par šā testa iznākumu, vajadzīgas vismaz trīs neatkarīgas izpildes reizes. Tādā gadījumā klasifikācijas pamatā ir divi sakritīgie rezultāti no trim.

Vispārīgie datu interpretācijas kritēriji

20. Pašlaik nav vispārpieņemtas metodes, kā interpretēt ER TA datus. Tomēr gan kvalitatīvajos (piem., pozitīvs/negatīvs), gan kvantitatīvajos (piem., EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) ER mediētās aktivitātes novērtējumos ir jābalstās uz empīriskiem datiem un pamatotiem zinātniskiem spriedumiem. Ja iespējams, pozitīvie rezultāti jāraksturo gan ar ietekmes intensitāti salīdzinājumā ar nesēja (šķīdinātāja) kontroli vai references estrogēnu, gan ar koncentrāciju, pie kuras novērojama ietekme (piem., EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} u.c.).

Testēšanas pārskats

21. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Tests:

— izmantotais tests,

— kontrole/ references standarts/ testējamā ķimikālija,

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja tā zināma,

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota.

Vienkomponenta viela.

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs/nesējs:

— raksturojums (iedaba, piegādātājs un sērija),

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma.

Šūnas:

— šūnu tips un avots:

  • Vai ER ir endogēniski ekspresēts? Ja nē, tad kuri receptori tikuši transficēti?

  • Izmantotie reportiergēnu konstrukti (t.sk. avotsugas);

  • Transfekcijas metode;

  • Atlases metode, ko izmanto stabilas transfekcijas uzturēšanai (attiecīgā gadījumā);

  • Vai transfekcijas metode ļauj iegūt stabilas līnijas?

— šūnu pasāžu skaits (pēc atkausēšanas);

— šūnu pasāžu skaits (atkausēšanas brīdī);

— šūnu kultūru audzēšanas metodes.

Testēšanas nosacījumi:

— šķīdības ierobežojumi;

— apraksts par izmantotajām dzīvotspējas novērtēšanas metodēm;

— Barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija;

— testējamās ķimikālijas koncentrācija;

— pievienotā nesēja un testējamās ķimikālijas tilpums;

— inkubācijas temperatūra un mitrums;

— apstrādes ilgums;

— šūnu blīvums apstrādes sākumā un gaitā;

— pozitīvie un negatīvie references standarti;

— marķierreaģenti (produkta nosaukums, piegādātājs, sērija);

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Pieņemamības pārbaude

— indukcija kārtās katrā testa platē un tas, vai tiek izpildīts testā vajadzīgais minimums, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem par kontrolēm;

— pieņemamības kritēriju faktiskās vērtības, piem., $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ un Hilla virziena koeficienta vērtības attiecībā uz testā paralēli iekļautajām pozitīvajām kontrolēm/references standartiem.

Rezultāti:

— jēldati un normalizēti dati;

— maksimālais vairākkāršās indukcijas līmenis;

— dati par citotoksicitāti;

— zemākā iedarbīgā koncentrācija (LEC), ja tāda ir;

— attiecīgā gadījumā — RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} un/vai EC_{50} vērtības;

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,

— statistiskās analīzes (ja tādas ir), kā arī kļūdas un ticamības mērs (piem., SEM, SN, VK vai 95 % CI) un apraksts par to, kā šīs vērtības iegūtas.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

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

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERSTARTSYMBOLFONT003FENDSYMBOLFONTSTARTSYMBOLFONT003FENDSYMBOLFONT*In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN SAĪSINĀJUMI

Pieņemamības kritēriji: minimālie standarti, kas attiecas uz eksperimenta kontrolēm un references standartiem. Lai eksperimentu uzskatītu par derīgu, visiem pieņemamības kritērijiem jābūt izpildītiem.

Pareizība (konkordantums): pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (1).

Agonists: viela, kas piesaistē konkrētam receptoram rada reakciju, piemēram, transkripciju.

Antagonists: tāda veida receptora ligands vai ķimikālija, kas piesaistē receptoram pats(-i) par sevi neizraisa bioloģisku reakciju, bet gan bloķē vai mīkstina agonista mediētas reakcijas.

Antiestrogēniska aktivitāte: ķimikālijas spēja nomākt 17β-estradiola aktivitāti, ko mediē estrogēnu receptori.

Šūnu morfoloģija: tādu šūnu forma un izskats, kas monoslānī audzētas audu kultūras plates vienā iedobē. Mirstošām šūnām bieži novērojama anormāla šūnu morfoloģija.

KS: ESAO konceptuālais satvars (KS) endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju testēšanai un novērtēšanai.

Apstrāde ar ogli/dekstrānu: šūnu kultūrā izmantota seruma apstrāde. Apstrāde ar ogli/dekstrānu (bieži vien to sauc arī par "stripingu") likvidē endogēniskos hormonus un hormonus piesaistošus proteīnus.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Citotoksicitāte: kaitīga ietekme uz šūnas struktūru vai funkcionalitāti, kas galu galā var novest pie šūnas nāves; to var atspoguļot šūnu skaita samazinājums iedobē ekspozīcijas perioda beigās vai šūnu funkcijas kapacitātes samazinājums salīdzinājumā ar paralēlo nesēja kontroli.

VK: variācijas koeficients.

DCC-FBS: liellopu embriju serums, kas apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli.

DMEM: Dulbeko modificētā Īgla barotne.

DMSO: dimetilsulfoksīds.

E2: 17β-estradiols.

EC50: testējamās ķimikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

ED: endokrīnās sistēmas darbības traucējumi.

hERα: cilvēka estrogēnu receptors alfa

hERß: cilvēka estrogēnu receptors beta

EFM: bezestrogēna barotne. Dulbeko modificētā Īgla barotne (DMEM), kas papildināta ar 4,5 % DCC-FBS, 1,9 % L-glutamīnu un 0,9 % penicilīna un streptomicīna maisījumu.

ER: estrogēna receptors

ERE: estrogēna atbildreakcijas elements

Estrogēniska aktivitāte: ķimikālijas spēja imitēt 17β-estradiolu, proti, piesaistīties estrogēnu receptoriem un aktivēt tos. Ar šo testēšanas metodi var konstatēt hERα mediētu estrogēnisku aktivitāti.

ERTA: estrogēna receptora transaktivācija

FBS: liellopu embriju serums

HeLa: nemirstīga cilvēka dzemdes kakla šūnu līnija

HeLa9903: HeLa šūnu apakšklons, kurā stabili transficēts hERαα un luciferāzes reportiergēns

IC_{50}: testējamās inhibējošās ķimikālijas 50 % iedarbīgā koncentrācija.

ICCVAM: Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpaģentūru komiteja.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par interlaboratoriju reproducējamību) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (1).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par intralaboratoriju reproducējamību (1).

LEC: zemākā iedarbīgā koncentrācija, t.i., zemākā koncentrācija, kurā testējamā ķīmikālija izraisa reakciju (t.i., testa ķimikālijas zemākā koncentrācija, pie kuras indukcija kārtās ir statistiski atšķirīga no paralēlās nesēja kontroles).

Atdarinājuma tests: sadzīvisks apzīmējums testam, kas ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgs validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Brīvi aizstājama ar līdzīgu testēšanas metodi.

MT: metalotionīns

MMTV: peļu piena dziedzeru audzēja vīruss

OHT: 4-hidroksitamoksifēns

PBTG: veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnijas

(**PC**) Pozitīvā kontrole:: ļoti aktīva viela — vēlams, 17ß-estradiols —, ko iekļauj visos testos un kas palīdz garantēt testa pienācīgu funkcionēšanu.

PC_{10}: testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras izmērītā aktivitāte agonista testā ir 10 % no maksimālās aktivitātes, ko inducē PC (testā STTA — E2 pie 1nM) katrā iedobē.

PC_{50}: testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras izmērītā aktivitāte agonista testā ir 50 % no maksimālās aktivitātes, ko inducē PC (E2 pie testēšanas metodē norādītās references koncentrācijas) katrā iedobē.

PC_{Max}: testējamās ķimikālijas koncentrēšana, kas inducē RPCMax

Veiktspējas standarti: uz validēta testa bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testu salīdzināmību. Tie ietver 1) nepieciešamos testa komponentus; 2) minimālo tādu references ķimikāliju sarakstu, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī 3) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testu, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (1).

Standartvielas: veiktspējas standartos iekļauto references vielu apakškopa, ko laboratorijas var izmantot, lai pierādītu savu tehnisko kompetenci ar standartizētu testēšanas metodi. Šādu vielu atlases kritēriji parasti ir, piemēram šādi: viela ir reprezentatīva dažādām reakcijām, ir komerciāli pieejama un un par to pie pieejami ļoti kvalitatīvi references dati.

Kompetence: vēl pirms nezināmu vielu testēšanas pierādīta spēja testu pienācīgi veikt.

References estrogēns (pozitīvā kontrole, PC): 17β-estradiols (E2, CAS 50-28-2).

References standarts: references viela, ko izmanto, lai pierādītu testa piemērotību. Testos STTA un VM7Luc ER TA references standarts ir 17β-estradiols.

References testēšanas metodes: testi, uz kuriem balstās *PBTG* 455.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (1).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc vienu un tā paša protokola var ilgstoši reproducējami veikt konkrētu testu. To novērtē, aprēķinot reproducējamību vienā laboratorijā un vairākās laboratorijās.

RLU: relatīvās gaismas vienības

RNS: ribonukleīnskābe

RPC_{Max}: testējamās ķimikālijas inducētās atbildreakcijas maksimālais līmenis, ko izsaka kā procentus no 1nM, E2 inducētās atbildreakcijas tajā pašā platē.

RPMI: RPMI 1 640 barotne, kas papildināta ar 0,9 % penicilīna un streptomicīna maisījumu un 8,0 % liellopu embriju serumu (FBS).

Izpildes reize: atsevišķs eksperiments, kurā izvērtē ķīmisko iedarbību uz testa bioloģisko iznākumu. Katra izpildes reize ir pilns eksperiments, ko izdara replikāta iedobēs vienlaikus un ar šūnām no tā paša šūnu krājuma.

Neatkarīga izpildes reize: atsevišķs, neatkarīgs eksperiments, kurā izvērtē ķīmisko iedarbību uz testa bioloģisko iznākumu; izmanto šūnas no dažādiem krājumiem, svaigi atšķaidītas ķimikālijas un testu izdara vai nu dažādās dienās, vai tajā pašā dienā dažādi laboranti.

SN: standartnovirze

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām vielām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (1).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām vielām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (1).

Stabila transfekcija: norise, kuras laikā DNS tiek transficēta kultivētajās šūnās tādā veidā, ka tiek stabili integrēta šūnas genomā, kā rezultātā ir iespējama transficēto gēnu stabila ekspresija. Stabili transficētu šūnu klonus atlasa ar stabiliem marķieriem (piem., pretestība G418).

Tests STTA: stabili transficētas transaktivācijas tests, ERα transkripcionālās aktivācijas tests, izmantojot šūnu līniju HeLa 9 903.

Pētījums: visi eksperimentālā darba posmi, kas izpildīti, lai specifiskā testā izvērtētu vienu atsevišķu, specifisku vielu. Pētījumā ietilpst visi eksperimenta posmi, tostarp testējamās vielas atšķaidīšana testa barotnē, provizoriskie diapazona noteikšanas testi, visi nepieciešamie visaptverošie testi, datu analīze, kvalitātes nodrošināšana, citotoksicitātes novērtēšana utt. Pētījuma pabeigšana ļauj klasificēt, kā testējamā ķimikālija iespaido testā novērtēto toksiskumu (t.i., aktīva, neaktīva, neviennozīmīga), un raksturot atbildreakciju attiecībā pret pozitīvo references ķimikāliju.

Viela: *REACH* regulā ([1]) viela definēta kā ķīmisks elements un tā dabiski vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, tostarp tās stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušies piejaukumi, kas nav šķīdinātāji, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu. Ļoti līdzīga definīcija tiek izmantota ANO *GHS* (1).

TA (transaktivācija):: mRNS sintēzes iniciēšana kā atbildreakcija uz specifisku ķīmisko signālu, piemēram, estrogēna piesaisti estrogēna receptoram.

Tests: šīs testēšanas metodes kontekstā tests ir viena no metodikām, kas atzīta par derīgu, proti, kas izpilda norādītos veiktspējas kritērijus. Testa komponenti ir, piemēram, specifiska šūnu līnija un attiecīgie augšanas apstākļi, specifiska barotne, kurā veic testu, plašu sagatavošanas nosacījumi, testējamo ķimikāliju sagatavošana un atšķaidīšana, kā arī visi citi vajadzīgie kvalitātes kontroles pasākumi un saistītie datu izvērtēšanas posmi.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Transkripcija: mRNS sintēze

UVCB: ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti un bioloģiski materiāli.

Validēta testēšanas metode: tests, kura relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (1).

Validācija: Process, kurā nosaka, kādā mērā konkrēta pieeja, metode, tests, process vai novērtējums ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

VC (nesēja kontrole): šķīdinātāju, kurā izšķīdina testējamās un kontroles ķimikālijas, testē tikai kā nesēju bez izšķīdinātas ķimikālijas.

VM7: nemirstīga adenokarcinomas šūna, kas endogēniski ekspresē estrogēnu receptorus.

VM7Luc4E2: Šūnu līnija VM7Luc4E2 atvasināta no VM7 nemirstīgām cilvēka adenokarcinomas šūnām, kas spēj endogēniski ekspresēt abas estrogēnu receptoru formas (ERα and ERβ) un ir stabili transficētas ar plazmīdu pGudLuc7.ERE. Plazmīds satur četras kopijas no sintezēta oligonukleotīda, kas satur estrogēna atbildreakcijas elementu virs MMTV promotera un jāņtārpiņa luciferāzes gēnu.

Vāji pozitīvā kontrole: vāji aktīva viela, kas izvēlēta no references ķimikāliju saraksta; to iekļauj visos testos un tā palīdz garantēt testa pienācīgu funkcionēšanu.

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*) un ar kuru izveido Eiropas Ķimikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK (OV L 304, 22.11.2007., 1. lpp.).

2. papildinājums

STABILI TRANSFICĒTAS CILVĒKA ESTROGĒNU RECEPTORU A TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS, KURĀ NOSAKA ĶIMIKĀLIJU AGONISTU UN ANTAGONISTU ESTROGĒNISKO AKTIVITĀTI, IZMANTOJOT ŠŪNU LĪNIJU HERA-HELA-9903

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šajā transaktivācijas (TA) testā šūnu līniju hERα-HeLa-9 903 izmanto, lai noteiktu estrogēnisku agonista aktivitāti, ko mediē cilvēku estrogēnu receptors alfa (hERα). Japānas Ķimikāliju izvērtēšanas un izpētes institūta (*CERI*) veiktajā stabili transficētas transaktivācijas (STTA) validācijas pētījumā, kurā šūnu līniju ERα-HeLa-9 903 izmantoja, lai noteiktu estrogēnisku agonista un antagonista aktivitāti, ko mediē cilvēku estrogēnu receptors alfa (hERα), pierādījās, ka tests ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

2. Šis tests ir īpaši paredzēts hERα-mediētas TA noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot hemiluminiscenci. Tomēr pie tādām fitoestrogēnu koncentrācijām, kas pārsniedz 1 μM, ir novēroti receptoru nemediēti luminiscences signāli, ko izraisa luciferāzes reportiergēna pārmērīga aktivācija. Lai gan devas-efekta līkne liecina, ka patiesa ER sistēmas aktivācija notiek pie zemākām koncentrācijām, ir lietderīgi rūpīgi izpētīt tādu luciferāzes ekspresiju stabili transficētās ER TA testu sistēmās (1. papildinājums), ko iegūst pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai tādu savienojumu koncentrācijām, par kuriem ir aizdomas, ka tie līdzīgi kā fitoestrogēni izraisa luciferāzes reportiergēna pārmērīgu aktivāciju.

3. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļas "**VISPĀRĪGAIS IEVADS**" un "**ER TA testa KOMPONENTI**". Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 2.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

4. Testu izmanto, lai signalizētu, ka estrogēnu receptors ir piesaistījies ligandam. Pēc liganda piesaistes receptora-liganda komplekss translocējas uz kodolu, kur tas piesaistās specifiskiem DNS reakcijas elementiem un transaktivē jāņtārpiņa luciferāzes reportiergēnu, kā rezultātā palielinās luciferāzes fermenta ekspresija šūnās. Luciferīns ir substrāts, kuru luciferāzes enzīms pārveido bioluminiscējošā produktā, ko var kvantitatīvi izmērīt ar luminometru. Luciferāzes aktivitāti var ātri un lēti izvērtēt ar vairākiem komerciāli pieejamiem testa komplektiem.

5. Testa sistēmā izmanto šūnu līniju hERα-HeLa-9 903, kas iegūta no cilvēka dzemdes kakla audzēja un kam ir divi stabili insertēti konstrukti: i) hERαα ekspersijas konstrukts (kura cilvēka receptors iekodēts pilnībā) un ii) jāņtārpiņa luciferāzes reportiergēna konstrukts, kam ir pieci vitelogenīna estrogēna atbildreakcijas elementa (ERE) tandēmie atkārtojumi, ko regulē peļu metalotionīna (MT) promoters ar TATA elementu. Peļu MT TATA gēna konstrukts līdz šim izrādījies visrezultatīvākais, tāpēc tieši to parasti izmanto. Tāpēc šī šūnu līnija hERα-HeLa-9 903 ļauj izmērīt testējamās ķimikālijas spēju inducēt luciferāzes gēna ekspresijas hERα mediētu transaktivāciju.

6. ER agonista testā datu interpretācijas pamatā ir tas, vai testējamās ķimikālijas inducētais maksimālais abildreakcijas līmenis ir vienāds ar vai lielāks par agonista atbildreakciju, kas ir vienāda ar 10 % no atbildreakcijas, ko izraisa koncentrācija, kura inducē pozitīvās kontroles (PC) (17β-estradiols (E2)) maksimālo atbildreakciju (1 nM) (t.i.,. the PK10). ER antagonista testā datu interpretācijas pamatā ir tas, vai atbildreakcija parāda vismaz 30 % aktivitātes samazinājumu salīdzinājumā ar atbildreakciju, ko inducē ar kontroles pastiprinājumu (25 pM, E2), neizraisot citotoksicitāti. Datu analīze un interpretācija sīkāk iztirzāta 34.–48. punktā.

PROCEDŪRA

Šūnu līnijas

7. Testam izmanto stabili transficēto šūnu līniju hERα-HeLa-9 903. Šūnu līniju var iegūt no Japānas Pētniecības bioresursu kolekcijas (JCRB) šūnu bankas ([1]), parakstot materiālu nodošanas līgumu.

8. Testēšanā izmanto tikai tādas šūnas, kas nesatur mikoplazmu. Vislabākā un jutīgākā metode, kā noteikt inficēšanos ar mikoplazmu, ir RT-PCR (polimerāzes ķēdes reakcija reāllaikā) (4) (5) (6).

Šūnu līnijas stabilitāte

9. Lai kontrolētu šūnu līnijas stabilitāti, agonista testā par references standartu izmanto E2, 17α-estradiolu, 17α-metiltestosteronu un kortikosteronu; tāpat vismaz vienu reizi testa veikšanas laikā mēra visu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni pie 1. tabulā norādītajām testa koncentrācijām, un iegūtajiem rezultātiem jābūt saskanīgiem ar 1. tabulā norādītajiem rezultātiem.

10. Antagonista testā vienlaikus paralēli katrai testa izpildes reizei mēra arī divu references standartu — tamoksifēna un flutamīda — pilnas koncentrācijas līknes. Pārliecinās, vai abu ķimikāliju kvalitatīvā klasifikācija (pozitīvs vai negatīvs) ir pareiza.

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

11. Šūnas uztur fenolsarkano nesaturošā Īgla minimālajā barotnē (*EMEM*), kas papildināta ar 60 mg/l antibiotiku (kanamicīnu) un 10 % liellopu embriju serumu, kurš apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli (DCC-FBS), CO2 inkubatorā (5 % CO2) 37±1 °C temperatūrā. Kad sasniegta 75 -90 % konfluence, šūnas var sadalīt 10 ml subkultūrās, kas satur 0,4 x 105 – 1 x 105 šūnas/ml, kultivēšanas trauciņos, kuru diametrs ir100 mm. Šūnas suspendē 10 % FBS-EMEM barotnē (kas ir līdzvērtīga EMEM un DCC-FBS barotnei) un tad uzsēj mikroplates iedobēs tā, lai blīvums būtu 1 x 104 šūnas/(100 µl x iedobe). Tad pirms eksponēšanas ķimikālijai šūnas 3 stundas preinkubē 5 % CO2 inkubatorā 37 °±1 °C temperatūrā. Plastmasas materiālos nedrīkst notikt nekāda estrogēniska aktivitāte.

12. Lai saglabātu reakcijas integritāti, šūnas audzē vairākās pasāžās no sasaldēta krājuma kondicionētā barotnē, un pasāžu skaits nedrīkst pārsniegt 40. Attiecībā uz šūnu līniju hERα-HeLa-9 903 tas būs mazāk par trim mēnešiem. Tomēr, ja šūnas audzē nepienācīgos kultivēšanas apstākļos, šūnu sniegums var pasliktināties.

13. DCC-FBS var vai nu sagatavot tā, kā aprakstīts 2.2. papildinājumā, vai iegūt no komerciāliem avotiem.

Pieņemamības kritēriji

Pozitīvi un negatīvi references standarti ER agonistu testā

14. Pirms pētījuma un tā laikā ir jāverificē testa sistēmas reaģētspēja,, izmantojot stipru estrogēnu (E2), vāju estrogēnu (17α-estradiolu), ļoti vāju agonistu (17α-metiltestosteronu) un negatīvu vielu (kortikosteronu) piemērotā koncentrācijā. 1. tabulā sniegts pieņemamo vērtību diapazons, kas sagatavots validācijas pētījuma (1) gaitā. Šos 4 paralēlos references standartus iekļauj katrā eksperimentā, un rezultātiem jāietilpst dotajās pieņemamajās robežās. Ja tā nav, tad jānoskaidro, kāpēc pieņemamības kritēriji nav izpildīti (iemesli var būt, piem., manipulācijas ar šūnām vai seruma un antibiotiku kvalitāte un koncentrācija), un tests jāatkārto. Ja pieņemamības kritēriji ir izpildīti, tad ļoti svarīga ir šūnu

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, fakss: +81-72-641-9812

kultivēšanas materiālu konsekventa izmantošana, lai nodrošinātu minimālu EC_{50}, PC_{50} un PC_{10} vērtību mainību. Četri paralēlie references standarti, kas jāiekļauj katrā eksperimentā (ko veic identiskos apstākļos, tostarp ar tādiem pašiem materiāliem, šūnu pasāžas līmeni un laborantiem), var nodrošināt testa jutību, jo pieņemamā diapazonā jābūt gan trīs pozitīvo references standartu PC_{10}, gan PC_{50} un EC_{50} vērtībām, ja tās var aprēķināt (sk. 1. tabulu).

1. tabula.

ER agonista testa četru references standartu pieņemamo vērtību diapazons

Nosaukums	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hilla virziena koeficients	Testa diapazons
17β-estradiols (E2) CAS Nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradiols CAS Nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikosterons CAS Nr.: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metiltestosterons CAS Nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Pozitīvi un negatīvi references standarti ER antagonistu testā

15. Pirms pētījuma un tā laikā ir jāverificē testa sistēmas reaģētspēja, izmantojot pozitīvu vielu (tamoksifēns) un negatīvu vielu (flutamīds) piemērotā koncentrācijā. 2. tabulā sniegts pieņemamo vērtību diapazons, kas sagatavots validācijas pētījuma (1) gaitā. Šos divus paralēlos references standartus iekļauj katrā eksperimentā, un rezultāti, kā norādīts kritērijos, būtu jānovērtē par pareiziem. Ja tā nav, tad jānoskaidro, kāpēc kritēriji nav izpildīti (iemesli var būt, piem., manipulācijas ar šūnām vai seruma un antibiotiku kvalitāte un koncentrācija), un tests jāatkārto. Bez tam jāaprēķina arī pozitīvās vielas (tamoksifēna) IC_{50} vērtības, un rezultātiem ir jāietilpst dotajās pieņemamības robežās. Ja pieņemamības kritēriji ir izpildīti, tad ļoti svarīga ir šūnu kultivēšanas materiālu konsekventa izmantošana, lai nodrošinātu minimālu IC50 vērtību mainību. Divi paralēlie references standarti, kas jāiekļauj katrā eksperimentā (ko veic identiskos apstākļos, tostarp ar tādiem pašiem materiāliem, šūnu pasāžas līmeni un laborantiem), var nodrošināt testa jutību (sk. 2. tabulu).

2. tabula.

ER antagonista testa divu references standartu pieņemamo vērtību diapazons

Nosaukums	Kritēriji	$LogIC_{50}$	Testa diapazons
Tamoksifēns CAS Nr.: 10540-29-1	Pozitīva: jāaprēķina IC50	-5,942 ~ -7,596	10-10 ~ 10-5 M
Flutamīds CAS Nr.: 13311-84-7	Negatīva: nav jāaprēķina IC30	—	10-10 10-5M

Pozitīvās kontroles un nesēja kontroles

16. ER agonista testa (1 nM, E2) un ER antagonista testa (10μM TAM) pozitīvās kontrole (PC) katrā platē jātestē vismaz trīskārši. Nesēju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā nesēja kontroli (VC) katrā platē vismaz trīskārši. Papildus šai VC, ja PC izmanto citu nesēju, nevis testējamo ķimikāliju, šī cita nesēja kontrole ir jātestē vismaz trīskārši tajā pašā platē kopā ar PC.

ER agonista testa kvalitātes kritēriji

17. Pozitīvās kontroles (1 nM, E2) vidējai luciferāzes aktivitātei jābūt vismaz 4 reizes lielākai par vidējo VC katrā platē. Šis kritērijs izvēlēts, pamatojoties uz novērtēšanas parametru uzticamību validācijas pētījumā (vēsturiski 4 līdz 30 reizes).

18. Kas attiecas uz testa kvalitātes kontroli, indukcijas palielinājums, kas atbilst paralēlās pozitīvās kontroles (1 nM, E2) PC10 vērtībai, par 1+2SN pārsniedz paralēlās nesēja kontroles indukcijas vērtību (=1). PC10 vērtības var izrādīties nozīmīgas prioritizēšanas vajadzībām, proti, lai vienkāršotu vajadzīgo datu analīzi salīdzinājumā ar statistisko analīzi. Statistiskā analīze sniedz informāciju par nozīmību, tomēr tā tā nav kvantitatīvs parametrs attiecībā uz koncentrācijas potenciālu, tāpēc tas prioritizēšanā ir mazāk noderīgs.

ER antagonista testa kvalitātes kritēriji

19. Pastiprinātās kontroles (25 nM, E2) vidējai luciferāzes aktivitātei jābūt vismaz 4 reizes lielākai par vidējo VC katrā platē. Šis kritērijs izvēlēts, pamatojoties uz novērtēšanas parametru uzticamību validācijas pētījumā.

20. Kas attiecas uz testa kvalitātes kontroli, 1 nM, E2 relatīvajai transkripcionālai aktivācijai (RTA) jābūt lielākai par 100 %, RTA 1μM 4-hidroksitamoksifēna (OHT) RTA jābūt mazākai par 40,6 % un 100 μM digitonīna (Dig) RTA jābūt mazākai par 0 %.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI").

Nesējs

21. Par paralēlo VC izmanto dimetilsulfoksīdu (DMSO) vai piemērotu šķīdinātāju tādā pašā koncentrācijā, kādu izmanto pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm un testējamām ķimikālijām. Testa ķimikālijas izšķīdina tādā šķīdinātājā, kurā attiecīgā testējamā ķimikālija šķīst un kurš ir sajaucams ar šūnu barotni. Piemēroti nesēji ir ūdens, etanols (tīrība 95 -100 %) un DMSO. Ja izmanto DMSO, tā saturs nedrīkst pārsniegt 0,1 % (tilp/.tilp.). Par katru nesēju ir jāpierāda, ka maksimālais izmantotais tilpums nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu.

Testējamo ķimikāliju sagatavošana

22. Parasti testējamās ķimikālijas izšķīdina DMSO vai citā piemērotā šķīdinātājā; iegūto šķīdumu pēc tam vairākkārt atšķaida ar to pašu šķīdinātāju attiecībā 1:10, un iegūto atšķaidījumu izmanto atšķaidīšanai ar barotni.

Šķīdība un citotoksicitāte Apsvērumi par diapazona noteikšanu

23. Ir jāveic sākotnējais tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas diapazonu un noteiktu, vai testējamā ķimikālija varētu uzrādīt kādas šķīdības vai citotoksicitātes problēmas. Sākumā ķimikālijas testē līdz maksimālajai koncentrācijai 1 μl/ml, 1 mg/ml vai 1 mM, atkarībā no tā, kura ir viszemākā. Pamatojoties uz sākotnējā testā novēroto citotoksicitāti vai nešķīdību, pirmajā galīgā testa izpildes reizē ķimikāliju testē sērijveida logaritmiskos atšķaidījumos, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM, 100μM, 10μM utt.), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes. Koncentrācijas otrajā un, ja vajadzīgs, trešajā izpildes reizē pēc vajadzības pielāgo nolūkā labāk raksturot koncentrācijas-atbildreakcijas līkni un izvairīties no koncentrācijām, pie kurām ķimikālija izrādījusies nešķīstoša vai pārmērīgu citotoksicitāti izraisoša.

24. Kas attiecas uz ER agonistiem un antagonistiem, datus interpretējot, ņem vērā to, ka pieaugošs citotoksicitātes līmenis var mainīt vai izslēgt tipisku sigmoidālu atbildreakciju. Jāizmanto tādas citotoksicitātes testēšanas metodes, kas var sniegt informāciju par 80 % šūnu dzīvotspēju, izmantojot piemērotu, laboratorijā apstiprinātu testu.

25. Ja citotoksicitātes testa rezultāti liecina, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija ir šūnu skaitu samazinājusi par 20 % vai vairāk, šī koncentrācija ir uzskatāma par citotoksisku, un visas koncentrācijas, kas ir vienādas ar vai lielākas par šo robežvērtību, no novērtējuma izslēdz.

Eksponēšana ķimikālijai un izkārtojums testa platē

26. Ķimikāliju atšķaidīšanās (1. un 2. etaps) un šūnu eksponēšanas (3. etaps) procedūra var būt šāda.

1. etaps. Katru testa ķimikāliju seriāli atšķaida DMSO vai piemērotā šķīdinātājā un ievieto mikrotitrēšanas plates iedobēs tā, lai sasniegtu tādas galīgās seriālās koncentrācijas, kādas noteiktas sākotnējā diapazona noteikšanas testā (parasti, piemēram, šādās sērijās: 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, and 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) trīskāršai testēšanai.

2. etaps. Ķimikāliju atšķaidīšana: Vispirms 1,5 μl testējamās ķimikālijas atšķaida ar šķīdinātāju, lai iegūtu barotnes tilpumu 500 μl.

3. etaps. Šūnu ķīmiskā ekspozīcija: 50 μl no 2. etapā sagatavotā atšķaidījuma ievieto testa iedobē, kas satur 10^4 šūnas/100 μl/iedobē.

Ieteicamais galīgais barotnes tilpums katrā iedobē ir 150 μl. Testa paraugu un references standartu sadalījums var būt tāds, kāds redzams 3. un 4. tabulā.

3. tabula

References standartu koncentrāciju sadalījums ER agonista testa platē

Rinda	17α-metiltestosterons			Kortikosterons			17α-estradiols			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1 % DMSO); PC: pozitīvā kontrole ((1 nM, E2)

27. References standartus (E2, 17α-estradiols, 17−μετιλτεστοστερονσμυνυκορτικοστερονσκκτεστττκατρ®®ιζπιλδεσιρ-ειζρρρρρτααβυλαττττKatrā testa platē iekļauj arī iedobes, kas satur PC, kura apstrādāta ar 1 nM no E2 un spēj izraisīt maksimālu E2 inducēšanu, un iedobes, kas satur VC, kura apstrādāta tikai ar DMSO (vai piemērotu šķīdinātāju (4. tabula). Ja vienā eksperimentā izmanto šūnas no dažādiem avotiem (piem., atšķirīgs pasāžu skaits vai atšķirīgas partijas utt.), tad references standartus testē ar katru šūnu avotu.

4. tabula

Testējamo ķimikāliju un plates kontroles ķimikāliju koncentrāciju sadalījums ER agonista testa platē

Rinda	Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2			Testējamā ķimikālija 3			Testējamā ķimikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1 % DMSO); PC: pozitīvā kontrole ((1 nM, E2)

5. tabula

References standartu koncentrāciju sadalījums ER antagonista testa platē

Rinda	Tamoksifēns			Flutamīds			Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole (1 nM, E2), OHT :4-hidroksitamoksifēns, Dig: digitonīns.

= pastiprināts ar 25pM, E2

28. Lai novērtētu ķimikāliju antagonistisko aktivitāti, iedobēs, kas atrodas A līdz G rindā, pievieno 25pM, E2. References standartus (tamoksifēns un flutamīds) testē katrā izpildes reizē. Katrā testa platē iekļauj arī iedobes ar PC, kas apstrādātas ar 1 nM, E2 un ko var izmantot par šūnu līnijas hERα-HeLa-9 903 kvalitātes kontroli, iedobes ar VC, kas apstrādātas ar DMSO (vai piemērotu šķīdinātāju), iedobes ar 0,1 % DMSO, kas apstrādātas ar DMSO, kurš pievienots E2 pastiprinātajai koncentrācijai, kas atbilst "pastiprinātajai kontrolei", iedobes ar 1 µM OHT galīgajā koncentrācijā un iedobes ar 100 µM Dig (5. tabula). Pārējās testa platēs izkārtojums ir tāds pats, taču netiek iekļautas references standartu iedobes (6. tabula). Ja vienā eksperimentā izmanto šūnas no dažādiem avotiem (piem., atšķirīgs pasāžu skaits vai atšķirīgas partijas utt.), tad references standartus testē ar katru šūnu avotu.

6. tabula

Testējamo ķimikāliju un plates kontroles ķimikāliju koncentrāciju sadalījums ER antagonista testa platē

Rinda	Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2			Testējamā ķimikālija 3			Testējamā ķimikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole (1 nM, E2); OHT: 4-hidroksitamoksifēns, Dig: digitonīns

: pastiprināts ar 25pM, E2

29. Pienācīgi jāpārliecinās, ka nav nekādu malas efektu; ja ir aizdomas, ka malas efekti varētu rasties, izkārtojums platē ir jāmaina, lai tos novērstu, piemēram, malās esošās iedobes var atstāt tukšas.

30. Pēc ķimikāliju pievienošanas testa plates 20-24 h inkubē 5 % CO2 inkubatorā 37±1°C temperatūrā, lai inducētu reportiergēnu produktu veidošanos.

31. Īpaša uzmanība jāpievērš sevišķi gaistošiem savienojumiem. Tādos gadījumos tuvumā esošās kontroliedobes var dot pseidopozitīvus rezultātus, un tie būtu jāsalīdzina ar gaidītajām un vēsturiskajām kontrolvērtībām. Nedaudzajos gadījumos, kad gaistamība var izrādīties problemātiska, ieteicams izmantot iedobju aizlīmes, kas ļauj testēšanas laikā efektīvi izolēt atsevišķas iedobes.

32. Lai nodrošinātu rezultātu neatkarību, galīgos testus ar to pašu ķimikāliju atkārto dažādās dienās.

Luciferāzes tests

33. Šajā testā var izmantot tirdzniecībā pieejamus luciferāzes testa reaģentus [piem., luciferāzes testa sistēmu Steady-Glo® (Promega, E2510 vai līdzvērtīgs)] vai standarta luciferāzes testa sistēmu (Promega, E1500 vai līdzvērtīgs), ar nosacījumu, ka tiek izpildīti pieņemamības kritēriji. Testa reaģentus izvēlās atkarībā no izmantojamā luminometra jutības. Ja izmanto standarta luciferāzes testa sistēmu, pirms substrāta pievienošanas izmanto šūnu kultūras līzes reaģentu (piem., Promega, E1531 vai līdzvērtīgs). Luciferāzes reaģentu lieto saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

DATU ANALĪZE

ER agonista tests

34. ER agonista testa gadījumā relatīvo transkripcionālo aktivitāti attiecībā pret PC (1 nM, E2) iegūst, analizējot luminiscences signālus tajā pašā platē šādos etapos (ir pieņemamas arī līdzvērtīgas matemātiskās darbības):

1. etaps. Aprēķina VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina normalizētās PC vidējo vērtību.

4. etaps. Plates katras iedobes normalizēto vērtību dala ar normalizētās PC vidējo vērtību (PC=100 %).

Attiecībā uz karu iedobi iegūtā vērtība atbilst šīs iedobes transkripcionālajai aktivitātei salīdzinājumā ar PC atbildreakciju.

5. etaps. Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrāciju grupas relatīvās transkripcionālās aktivitātes vidējo vērtību. Iegūtais rezultāts liecina par vidējo transkripcionālo aktivitāti (atbildreakcija) un par to, pie kādas koncentrācijas šī atbildreakcija tiek inducēta (sk. nākamo sadaļu).

EC_{50}, PC_{50} un PC_{10} inducēšanas noteikšana

35. Lai aprēķinātu EC50, ir vajadzīga pilnīga koncentrācijas-atbildreakcijas līkne, tomēr tas ne vienmēr ir iespējami vai lietderīgi, jo var pastāvēt zināmi koncentrācijas diapazona ierobežojumi (piemēram, citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ). Tomēr, tā kā EC50 un maksimālais inducēšanas līmenis (kas atbilst Hilla vienādojuma maksimālajai vērtībai) ir informatīvi parametri, tie parametri pēc iespējas būtu jānorāda. EC50 un maksimālā inducēšanas līmeņa aprēķinā jāizmanto piemērota statistiskā programmatūra (piem., *Graphpad Prism*).Ja datiem par koncentrāciju un atbildreakciju ir piemērojams Hilla logistiskais vienādojums, EC50 aprēķina ar šādu vienādojumu(7):

Y= bāzes punkts+ (virsotnes punkts- bāzes punkts) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x Hilla virziena koeficients)) kur:

X ir koncentrācijas logaritms; un

Y ir reakcija; to mēra no sigmoidālās līknes bāzes līdz virsotnei. Hilla logistiskajā vienādojumā bāzes punkts ir nulle.

36. Par katru testējamo ķimikāliju sniedz šādus datus:

RPCMax , kas ir testa ķimikālijas inducētās atbildreakcijas maksimālais līmenis un ko izsaka procentos no 1 nM, E2 inducētās atbildreakcijas rajā pašā platē, kā arī PC_{Max} (koncentrācija, kas atbilst RPCMax); un

ja ķimikālijas ir pozitīvas — koncentrācijas, kas inducē PC10 un attiecīgā gadījumā PC50.

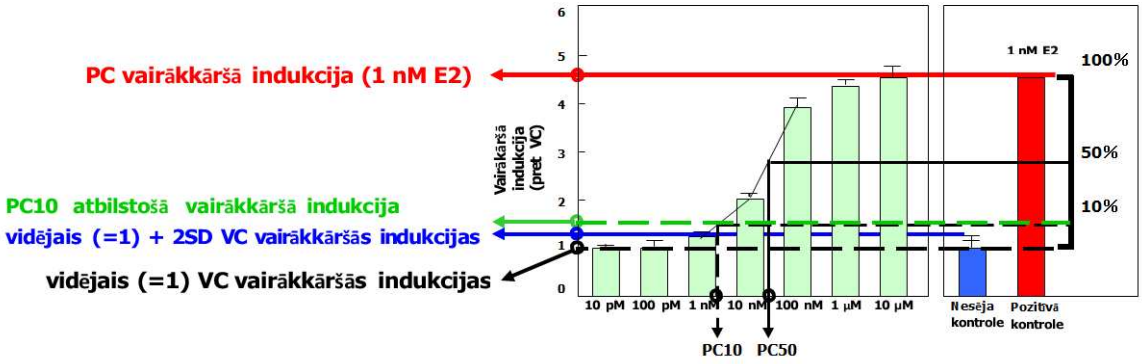
37. PCx vērtību var aprēķināt, interpolējot starp 2 punktiem uz X-Y līknes, no kuriem viens atrodas uzreiz virs, bet otrs uzreiz zem PCx vērtības. Ja datu punktiem, kas atrodas uzreiz virs un uzreiz zem PCx vērtības, ir koordinātas attiecīgi (a,b) un (c,d), tad PCx vērtību var aprēķināt ar šādu vienādojumu:

$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. PC vērtību apraksts sniegts 1. attēlā.

1. attēls

PC vērtību atvasināšanas piemērs. PC (1 nM, E2) ir katrā testa platē



ER antagonista tests

39. ER antagonista testa gadījumā relatīvo transkripcionālo aktivitāti (RTA) attiecībā pret pastiprināto kontroli (25 pM, E2) iegūst, analizējot luminiscences signālus tajā pašā platē šādos etapos (ir pieņemamas arī līdzvērtīgas matemātiskās darbības):

1. etaps. Aprēķina VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi. 3. etaps. Aprēķina normalizētās pastiprinātās kontroles vidējo vērtību.

4. etaps. Plates katras iedobes normalizēto vērtību dala ar normalizētās pastiprinātās kontroles vidējo vērtību (pastiprinātā kontrole=100 %).

Attiecībā uz karu iedobi iegūtā vērtība atbilst šīs iedobes transkripcionālajai aktivitātei salīdzinājumā ar pastiprinātās kontroles atbildreakciju.

5. etaps. Aprēķina katras koncentrāciju grupas relatīvās transkripcionālās aktivitātes vidējo vērtību.

IC_{30} and IC_{50} inducēšanas noteikšana

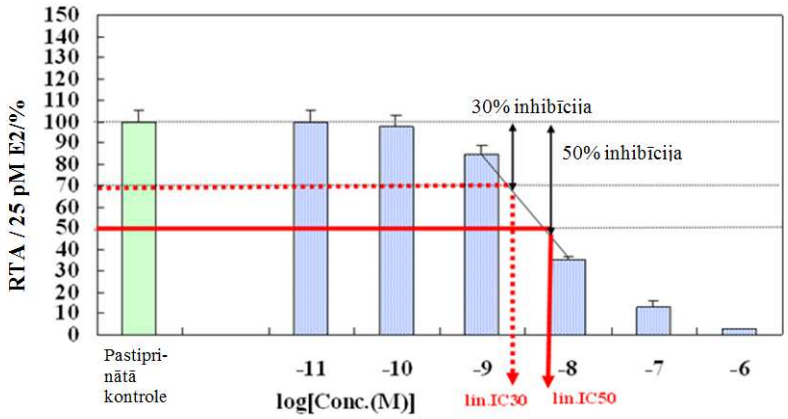
40. Ja ķimikālijas ir pozitīvas — koncentrācijas, kas inducē IC30 un attiecīgā gadījumā IC50.

41. ICx vērtību var aprēķināt, interpolējot starp 2 punktiem uz X-Y līknes, no kuriem viens atrodas uzreiz virs, bet otrs uzreiz zem ICx vērtības. Ja datu punktiem, kas atrodas uzreiz virs un uzreiz zem ICx vērtības, ir koordinātas attiecīgi (c,d) un (a,b), tad ICx vērtību var aprēķināt ar šādu vienādojumu:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

2. attēls

IC vērtību atvasināšanas piemērs. Pastiprinātā kontrole (25 pM, E2) ir katrā testa platē



RTA: relatīvā transkripcionālā aktivitāte

42. Rezultātu pamatā ir divas (vai trīs) neatkarīgas izpildes reizes. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti salīdzināmi un līdz ar to reproducējami rezultāti, nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi. Rezultāti ir pieņemami, ja tie:

— atbilst pieņemamības kritērijiem (sk. sadaļu "Pieņemamības kritēriji", 14.-20. punkts),

— ir reproducējami.

Datu interpretācijas kritēriji

7. tabula

Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ER agonistu testā

Pozitīvs	Ja ir iegūta tāda RPC_{Max} vērtība, kas ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.
Negatīvs	Ja RPC_{Max} vērtība nesasniedz vismaz 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

8. tabula

Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ER antagonistu testā

Pozitīvs	Ja IC30 ir aprēķināta vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.
Negatīvs	Ja IC30 nav aprēķināta divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

43. Datu interpretācijas kritēriji ir redzami 7. un 8. tabulā. Pozitīvos rezultātus raksturo gan ietekmes intensitāte, gan koncentrāciju, pie kuras novērojama ietekme Šo divējādo mērķi iespējams sasniegt, ja rezultātus izsaka kā koncentrāciju, pie kuras agonista testā sasniedz 50 % (PC50) vai 10 % (PC10) no PC vērtībām un antagonista testā 50 % (IC50) vai 30 % (IC30) no pastiprinātās kontroles vērtībām tiek inhibētas. Testējamo ķimikāliju uzskata par pozitīvu, ka testējamās ķimikālijas inducētā maksimālā atbildreakcija (RPCMax) ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no PC atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm, un par negatīvu, ja RPCMax nesasniedz vismaz 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

44. PC10, PC50 un PCMax ER agonista testā un IC30 un IC50 ER antagonista testā var aprēķināt, izmantojot izklājlapu, kas pieejama kopā ar šīm testēšanas vadlīnijām ESAO publiskajā vietnē ([2]).

45. PC10 vai PC50 un IC30 vai IC50 vērtību noteikšanai ir pietiekami testu atkārtot divreiz. Tomēr, ja datu bāzlīnija tajā pašā koncentrāciju diapazonā uzrāda pārlieku augstu variācijas koeficientu (VK, %), šos datus nevar uzskatīt par ticamiem un ir jānoskaidro šādu variāciju iemesls. To triplicēto jēldatu (t.i., luminiscences intensitātes datu) variācijas koeficientam, kurus izmanto kā datu punktus PC10 aprēķinā, ir jābūt mazākam par 20 %.

46. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji, tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu duplicēšana.

47. ER agonista testa gadījumā, kur ir nepieciešama plašāka informācija papildus tai, kas vajadzīga šajās vadlīnijās paredzētajam skrīningam un prioritizēšanai attiecībā uz pozitīvām testējamām ķimikālijām, jo īpaši PC10-PC49 ķimikālijām, kā arī ķimikālijām, par kurām ir aizdomas, ka tās varētu pārlieku stimulēt luciferāzi, apstiprinājumu tam, ka novērotā luciferāzes aktivitāte ir tikai ERα specifiska atbildreakcija, var gūt, izmantojot ERα antagonistu (sk. 2.1. papildinājumu).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

48. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

LITERATŪRA

(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- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol*., 235, E97-El02.

2.1. papildinājums

PSEIDOPOZITĪVI REZULTĀTI: NOVĒRTĒJUMS PAR RECEPTORU NEMEDIĒTIEM LUMINISCENCES SIGNĀLIEM

1. ER agonista testā pseidopozitīvus rezultātus var dot vai nu ER nemediēta luciferāzes gēna aktivācija, vai gēna produkta tieša aktivācija, vai nesaistīta fluorescence. Par šādu efektu liecina nepilnīga vai neparasta devas-atbildreakcijas līkne. Ja rodas šādas aizdomas, izvērtē, kāda ietekme uz atbildreakciju ir ER antagonistam (piem., 4-hidroksitamoksifēnam (OHT)) netoksiskās koncentrācijās. Šim nolūkam var nebūt derīgs tīrais antagonists ICI 182780 , jo pienācīga ICI 182780 koncentrācija var samazināt VK vērtību, bet tas savukārt ietekmē datu analīzi.

1. Lai garantētu šādas pieejas derīgumu, tajā pašā platē jātestē šādi elementi:

— nezināmās ķimikālijas agonistiskā aktivitāte ar OHT (10 μM) un bez tā;

— VK (trīsreiz)

— OHT (trīsreiz)

— 1 nM, E2 (trīsreiz) kā agonista PC

— 1 nM, E2 + OHT (trīsreiz)

Datu interpretācijas kritēriji

Piezīme. Visās iedobēs nesējs ir tādā pašā koncentrācijā.

— Ja nezināmās ķimikālijas agonistisko aktivitāti NEIETEKMĒ apstrāde ar ER antagonistu, rezultātu uzskata par "negatīvu".

— Ja nezināmās ķimikālijas agonistiskā aktivitāti ir pilnībā inhibēta, piemēro interpretācijas kritērijus.

— Ja agonistiskā aktivitāte pie zemākās koncentrācijas ir vienāda a vai lielāka par PC10 , nezināmās ķimikālijas atbildreakcija ir inhibēta tādā pašā vai lielākā mērā kā PC10 atbildreakcija. Aprēķina starpību starp atbildreakcijām ar ER antagonistu apstrādātās un neapstrādātās iedobēs; šo starpību uzskata par patieso atbildreakciju un izmanto, lai aprēķinātu parametrus, kas nepieciešami ķimikālijas klasificēšanai.

Datu analīze

Pārbauda veiktspējas standartu.

Pārbauda VK starp iedobēm, kas apstrādātas vienādos apstākļos.

1. Aprēķina VK vidējo vērtību.

2. Šo VK vidējo vērtību atskaita no katras ar **OHT** neapstrādātās iedobes vērtības.

3. Aprēķina OHT vidējo vērtību.

4. Šo VK vidējo vērtību atskaita no katras ar OHT apstrādātās iedobes vērtības.

5. Aprēķina PC vidējo vērtību.

6. Aprēķina visu pārējo iedobju relatīvo transkripcionālo aktivitāti attiecībā pret PC.

2.2. papildinājums

AR DCC (AR DEKSTRĀNU PĀRKLĀTA OGLE) APSTRĀDĀTA SERUMA SAGATAVOŠANA

1. Seruma apstrādāšana ar DCC (ar dekstrānu pārklāta ogle) plaši izmantots paņēmiens, kā no seruma atdalīt šūnu barotnei pievienotos estrogēniskos savienojumus, lai izslēgtu, ka atbildreakcija ir nobīdījusies, jo serumā ir estrogēnu atliekas. Ar šo paņēmienu var apstrādāt 500 ml liellopu embriju seruma.

Sastāvdaļas

2. Nepieciešamie materiāli un aprīkojums

Materiāli

Aktīvā ogle

Dekstrāns

Magnija hlorīda heksahidrāts (MgCl2 6H2O)

Saharoze

1 M HEPES buferšķīdums (pH 7,4)

Filtrācijas ceļā iegūts ultratīrs ūdens

Aprīkojums

Autoklāvēts stikla trauks (izmēru attiecīgi pielāgo) Parastā laboratorijas centrifūga (temperatūru iespējams iestatīt uz 4 °C)

PROCEDŪRA

2. Šī procedūra domāta centrifūgas mēģenēm ar tilpumu 50 ml.

[1. diena] Ar dekstrānu pārklāto ogli suspendē 1 l ultratīrā ūdens, kam pievienots 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M saharozes, 2,5 g ogles, 0,25 g dekstrāna un 5 mM HEPES; maisa 4 °C visu nakti.

[2. diena] Suspensiju salej 50 ml centrifūgas mēģenēs un 10 minūtes centrifugē ar 10 000 apgr./min. 4 °C temperatūrā. Atdala supernatantu, un pusi no ogles nogulsnēm atliek 4 °C temperatūrā izmantošanai 3. dienā. Atlikušu pusi suspendē FBS, kas ir lēni atkausēts (lai nepieļautu izgulsnēšanos) un pēc tam 30 minūtes 56 °C temperatūrā inaktivēts; pārlej autoklāvētā stikla traukā (piem., Erlenmeijera kolbā). Šo suspensiju atstāj uz nakti un lēni maisa 4 °C temperatūrā.

[3. diena] FBS suspensiju salej centrifūgas mēģenēs un 10 minūtes centrifugē ar 10 000 apgr./min. 4 °C temperatūrā. Savāc FBS un pārlej to 2. dienā sagatavotajās un atliktajās ogles nogulsnēs. Šīs ogles nogulsnes suspendē FBS un uz nakti lēni maisa 4 °C temperatūrā.

[4. diena] Šo suspensiju salej mēģenēs, 10 min. centrifugē pie 10 000 apgr./min. 4 °C temperatūrā; supernatantu sterilizē, filtrējot caur 0,2 μm sterilu filtru. Šo ar DCC apstrādāto FBS glabā −20 °C temperatūrā, un tas ir jāizmanto gada laikā.

3. Papildinājums

VM7LUC ESTROGĒNA RECEPTORU TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS ESTROGĒNA RECEPTORU AGONISTU UN ANTAGONISTU NOTEIKŠANAI

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šajā testā izmanto VM7Luc4E2 šūnu līniju ([1]). To ir apstiprinājis Alternatīvu toksikoloģisko metožu novērtēšanas nacionālās toksikoloģijas programmas starpaģentūru centrs (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) un Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteja (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). VM7Luc šūnu līnijas galvenokārt ekspresē endogēniskos ERα un nelielu daudzumu endogēnisko ERβ (2) (3) (4).

2. Šis tests ir izmantojams ļoti daudzām vielām, ja vien tās šķīst dimetilsulfoksīdā (DMSO; CAS Nr. 67-68-5), nereaģē ar DMSO vai šūnu kultūru un testējamajā koncentrācijā nav citotoksiskas. Ja DMSO izmantošana nav iespējama, var izmantot citu nesēju, piem., etanolu vai ūdeni (sk. 12. punktu). Pierādītā VM7Luc ER TA (ant)agonistu testa veiktspēja liecina, ka ar šo testu iegūtie dati var sniegt informāciju par ER mediētiem darbības mehānismiem, un tos var izmantot, nosakot, kuras vielas testējamas prioritāri.

3. Šis tests ir īpaši paredzēts hERα un hERß mediētas TA noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot hemiluminiscenci. Hemiluminiscence tiek plaši izmantota biotestos, jo luminiscencei ir augsta signāla un fona attiecība. Tomēr vielas, kas inhibē luciferāzes fermentu, var radīt maldīgu priekšstatu par jāņtārpiņu luciferāzes aktivitāti šūnu testos, proteīnu stabilizācijas dēļ izraisot šķietamu inhibīciju vai pastiprinātu luminiscenci. Turklāt dažos uz luciferāzi balstītos ER reportiergēnu testos ir novēroti receptoru nemediēti luminiscences signāli luciferāzes reportiergēna pārmērīgas aktivācijas dēļ, ja fitoestrogēnu koncentrācija ir lielāka par 1 μM (9) (11). Lai gan devas–atbildreakcijas līkne liecina, ka ER sistēmas patiesā aktivācija rodas pie mazākām koncentrācijām, stabili transficētu ER TA testu sistēmās rūpīgi jāpārbauda luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie fitoestrogēnu vai tādu līdzīgu savienojumu, par kuriem ir aizdomas, ka tie rada fitoestrogēniem līdzīgu pārmērīgu luciferāzes reportiergēna aktivāciju, augstām koncentrācijām.

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļa "VISPĀRĪGAIS IEVADS" un "ER TA TESTA KOMPONENTI". Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. Testu izmanto, lai norādītu ER ligandu saistīšanos, kam seko receptoru–ligandu kompleksa translokācija uz kodolu. Kodolā receptoru–ligandu komplekss saistās ar specifiskiem DNS atbildreakcijas elementiem un transaktivē reportiergēnu (luc), kā rezultātā veidojas luciferāze un pēc tam izstarojas gaisma, kuru var kvantitatīvi noteikt ar luminometru. Luciferāzes aktivitāti var ātri un lēti izvērtēt ar vairākiem komerciāli pieejamiem testa komplektiem. VM7Luc ER TA testā izmanto uz ER reaģējošu cilvēka krūts adenokarcinomas šūnu līniju VM7, kas ir stabili transficēta ar jāņtārpiņu *luc* reportiera konstruktu, ko regulē četri estrogēnu atbildreakcijas elementi, kas ievietoti pirms peles krūts audzēja vīrusa promotera (MMTV), lai noteiktu vielas, kas *in vitro* uzrāda ER agonistu vai antagonistu aktivitāti. Šim MMTV

([1]) Līdz 2016. gada jūnijam šo šūnu līniju sauca par BG1Luc šūnu līniju. BG-1 šūnas pirmoreiz aprakstīja Geisinger et al. (1998) (12), un pēc tam tās sīkāk raksturoja Nacionālā Vides veselības zinātņu institūta (NIEHS) pētnieki (13). Salīdzinoši nesen atklāts, ka pētnieki izmanto divus dažādus BG-1 šūnu variantus — BG-1 Fr un BG-1 NIEHS. Li un līdzstrādnieku veiktā padziļinātā analīzē (2014) (14) atklājās, ka BG-1 Fr ir unikāla un ka BG-1 NIEHS, t.i., sākotnējā šūnu līnija, ko izmantoja testa izstrādē, nav vis BG1 cilvēka olnīcu karcinomas šūnu līnija, bet gan MCF7 cilvēka krūts vēža šūnu līnijas variants. Testā izmantoto šūnu līniju, ko sākotnēji sauca par BG1Luc4E2 (15), tagad apzīmēs kā VM7Luc4E2 ("V" = variants; "M7" = MCF7 šūnas). Tāpat testu tagad apzīmēs kā VM7Luc ER TA. Lai gan mainās testa pamatā esošās šūnu līnijas izcelsme, tas neietekmē ne publicētos validācijas pētījumus, ne šā testa izmantošanas lietderību estrogēnisko/antiestrogēnisko ķimikāliju skrīningā.

promoteram vērojama tikai neliela krusteniskā reakcija ar citiem steroīdajiem un nesteroīdajiem hormoniem (8). Datu interpretācijas kritēriji ir detalizēti aprakstīti 41. punktā. Īsumā, pozitīvu atbildreakciju raksturo tāda koncentrācijas–atbildreakcijas līkne, kurā ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas (vidējā vērtība ± standartnovirze) nepārklājas, kā arī tādas amplitūdas izmaiņas (normalizētā relatīvā gaismas vienība (RLU)), kas ir vismaz 20 % no references standarta maksimālās vērtības(17β-estradiols [E2; CAS Nr. 50-28-2] agonistu testam, raloksifena HCl [Ral; CAS Nr. 84449-90-1]/E2 antagonistu testam).

PROCEDŪRA

Šūnu līnija

6. Testam izmanto stabili transficēto šūnu līniju VM7Luc4E2. Pašlaik šūnu līnija iegādājama tikai ar tehniskās licences līgumu no Kalifornijas universitātes Deivisā (University of California, Davis), Kalifornijā, ASV ([2]), un no Xenobiotic Detection Systems Inc. Daremā, Ziemeļkarolīnā, ASV ([3]).

Šūnu līnijas stabilitāte

7. Lai saglabātu šūnu līnijas stabilitāti un integritāti, šūnas audzē vairākās pasāžās no sasaldēta krājuma šūnu uzturēšanas barotnē (sk. 9. punktu). Šūnas nedrīkst kultivēt vairāk nekā 30 pasāžās. VM7Luc4E2 šūnu līnijai 30 pasāžas nozīmē apmēram trīs mēnešus.

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

8. Jāievēro Norādījumos par labu šūnu kultivēšanas praksi (Guidance on Good Cell Culture Practice) (5) (6) norādītās procedūras, lai nodrošinātu visu materiālu un metožu kvalitāti un garantētu visa veiktā darba integritāti, derīgumu un reproducējamību.

9. VM7Luc4E2 šūnas tur RPMI 1 640 barotnē, kam pievienots 0,9 % penicilīna–streptomicīna maisījums (Pen-Strep) un 8,0 % liellopu embriju serums (FBS), īpašā audu kultivēšanas inkubatorā 37 °C ± 1 °C temperatūrā, 90 % ± 5 % mitrumā un 5,0 % ± 1 % CO_2/gaisā.

10. Kad sasniegta ~80 % konfluence, VM7Luc4E2 šūnas 48 stundas subkultivē un kondicionē bezestrogēna vidē pirms šūnu uzsēšanas 96 iedobju platēs, lai eksponētu testējamām ķimikālijām un analizētu no estrogēna atkarīgo luciferāzes aktivitātes inducēšanu. Bezestrogēna barotne (EFM) satur Dulbeko modificēto Īgla barotni (DMEM) bez fenolsarkanā, kas papildināta ar 4,5 % ar ogli/dekstrānu apstrādātu FBS, 1,9 % L-glutamīnu un 0,9 % Pen-Strep. Nevienam plastmasas izstrādājumam nedrīkst būt estrogēniskas aktivitātes [sk. detalizēto protokolu (7)].

Pieņemamības kritēriji

11. Testa apstiprināšanas vai noraidīšanas pamatā ir novērtējums par rezultātiem, kas katrā 96 iedobju platē iegūti ar references standartiem un kontroli. Katru references standartu testē vairākās koncentrācijās, un ir vairāki katras references standarta un kontroles koncentrācijas paraugi. Rezultātus salīdzina ar kvalitātes kontrolēm (KK) šiem

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telephone: 919-688-4804, fakss: 919-688-4404

parametriem, kas iegūti no agonistu un antagonistu vēsturiskajām datubāzēm, ko katra laboratorija izveidojusi kompetences pierādīšanas laikā. Vēsturiskajās datubāzēs pastāvīgi tiek atjauninātas references standartu un kontroles vērtības. Ja mainās aprīkojums vai laboratorijas apstākļi, var būt nepieciešams izveidot atjauninātas vēsturiskās datubāzes.

Agonistu tests

Diapazona noteikšanas tests

- Inducēšana: nosaka inducēšanu platē, , vidējo augstāko E2 references standarta relatīvās gaismas vienības (RLU) vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību. Parasti iegūst pieckāršu indukciju, taču eksperimentu uzskata par pieņemamu, ja indukcija ir vismaz četrkārša vai lielāka.

- DMSO kontroles rezultāti: šķīdinātāja kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās šķīdinātāja kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.

- Eksperiments, kas neatbilst kādam no pieņemamības kritērijiem, jāatmet un jāatkārto.

Visaptverošs tests

Te ietilpst pieņemamības kritēriji no agonistu diapazona noteikšanas testa un tālāk norādītie kritēriji.

- References standarta rezultāti. E2 references standarta koncentrācijas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai un ar vismaz trim vērtībām koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā.

- Pozitīvās kontroles rezultāti. Metoksihlora kontroles RLU vērtībām jābūt lielākām par DMSO vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi no DMSO vidējās vērtības.

- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

Antagonistu tests

Diapazona noteikšanas tests

- Samazinājums Samazinājumu platē nosaka, vidējo augstāko Ral/E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību. Parasti iegūst pieckāršu samazinājumu, taču eksperimentu uzskata par pieņemamu, ja samazinājums ir vismaz trīskāršs.

- E2 kontroles rezultāti. E2 kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās E2 kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.

- DMSO kontroles rezultāti: DMSO kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās šķīdinātāja kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.

• Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

Visaptverošs tests

Te ietilpst pieņemamības kritēriji no antagonistu diapazona noteikšanas testa un tālāk norādītie kritēriji.

• References standarta rezultāti. Ral/E2 references standarta koncentrācijas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai un ar vismaz trim vērtībām koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā.

• Pozitīvās kontroles rezultāti. Tamoksifēna/E2 kontroles RLU vērtībām jābūt mazākām par E2 kontroles vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi no E2 kontroles vidējās vērtības.

• Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

References standarti, pozitīvās un nesēja kontroles

Nesēja kontrole (agonistu un antagonistu testi)

12. Nesēju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā nesēja kontroli (VC). VM7Luc ER TA testa validēšanā izmantotais nesējs bija 1 % (tilpumkoncentrācija) dimetilsulfoksīds (DMSO, CAS Nr. 67-68-5) (sk. 24. punktu). Ja izmanto citu nesēju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas vajadzības gadījumā jātestē tajā pašā nesējā.

References standarts (agonistu diapazona noteikšana)

13. References standarts ir E2 (CAS Nr. 50-28-2). Diapazona noteikšanas testēšanā references standarts nozīmē, ka četras E2 koncentrācijas ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ un $2{,}87 \times 10^{-12}$ M) sērijveidā atšķaida, katru koncentrāciju testējot dubultiedobēs.

References standarts (agonistu visaptverošs tests)

14. Visaptverošā testēšanā E2 sērijveidā atšķaida attiecībā 1:2, līdz iegūst 11 E2 koncentrācijas (diapazonā no $3{,}67 \times 10^{-10}$ līdz $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) dubultiedobēs.

References standarts (antagonistu diapazona noteikšana)

15. References standarts ir Ral (CAS Nr. 84449-90-1) un E2 (CAS Nr. 50-28-2) maisījums. Diapazona noteikšanas testēšanā Ral/E2 maisījumu sērijveidā atšķaida, līdz iegūst trīs Ral koncentrācijas ($3{,}06 \times 10^{-9}$; $7{,}67 \times 10^{-10}$ un $1{,}92 \times 10^{-10}$M) ar E2 konstantā koncentrācijā ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) dubultiedobēs.

References standarts (antagonistu visaptverošs tests)

16. Visaptverošā testēšanā Ral (diapazonā no $2{,}45 \times 10^{-8}$ līdz $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) sērijveidā atšķaida attiecībā 1:2 ar E2 konstantā koncentrācijā ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M), līdz iegūst deviņas Ral/E2 koncentrācijas dubultiedobēs.

Vāji pozitīvā kontrole (agonisti)

17. Vāji pozitīvā kontrole ir 9,06 x 10^{-6} M p,p'-metoksihlors (metoksihlors; CAS Nr. 72-43-5) EFM barotnē.

Vāji pozitīvā kontrole (antagonisti)

18. Vāji pozitīvā kontrole ir tamoksifēns (CAS Nr. 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M ar E2 9,18 × 10^{-11} M EFM barotnē.

E2 kontrole (tikai antagonistu tests)

19. E2 kontrole ir E2 9,18 × 10^{-11} MEFM barotnē, un to izmanto kā bāzlīnijas negatīvo kontroli.

Vairākkāršā indukcija (agonisti)

20. References standarta (E2) luciferāzes aktivitātes indukciju nosaka, vidējo augstāko E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību, un rezultātam jābūt vairāk nekā četras reizes lielākam.

Vairākkāršais samazinājums (antagonisti)

21. References standarta (Ral/E2) luciferāzes aktivitātes vidējo vērtību nosaka, vidējo augstāko Ral/E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību, tai jābūt vairāk nekā trīs reizes lielākai.

Laboratorijas kompetences pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu šīs testēšanas metodes sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI")

Nesējs

22. Testa ķimikālijas izšķīdina tādā šķīdinātājā, kurā attiecīgā testējamā ķimikālija šķīst un kurš ir sajaucams ar šūnu barotni. Piemēroti nesēji ir ūdens, etanols (tīrība 95 -100 %) un DMSO. Ja izmanto DMSO, tā saturs nedrīkst pārsniegt 1 % (tilp/.tilp.). Par katru nesēju ir jāpierāda, ka maksimālais izmantotais tilpums nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu. References standartus un kontroles izšķīdina 100 % šķīdinātājā un pēc tam EFM barotnē atšķaida līdz atbilstīgām koncentrācijām.

Testējamo ķimikāliju sagatavošana

23. Testējamās ķimikālijas izšķīdina 100 % DMSO (vai piemērotā šķīdinātājā) un pēc tam EFM barotnē atšķaida līdz atbilstīgām koncentrācijām. Pirms izšķīdināšanas un atšķaidīšanas jānogaida, līdz visas testējamās ķimikālijas sasilst līdz istabas temperatūrai. Katram eksperimentam jāsagatavo svaigi testējamo ķimikāliju šķīdumi. Šķīdumos nedrīkst būt redzamas nogulsnes vai duļķes. References standartu un kontroļu izejšķīdumus var sagatavot lielā apjomā, taču galīgais references standarts, kontroles atšķaidījumi un testējamās ķimikālijas katram eksperimentam jāsagatavo svaigas un jāizmanto 24 stundās pēc sagatavošanas.

Šķīdība un citotoksicitāte Apsvērumi par diapazona noteikšanu

24. Diapazona noteikšanas pamatā ir septiņi sērijveida atšķaidījumi attiecībā 1:10 divos atkārtojumos. Sākumā testējamās ķimikālijas testē pie maksimālās koncentrācijas 1 mg/ml (~1 mM) agonistu testēšanā un 20 μg/ml (~10 μM) antagonistu testēšanā. Diapazona noteikšanas eksperimentus izmanto, lai noteiktu:

— testējamās ķimikālijas sākuma koncentrācijas, kas izmantojamas visaptverošā testēšanā;

— testējamās ķimikālijas atšķaidījumus (1:2 vai 1:5), kas izmantojami visaptverošā testēšanā.

25. Šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes novērtējums ir ietverts agonistu un antagonistu testu protokolos (7) un iekļauts diapazona noteikšanas un visaptverošajā testēšanā. Citotoksicitātes metode, ko izmantoja šūnu dzīvotspējas novērtēšanai VM7Luc ER TA testa (1) validēšanas laikā, bija mērogota kvalitatīvā vizuālās novērošanas metode, tomēr citotoksicitātes noteikšanai var izmantot kvantitatīvu metodi (skatīt protokolu (7)). Nevar izmantot datus par testējamās ķimikālijas koncentrācijām, kas izraisa dzīvotspējas samazināšanos par vairāk nekā 20 %.

Eksponēšana ķimikālijai un izkārtojums testa platē

26. Šūnas saskaita un uzsēj audu kultūras 96 iedobju platēs (2 x 10^5 šūnas vienā iedobē) EFM barotnē, un inkubē 24 stundas, lai šūnas varētu piestiprināties pie plates. EFM atdala un aizstāj ar testējamajām un references ķimikālijām EFM barotnē, un inkubē 19–24 stundas. Īpaša uzmanība jāpievērš ļoti gaistošām vielām, jo tuvējās kontroliedobes var dot pseidopozitīvus rezultātus. Šādos gadījumos ieteicams izmantot iedobju aizlīmes, kas ļauj testēšanas laikā efektīvi izolēt atsevišķas iedobes.

Diapazona noteikšanas tests

27. Diapazona noteikšanas testēšanā izmanto visas 96 iedobju plates iedobes; testē līdz pat sešām testējamajām ķimikālijām septiņās dažādās koncentrācijās, ko iegūst sērijveida atšķaidīšanā attiecībā 1:10 divos atkārtojumos (sk. 1. un 2. attēlu).

— *Agonistu* diapazona noteikšanas testēšanā izmanto četras E2 koncentrācijas divos atkārtojumos kā references standartu un četras DMSO kontroles replikāta iedobes.

— Antagonistu diapazona noteikšanas testēšanā izmanto trīs Ral/E2 maisījuma koncentrācijas (E2 ir konstants 9,18 × 10^{-11} M) divos atkārtojumos kā references standartu un trīs replikātu iedobes, kas paredzētas E2 un DMSO kontrolēm.

1. attēls.

Agonistu diapazona noteikšanas testa 96 iedobju plates izkārtojums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Saīsinājumi: no E2-1 līdz E2-4 = E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC1-1 līdz TC1-7 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-7 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC3-1 līdz TC3-7 = 3. testējamās ķimikālijas (TC3) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC4-1 līdz TC4-7 = 4. testējamās ķimikālijas (TC4) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC5-1 līdz TC5-7 = 5. testējamās ķimikālijas (TC5) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC6-1 līdz TC6-7 = 6. testējamās ķimikālijas (TC6) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

2. attēls.

Antagonistu diapazona noteikšanas testa 96 iedobju plates izkārtojums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Saīsinājumi: E2 = E2 kontrole; no Ral-1 līdz Ral-3 = raloksifena/E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC1-1 līdz TC1-7 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-7 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC3-1 līdz TC3-7 = 3. testējamās ķimikālijas (TC3) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC4-1 līdz TC4-7 = 4. testējamās ķimikālijas (TC4) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC5-1 līdz TC5-7 = 5. testējamās ķimikālijas (TC5) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC6-1 līdz TC6-7 = 6. testējamās ķimikālijas (TC6) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

Piezīme. Visas testējamās ķimikālijas testē E2 klātbūtnē ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).28.
Ieteicamais galīgais barotnes tilpums katrā iedobē ir 200 µl. Izmanto tikai tādas testa plates, kurās šūnām visās iedobēs dzīvotspēja ir 80 % un lielāka.

29. Sākuma koncentrāciju noteikšana visaptverošai ***agonistu*** testēšanai ir detalizēti aprakstīta agonistu protokolā (7). Īsumā, tiek izmantoti tālāk aprakstītie kritēriji.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē neviens punkts nav lielāks par DMSO kontroles rezultātu vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošai testēšanai izmanto 11 atšķaidījumu sēriju attiecībā 1:2, sākot ar maksimālo šķīstošo koncentrāciju.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē ir punkti, kas ir lielāki par DMSO kontroles rezultātu vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošā testēšanā izmanto 11 secīgus atšķaidījumus, un sākuma koncentrācijai jābūt par vienu logaritmu augstākai nekā koncentrācijai, kas diapazona noteikšanā dod augstāko koriģēto RLU vērtību. 11 atšķaidījumu sērijas pamatā ir atšķaidījumi attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi tālāk aprakstītajiem kritērijiem.

11 punktu atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 jāizmanto, ja šādi iegūtais koncentrāciju diapazons ļauj novērot atbildreakciju pilnu diapazonu, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, kas iegūta diapazona noteikšanas testā. Pretējā gadījumā izmanto atšķaidījumu attiecībā 1:5.

— Ja diapazona noteikšanas testā testējamā ķimikālija uzrāda vielai divfāzu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, arī visaptverošajā testēšanā ir jāapskata abas fāzes.

30. Sākuma koncentrāciju noteikšana visaptverošai antagonistu testēšanai ir detalizēti aprakstīta antagonistu protokolā (7). Īsumā, tiek izmantoti tālāk aprakstītie kritēriji.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē neviens punkts nav mazāks par E2 kontroles rezultātu vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošai testēšanai izmanto 11 punktu atšķaidījumu sēriju attiecībā 1:2, sākot ar maksimālo šķīstošo koncentrāciju.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē ir punkti, kas ir mazāki par E2 kontroles rezultātu vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošā testēšanā izmanto 11 secīgus atšķaidījumus, un sākuma koncentrācijai jābūt vienai no šādām:

• koncentrācija, kas diapazona noteikšanā dod zemāko koriģēto RLU vērtību;

• maksimālā šķīstošā koncentrācija (sk. 14-2. attēlu antagonistu protokolā (7));

• zemākā citotoksiskā koncentrācija (attiecīgu piemēru sk. 14-3. attēlā antagonistu protokolā (7)).

— 11 atšķaidījumu sērijas pamatā ir atšķaidījumi attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi tālāk aprakstītajiem kritērijiem.

11 punktu atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 jāizmanto, ja šādi iegūtais koncentrāciju diapazons ļauj novērot atbildreakciju pilnu diapazonu, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, kas iegūta diapazona noteikšanas testā. Pretējā gadījumā jāizmanto atšķaidījums attiecībā 1:5.

Visaptverošie testi

31. Visaptveroša testēšana sastāv no 11 punktu atšķaidījumu sērijas (atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi visaptverošas testēšanas kritēriju sākuma koncentrācijai), katru koncentrāciju testējot trīs replikāta iedobēs 96 iedobju platē (sk. 3. un 4. attēlu).

— *Agonistu* visaptverošā testēšanā par references standartu izmanto 11 E2 koncentrācijas divos atkārtojumos. Katrā platē ir četras replikāta iedobes DMSO kontrolei un četras replikāta iedobes metoksihlora kontrolei (9,06 x 10^{-6} M).

— *Antagonistu* visaptverošā testēšanā par references standartu izmanto deviņas Ral/E2 koncentrācijas (E2 ir konstants ar 9,18 × 10^{-11} M) divos atkārtojumos, četras replikāta iedobes domātas E2 9,18 x 10^{-11} M kontrolei, četras replikāta iedobes domātas DMSO kontrolēm un vēl četras —tamoksifēnam 3,36 x 10^{-6}M.

3. attēls.

Agonistu visaptveroša testa 96 iedobju plates izkārtojums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Saīsinājumi: no TC1-1 līdz TC1-11 =1. testējamās ķimikālijas koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-11 =2. testējamās ķimikālijas koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no E2-1 līdz E2-11 = E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); Meth = p,p' metoksihlora vāji pozitīvā kontrole; VC = DMSO (1 % tilpumkoncentrācija) EFM nesēja kontrole.

4. attēls.

Antagonistu visaptveroša testa 96 iedobju plates izkārtojums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Saīsinājumi: E2 = E2 kontrole; no Ral-1 līdz Ral-9 = raloksifena/E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); Tam = tamoksifēna/E2 vāji pozitīvā kontrole; no TC1-1 līdz TC1-11 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-11 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

Piezīme. Kā norādīts iepriekš, visās iedobēs, kas satur references standartu un testējamo ķimikāliju, E2 ir konstantā koncentrācijā ($9{,}18 \times 10^{-11}$M).

32. Lai nodrošinātu rezultātu neatkarību, visaptverošos testus ar to pašu ķimikāliju atkārto dažādās dienās. Jāveic vismaz divi visaptveroši testi. Ja testu rezultāti ir savstarpējā pretrunā (piem., viens tests ir pozitīvs, otrs negatīvs) vai ja viens tests ir neadekvāts, jāveic trešais papildu tests.

Luminiscences mērīšana

33. Luminiscenci mēra diapazonā no 300 līdz 650 nm ar inžekcijas luminometru un programmatūru, kas kontrolē inžekcijas tilpumu un mērījumu intervālu (7). Gaismas emisiju no katras iedobes izsaka kā RLU uz katru iedobi.

DATU ANALĪZE

EC_{50}/IC_{50} noteikšana

34. EC_{50} vērtību (puse no testējamās ķimikālijas maksimālās efektīvās koncentrācijas [agonisti]) un IC_{50} vērtību (puse no testējamās ķimikālijas maksimālās inhibējošās koncentrācijas [antagonisti]) nosaka, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas datiem. Testējamajām ķimikālijām, kas ir pozitīvas vienā vai vairākās koncentrācijās, testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas izraisa pusi no maksimālās atbildreakcijas (IC_{50} vai EC_{50}), aprēķina, izmantojot Hilla funkciju vai piemērotu alternatīvu. Hilla funkcija ir četru parametru logistisks matemātisks modelis, kas testējamās ķimikālijas koncentrāciju saista ar atbildreakciju (parasti pēc sigmoidālas līknes), izmantojot tālāk norādīto vienādojumu.

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

kur:

Y= atbildreakcija (t. i., RLU);

X= koncentrācijas logaritms;

Bāze= minimālā atbildreakcija;

Virsotne= maksimālā atbildreakcija;

lg EC_{50} (vai lg IC_{50})= X logaritms, kas atbilst atbildreakcijai, kura atrodas pa vidu starp bāzi un virsotni

Hilla virziena koeficients= līknes stāvums.

Ar šo modeli aprēķina rezultātus, kas ir vissaderīgākie ar vērtībām "Virsotne", "Bāze", "Hilla virziena koeficients", IC_{50} un EC_{50}. EC_{50} un IC_{50} vērtību aprēķināšanai jāizmanto atbilstoša statistiskā programmatūra (piem., Graphpad Prism^{R}).

Izlecošo vērtību noteikšana

35. Lai izdarītu kvalitatīvus statistiskus secinājumus, būtu lietderīgi veikt arī (bet ne tikai) Q-testu (sk. agonistu un antagonistu protokolus (7)), lai noteiktu "nederīgās" iedobes, kas izslēdzamas no datu analīzes.

36. Attiecībā uz E2 references standarta replikātiem (paraugā ir divas iedobes) jebkuru replikāta koriģēto RLU vērtību konkrētā E2 koncentrācijā uzskata par izlecošo vērtību, ja vēsturiskajā datubāzē tās vērtība par vairāk nekā 20 % atšķiras no koriģētās RLU vērtības šai koncentrācijai.

Luminometra datu apkopošana un koriģēšana diapazona noteikšanas testēšanai

37. Neapstrādātie dati no luminometra jāpārsūta uz testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Jānosaka, vai ir izlecošo vērtību datu punkti, kas jāizslēdz. (Analīzē noteiktos parametrus sk. sadaļā "Testa pieņemamības kritēriji".) Veic šādus aprēķinus.

Agonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO nesēja kontroles (VC) vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina testējamo ķimikāliju vidējo EC_{50} vērtību.

Antagonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (Ral/E2) vidējo vairākkāršo samazinājumu.

4. etaps. Aprēķina E2 references standarta vidējo vērtību.

5. etaps. Aprēķina testējamo ķimikāliju vidējo IC_{50} vērtību.

Luminometra datu apkopošana un koriģēšana visaptverošai testēšanai

38. Neapstrādātie dati no luminometra jāpārsūta uz testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Jānosaka, vai ir izlecošo vērtību datu punkti, kas jāizslēdz. (Analīzē noteiktos parametrus sk. sadaļā "Testa pieņemamības kritēriji".) Veic tālāk aprakstītos aprēķinus.

Agonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina E2 un testējamo ķimikāliju vidējo EC_{50} vērtību.

5. etaps. Aprēķina metoksihlora vidējo koriģēto RLU vērtību.

Antagonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (Ral/E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina Ral/E2 un testējamo ķimikāliju vidējo IC_{50} vērtību.

5. etaps. Aprēķina tamoksifēna vidējo koriģēto RLU vērtību.

6. etaps. Aprēķina E2 references standarta vidējo vērtību.

Datu interpretācijas kritēriji

39. VM7Luc ER TA tests ir viens no rīkiem, ko izmanto pierādījumu izsvēršanas pieejā un kas palīdz noteikt, kuras vielas ir prioritāri jātestē ED *in vivo* testos. Šajā prioritizēšanas procedūrā ietilpst testējamās ķimikālijas klasificēšana par pozitīvu vai negatīvu attiecībā uz ER agonistu vai antagonistu aktivitāti. VM7Luc ER TA testa validēšanas pētījumā izmantotie pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ir aprakstīti 1. tabulā.

1. tabula.

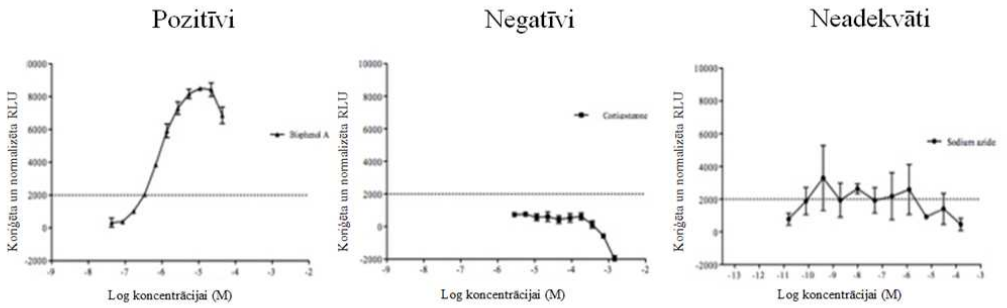
Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji

AGONISTU AKTIVITĀTE	
Pozitīvs	— Visas testējamās ķimikālijas, kas klasificētas kā pozitīvas attiecībā uz ER agonistu aktivitāti, ir ar šādu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni: bāzlīnija, pozitīvs slīpums un plato vai virsotne. Dažos gadījumos var būt definēti tikai divi no šiem raksturlielumiem (bāzlīnija –slīpums vai slīpums –virsotne). — Uz pozitīvā slīpuma līnijas ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas ar nepārklājas (vidējais ± SN). Bāzlīniju veidojošos punktus izslēdz, savukārt līknes lineārā daļa var ietvert virsotnes punktu vai plato pirmo punktu. — Lai ķimikāliju klasificētu par pozitīvu, atbildreakcijas amplitūdai (starpībai starp bāzlīniju un virsotni) — jābūt vismaz 20 % no references standarta E2 maksimālās vērtības (t. i., 2000 RLU vai vairāk, ja references standarta [E2] maksimālo atbildreakcijas vērtību koriģē uz 10 000 RLU). — Ja iespējams, EC_{50} vērtība jāaprēķina katrai pozitīvai testējamai ķimikālijai.
Negatīvs	Vidējā koriģētā RLU konkrētai koncentrācijai ir vienāda ar vai mazāka par DMSO kontroles RLU vidējo vērtību plus trīskārša DMSO RLU standartnovirze.
Neadekvāts	Datus, kurus nozīmīgu kvalitatīvu vai kvantitatīvu ierobežojumu dēļ uzskata par nederīgiem aktivitātes esības vai neesības pierādīšanai, uzskata par neadekvātiem, un tos nevar izmantot, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva. Tāpēc ķimikālijas jātestē atkārtoti.
ANTAGONISTU AKTIVITĀTE	
Pozitīvs	— No testējamās datiem iegūst šādu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni: bāzlīnija un negatīvs slīpums. — Uz negatīvā slīpuma līnijas ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas ar nepārklājas; bāzlīniju veidojošos punktus izslēdz, savukārt līknes lineārā daļa var ietvert plato pirmo punktu. — Aktivitātes samazinājumam jābūt vismaz 20 % no references standarta Ral/E2 maksimālās vērtības (t. i., 8 000 RLU vai mazāk, ja references standarta [Ral/E2] maksimālo atbildreakcijas vērtību koriģē uz 10 000 RLU). — Testējamās ķimikālijas augstākajai necitotoksiskajai koncentrācijai jābūt mazākai par vai vienādai ar 1×10^{-5} M. — Ja iespējams, IC_{50} vērtība jāaprēķina katrai pozitīvai testējamai ķimikālijai.
Negatīvs	Koncentrācijā, kas mazāka par $1{,}0 \times 10^{-5}$ M, visi datu punkti ir virs EC_{80} vērtības (80 % no E2 atbildreakcijas jeb 8 000 RLU).
Neadekvāts	Datus, kurus nozīmīgu kvalitatīvu vai kvantitatīvu ierobežojumu dēļ uzskata par nederīgiem aktivitātes esības vai neesības pierādīšanai, uzskata par neadekvātiem, un tos nevar izmantot, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva. Tāpēc ķimikālija jātestē atkārtoti.

40. Pozitīvos rezultātus raksturo gan ietekmes intensitāte, gan koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme, ja iespējams. Pozitīvu, negatīvu un neadekvātu rezultātu piemēri sniegti 5. un 6. attēlā.

5. attēls.

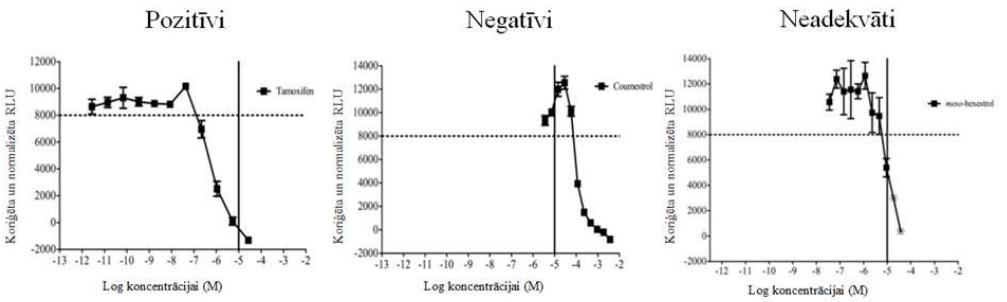
Agonisti: pozitīvi, negatīvi un neadekvāti rezultāti



Punktētā līnija norāda 20 % no E2 atbildreakcijas, resp. 2000 RLU (koriģētas un normalizēta vērtība).

6. attēls.

Antagonisti: pozitīvi, negatīvi un neadekvāti rezultāti



Punktētā līnija norāda 80 % no Ral/E2 atbildreakcijas, resp. 8 000 RLU (koriģētas un normalizēta vērtība).

Nepārtrauktā līnija atbilst 1,00 x 10^{-5} M. Lai atbildreakciju uzskatītu par pozitīvu, tai jābūt zem 8 000 RLU līnijas un koncentrācijā, kas mazāka par 1,00 x 10^{-5} M.

Ar zvaigznīti atzīmētās koncentrācijas mezoheksestrola grafikā norāda, ka dzīvotspējas rādītāji ir "2" vai lielāki.

Mezoheksestrola testa rezultātus uzskata par neadekvātiem, jo vienīgā atbildreakcija, kas ir mazāka par 8 000 RLU, ir koncentrācijā 1,00 x 10^{-5} M.

41. EC_{50} un IC_{50} var aprēķināt, izmantojot četru parametru Hilla funkciju (papildinformāciju sk. agonistu protokolā un antagonistu protokolā (7)). Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji, tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu duplicēšana (sk. 19. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI").

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

42. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

LITERATŪRA

(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): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10): 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.

4. Papildinājums

STABILI TRANSFICĒTU CILVĒKA ESTROGĒNA A RECEPTORU TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS ĶIMIKĀLIJU ESTROGĒNISKAS AGONISTU UN ANTAGONISTU AKTIVITĀTES NOTEIKŠANAI, IZMANTOJOT ERA CALUX ŠŪNU LĪNIJU

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. ERα CALUX transaktivācijas testā izmanto cilvēka U2OS šūnu līniju, lai noteiktu estrogēnu agonistu un antagonistu aktivitāti, ko mediē cilvēka estrogēna alfa receptors (hERα). Stabili transficētu ERα CALUX biotesta, ko piedāvā BioDetection Systems BV (Amsterdama, Nīderlande), validēšanas pētījumā pierādīja testa relevantumu un ticamību paredzētajam nolūkam (1). ERα CALUX šūnu līnija ekspresē tikai stabili transficētus cilvēka ERα (2) (3).

2. Šis tests ir īpaši paredzēts hERα mediētas transaktivācijas noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot bioluminiscenci. Augstās signāla un trokšņa attiecības dēļ bioluminiscenci plaši izmanto biotestos (4).

3. Novērots, ka fitoestrogēni koncentrācijā, kas ir lielāka par 1 μM, pārmērīgi aktivē luciferāzes reportiergēnu, tā izraisot receptoru nemediētu luminiscenci (5) (6) (7). Tāpēc stabili transficētu ER transaktivācijas testos rūpīgi jāpārbauda fitoestrogēnu vai citu līdzīgu savienojumu, kas var pārmērīgi aktivēt luciferāzes ekspresiju, augstākas koncentrācijas (sk. 2. papildinājumu).

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļa "VISPĀRĪGAIS IEVADS" un "ER TA TESTA KOMPONENTI". Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. Biotestu izmanto, lai novērtētu ER ligandu saistīšanos un receptoru–ligandu kompleksa sekojošu translokāciju uz kodolu. Kodolā receptoru–ligandu komplekss saista īpašus DNS atbildreakcijas elementus un transaktivē jāņtārpiņu luciferāzes reportiergēnu, kā rezultātā palielinās luciferāzes fermenta šūnu ekspresija. Pēc luciferāzes substrāta luciferīna pievienošanas luciferīns pārvēršas par bioluminiscējošu produktu. Radīto gaismu var viegli uztvert un kvantitatīvi noteikt ar luminometru.

6. Testa sistēmā izmanto stabili transficētu ERα CALUX šūnas. ERα CALUX šūnas izveidotas no cilvēka osteoblastiskas osteosarkomas U2OS šūnu līnijas. Cilvēka U2OS šūnas stabili transficēja ar 3xHRE-TATA-Luc un pSG5-neo-hERα, izmantojot kalcija fosfāta līdznogulsnēšanās metodi. U2OS šūnu līnija tika izvēlēta kā labākais variants, ko izmantot kā reportieršūnu līniju, kas reaģē uz estrogēnu (un citiem steroīdajiem hormoniem), un tā pamatā ir novērojums, ka U2OS šūnu līnijā endogēnisko receptoru aktivitāte bija neliela vai tās nebija vispār. Endogēnisko receptoru neesamību novērtēja tikai ar luciferāzes reportierplazmīdām, un pēc receptoru ligandu pievienošanas netika konstatēta nekāda aktivitāte. Turklāt pēc radniecīgu receptoru pagaidu pievienošanas šī šūnu līnija uzturēja spēcīgas hormonu mediētas atbildreakcijas (2) (3) (8).

7. Ķimikāliju testēšanā ar ERα CALUX šūnu līniju, lai noteiktu estrogēnisku vai antiestrogēnisku aktivitāti, ietilpst priekšskrīnings un visaptveroši testi. Priekšskrīninga laikā visaptverošās testēšanas vajadzībām nosaka testējamo ķimikāliju šķīdību, citotoksicitāti un precīzāku koncentrāciju diapazonu. Visaptverošajos testos testējamo ķimikāliju precīzāko koncentrāciju diapazonu testē ERα CALUX biotestos, un pēc tam testējamās ķimikālijas klasificē pēc agonisma vai antagonisma.

8. Datu interpretācijas kritēriji ir detalizēti aprakstīti 59. punktā. Īsumā, testējamo ķimikāliju uzskata par pozitīvu attiecībā uz agonismu, ja vismaz divu secīgu testējamās ķimikālijas koncentrāciju atbildreakcija ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no references standarta (17β-estradiola) maksimālās atbildreakcijas (PC_{10}). Testējamo ķimikāliju uzskata par pozitīvu attiecībā uz antagonismu, ja vismaz divu secīgu testējamās ķimikālijas koncentrāciju atbildreakcija ir vienāda ar vai mazāka par 80 % no references standarta (tamoksifēna) maksimālās atbildreakcijas (PC_{80}).

PROCEDŪRA

Šūnu līnija

9. Testam jāizmanto stabili transficēta U2OS ERα CALUX šūnu līnija. Šūnu līniju var iegādāties ar tehniskās licences līgumu no BioDetection Systems BV, Amsterdama, Nīderlande.

10. Drīkst izmantot tikai šūnu kultūras bez mikoplazmas. Jābūt apliecinājumam, ka izmantojamajās šūnu partijās nav mikoplazmas piesārņojuma, vai arī pirms lietošanas jāveic mikoplazmas tests. Precīzai mikoplazmas infekcijas noteikšanai jāizmanto RT-PCR (polimerāzes ķēdes reakcija reāllaikā) (9).

Šūnu līnijas stabilitāte

11. Lai saglabātu CALUX šūnu stabilitāti un integritāti, šūnas jāglabā šķidrajā slāpeklī (–80^{0}C). Pēc šūnu atkausēšanas jaunas kultūras aizsākšanai šūnas jāsubkultivē vismaz divreiz, tikai pēc tam tās drīkst izmantot ķimikāliju estrogēniskas agonistu un antagonistu aktivitātes novērtēšanai. Šūnas nedrīkst subkultivēt vairāk nekā 30 pasāžās.

12. Lai kontrolētu šūnu līnijas stabilitāti laika gaitā, agonistu un antagonistu testa sistēmas reaģētspēju verificē, novērtējot references standarta EC_{50} vai IC_{50}. Tāpat jākontrolē arī pozitīvās kontroles parauga (PC) un negatīvās kontroles parauga (NC) relatīvā indukcija. Rezultātiem jāatbilst agonistu (3.C tabula) vai antagonistu ERα CALUX biotesta (4.C tabula) pieņemamības kritērijiem. References standarti, pozitīvās un negatīvās kontroles ir norādītas 1. tabulā (agonisms) un 2. tabulā (antagonisms).

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

13. U2OS šūnas jākultivē barotnē (DMEM/F12 (1:1) barotne ar fenolsarkano kā pH indikatoru, kam pievienots liellopu embriju serums (7,5 %), aizvietojamās aminoskābes (1 %), 10 vienības/ml penicilīna, streptomicīna un geneticīna (G-418) kā atlases marķieris). Šūnas jāievieto CO_2 inkubatorā (5 % CO_2) 370C temperatūrā un 100 % mitrumā. Kad šūnas sasniedz 85–95 % konfluenci, tās jāsubkultivē vai jāsagatavo uzsēšanai 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs. Ja šūnas gatavo uzsēšanai, tās atkārtoti jāsuspendē 1 x 105 šūnas/ml bezestrogēna testa barotnē (DMEM/F12 (1:1) barotne bez fenolsarkanā, kam pievienots liellopu embriju serums (5 % tilpumkoncentrācija), kas apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli, aizvietojamās aminoskābes (1 % tilpumkoncentrācija), 10 vienības/ml penicilīna un streptomicīna) un jāuzsēj 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (100 µl homogenizētas šūnu suspensijas). Pirms ekspozīcijas šūnas 24 stundas vispirms jāinkubē CO_2 inkubatorā (5 % CO_2, 37 ^{0}C, 100 % mitrums). Plastmasas izstrādājumi nedrīkst saturēt estrogēnu.

Pieņemamības kritēriji

14. Testējamās(-o) ķimikālijas(-u) agonistisko un antagonistisko aktivitāti testē testu sērijā. Testu sērijā ietilpst ne vairāk kā 6 mikrotitrēšanas plates. Katrā testu sērijā ietilpst references standarta, pozitīvās kontroles parauga, negatīvās kontroles parauga un šķīdinātāja kontroļu vismaz 1 pilna atšķaidījumu sērija. 1. un 2. attēlā parādīta plašu sagatavošana agonistu un antagonistu testu sērijai.

15. Katrs references standartu, testējamo ķimikāliju, visu šķīdinātāja kontroļu un pozitīvo un negatīvo kontroļu atšķaidījums jāanalizē trīs atkārtojumos. Katras trīs atkārtojumos veiktās analīzes rezultātiem jāatbilst 3.A un 4.A tabulā norādītajām prasībām.

16. References standarta (17β-estradiols agonisma noteikšanai; tamoksifēns antagonisma noteikšanai) pilnu atšķaidījumu sēriju mēra katras testu sērijas pirmajā platē. Lai atlikušo 5 mikrotitrēšanas plašu analīzes rezultātus varētu salīdzināt ar pirmās mikrotitrēšanas plates rezultātiem, kas satur references standarta pilnu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, visās platēs jābūt 3 kontroles paraugiem: šķīdinātāja kontrolei, testētajam references standartam visaugstākajā koncentrācijā un references standarta aptuvenās EC_{50} (agonisms) vai IC_{50} (antagonisms) koncentrācijas. Vidējo kontroles paraugu attiecībai pirmajā platē un pārējās 5 platēs jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

17. Katrai mikrotitrēšanas platei testu sērijā aprēķina z faktoru (10). Z faktors jāaprēķina pēc atbildreakcijām pie references standarta augstākajām un zemākajām koncentrācijām. Mikrotitrēšanas plati uzskata par derīgu, ja tā atbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

18. References standarta devas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai. EC_{50} vai IC_{50}, kas iegūta references standarta atšķaidījumu sērijā, ir jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

19. Katrā testu sērijā jābūt pozitīvās kontroles un negatīvās kontroles paraugam. Relatīvajai indukcijai, kas aprēķināta, pamatojoties uz pozitīvās kontroles paraugu un negatīvās kontroles paraugu, jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

20. Visā mērījumu laikā jānosaka, kāds ir references standarta augstākās koncentrācijas indukcijas koeficients, proti, vidējo augstāko 17β-estradiola references standarta relatīvās gaismas vienības (RLU) atbildreakciju dala ar vidējo references šķīdinātāja kontroles RLU atbildreakciju. Šim indukcijas koeficientam jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām minimālajām prasībām par vairākkāršo indukciju.

21. Tikai tās mikrotitrēšanas plates, kas atbilst visiem iepriekš minētajiem apstiprināšanas kritērijiem, uzskatāmas par derīgām un izmantojamas testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai.

22. Pieņemamības kritērijus piemēro gan priekšskrīningam, gan visaptverošiem testiem.

1. tabula.

References standarta, pozitīvās kontroles (PC) un negatīvās kontroles (NC) koncentrācijas agonistu CALUX biotestam

	Viela	*CAS* reģ. nr.	Testa diapazons (M)
References standarts	17β-estradiols	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Pozitīvā kontrole (PC)	17α-metiltestosterons	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negatīvā kontrole (NC)	kortikosterons	50-22-6	$1*10^{-8}$

2. tabula.

References standarta, pozitīvās kontroles (PC) un negatīvās kontroles (NC) koncentrācijas antagonistu CALUX biotestam

	Viela	*CAS* reģ. nr.	Testa diapazons (M)
References standarts	tamoksifēns	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Pozitīvā kontrole (PC)	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negatīvā kontrole (NC)	resveratrols	501-36-0	$1{,}0*10^{-5}$

3. tabula.

Pieņemamības kritēriji agonistu ERα CALUX biotestam

A — atsevišķi paraugi platē		**Kritērijs**
1	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (NC, PC, katram testējamās ķimikālijas un references standarta atšķaidījumam, izņemot C0)	< 15 %
2	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (references standartam un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrolēm (C0, SC))	< 30 %
3	LDH maksimālā noplūde kā citotoksicitātes mērījums	< 120 %
B — vienā mikrotitrēšanas platē		
4	Attiecība starp references standarta šķīdinātāja kontroli (C0; 1. plate) un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroli (SC; 2.–x. plate)	no 0,5 līdz 2,0
5	Attiecība starp apt. EC_{50} un references standarta augstāko koncentrāciju 1. platē un apt. EC_{50} un references standarta augstāko koncentrāciju 2.–x. platē (C4, C8)	no 0,70 līdz 1,30
6	Z faktors katrai platei	>0,6
C — analīžu vienā sērijā (visas plates vienā sērijā)		
7	References standarta sigmoidāla līkne	Jā (17ß-estradiols)
8	References standarta (17ß-estradiols) EC_{50} diapazons	$4 * 10^{-12}$–$4 * 10^{-11}$ M
9	Augstākās 17ß-estradiola koncentrācijas minimālā vairākkāršā indukcija attiecībā uz references standarta šķīdinātāja kontroli	5
10	Relatīvā indukcija (%) PC	> 30 %
11	Relatīvā indukcija (%) NC	<10 %

Apt.: aptuveni; PC: pozitīvā kontrole; NC: negatīvā kontrole; SC: testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole; C0: references standarta šķīdinātāja kontrole; SD: standartnovirze LDH: laktātdehidrogenāze.

4. tabula.

Pieņemamības kritēriji antagonistu ERα CALUX biotestam

A — atsevišķi paraugi platē		**Kritērijs**
1	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (NC, PC, katram testējamās ķimikālijas un references standarta atšķaidījumam, šķīdinātāja kontrolei (C0))	< 15 %
2	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (nesēja kontrolei (VC) un references standarta augstākajai koncentrācijai (C8))	< 30 %
3	LDH maksimālā noplūde kā citotoksicitātes mērījums	< 120 %
B — vienā mikrotitrēšanas platē		
4	Attiecība starp references standarta šķīdinātāja kontroli (C0; 1. plate) un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroli (SC; 2.–x. plate)	no 0,70 līdz 1,30
5	Attiecība starp apt. IC_{50} references standarta koncentrāciju 1. platē un apt. IC_{50} references standarta koncentrāciju 2.–x. platē (C4)	no 0,70 līdz 1,30
6	Attiecība starp references standarta augstāko koncentrāciju 1. platē un references standarta augstāko koncentrāciju 2.–x. platē (C8)	no 0,50 līdz 2,0
7	Z faktors katrai platei	>0,6
C — analīžu vienā sērijā (visas plates vienā sērijā)		
8	References standarta sigmoidāla līkne	Jā (tamoksifēns)
9	References standarta (tamoksifēns) IC_{50} diapazons	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	References standarta šķīdinātāja kontroles minimālā vairākkāršā indukcija attiecībā uz tamoksifēna augstāko koncentrāciju	2,5
11	Relatīvā indukcija (%) PC	<70 %
12	Relatīvā indukcija (%) NC	>85 %

Apt.: aptuveni; PC: pozitīvā kontrole; NC: negatīvā kontrole; VC: nesēja kontrole (šķīdinātāja kontrole bez agonistu references standarta konstantas koncentrācijas); SC: testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole; C0: references standarta šķīdinātāja kontrole; SD: standartnovirze LDH: laktātdehidrogenāze.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole, references standarti, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles

23. Gan priekšskrīningā, gan visaptverošā testā jāizmanto viena un tā pati šķīdinātāja/nesēja kontrole, references standarti, pozitīvās kontroles un negatīvās kontroles. Arī references standartu, pozitīvo kontroļu un negatīvo kontroļu koncentrācijai jābūt tādai pašai.

Šķīdinātāja kontrole

24. Šķīdinātāju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā šķīdinātāja kontroli. ERα CALUX biotesta validēšanai kā nesēju izmantoja dimetilsulfoksīdu (DMSO, 1 % (tilpumkoncentrācija); CAS Nr. 67-68-5). Ja izmanto citu šķīdinātāju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas jātestē tajā pašā nesējā. Jāievēro, ka šķīdinātāja kontrole antagonistu pētījumiem satur noteiktas koncentrācijas agonistu references standartu 17β-estradiolu (aptuveni EC_{50} koncentrācija). Lai testētu antagonistu pētījumiem izmantojamo šķīdinātāju, jāsagatavo un jātestē nesēja kontrole.

Nesēja kontrole (antagonisms)

25. Lai testētu antagonismu, testa barotnei pievieno agonistu references standartu (17β-estradiolu) konstantā koncentrācijā (aptuveni EC_{50} koncentrācija). Lai noteiktu testējamo ķimikāliju izšķīdināšanai izmantojamā šķīdinātāja antagonismu, jāsagatavo testa barotne, kas nesatur agonistu references standartu (17β-estradiola) konstantā koncentrācijā. Šis kontroles paraugs paredzēts kā nesēja kontrole. Dimetilsulfoksīds (DMSO, 1 % (tilp./tilp.); ERα CALUX biotesta validēšanai kā nesēju izmantoja dimetilsulfoksīdu (DMSO, 1 % (tilpumkoncentrācija); CAS Nr. 67-68-5). Ja izmanto citu šķīdinātāju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas jātestē tajā pašā nesējā.

Izmantojamie standarti

26. Agonistu references standarts ir 17β-estradiols (1. tabula). References standarts nozīmē 17β-estradiola astoņu koncentrāciju atšķaidījumu sēriju ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Antagonistu references standarts ir tamoksifēns (2. tabula). References standarts nozīmē tamoksifēna astoņu koncentrāciju atšķaidījumu sēriju ($3*10^{-09}$, $1*10^{-08}$, $3*10^{-08}$, $1*10^{-07}$, $3*10^{-07}$, $1*10^{-06}$, $3*10^{-06}$, $1*10^{-05}$ M). Antagonistu references standarta katru koncentrāciju inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M).

Pozitīvā kontrole

28. Pozitīvā kontrole agonistu pētījumiem ir 17α-metiltestosterons (1. tabula).

29. Pozitīvā kontrole antagonistu pētījumiem ir 4-hidroksitamoksifēns (2. tabula). Antagonistu pozitīvo kontroli inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M).

Negatīvā kontrole

30. Negatīvā kontrole agonistu pētījumiem ir kortikosterons (1. tabula).

31. Negatīvā kontrole antagonistu pētījumiem ir resveratrols (2. tabula). Antagonistu negatīvo kontroli inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M).

Laboratorijas kompetences pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu šīs testēšanas metodes sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI")

Nesējs

32. Testējamo ķimikāliju izšķīdināšanai izmantojamajam šķīdinātājam pilnībā jāizšķīdina testējamā ķimikālija, un tam jābūt sajaucamam ar šūnu barotni. Piemēroti šķīdinātāji ir DMSO, ūdens un etanols (tīrība no 95 % līdz 100 %). Ja kā šķīdinātāju izmanto DMSO, inkubēšanas laikā DMSO maksimālā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 % (tilpumkoncentrācija). Pirms lietošanas jāpārbauda, vai šķīdinātājs nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu.

References standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķimikāliju sagatavošana

33. References standartus, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un testējamās ķimikālijas izšķīdina 100 % DMSO (vai piemērotā šķīdinātājā). Pēc tam tajā pašā šķīdinātājā sagatavo attiecīgus (sērijveida) atšķaidījumus. Pirms izšķīdināšanas jānogaida, līdz visas vielas sasilst līdz istabas temperatūrai. Svaigi sagatavotos references standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķimikāliju izejšķīdumos nedrīkst būt redzamas nogulsnes vai duļķes. References standartu un kontroļu izejšķīdumus var sagatavot lielā apjomā. Pirms katra eksperimenta jāsagatavo svaigi testējamo ķimikāliju izejšķīdumi. References standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķimikāliju galīgie atšķaidījumi katram eksperimentam jāsagatavo svaigi un jāizmanto 24 stundās pēc sagatavošanas.

Šķīdība, citotoksicitāte un diapazona noteikšana

34. Priekšskrīningā nosaka testējamo ķimikāliju šķīdību izvēlētajā šķīdinātājā. Sagatavo izejšķīdumu ar maksimālo koncentrāciju 0,1 M. Ja šādā koncentrācijā ir šķīdības problēmas, jāsagatavo mazākas koncentrācijas izejšķīdumi, līdz testējamās ķimikālijas izšķīst pilnībā. Priekšskrīningā testē testējamo ķimikāliju 1:10 sērijveida atšķaidījumus. Agonistu vai antagonistu testēšanā maksimālā testa koncentrācija ir 1 mM. Pēc priekšskrīninga iegūst precīzāku testējamo ķimikāliju koncentrāciju diapazonu, kas jātestē visaptverošajā testā. Visaptverošā testēšanā izmantojamajiem atšķaidījumiem jābūt 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x un 3 000x.

35. Agonistu un antagonistu testu protokolos ir ietverta citotoksicitātes testēšana (11). Citotoksicitātes testēšana ir iekļauta gan priekšskrīningā, gan visaptverošajā testā. ERα CALUX biotesta validēšanas laikā citotoksicitātes novērtēšanai izmantotā metode bija laktātdehidrogenāzes (LDH) noplūdes tests kombinācijā ar šūnu kvalitatīvu vizuālu pārbaudi (sk. 4.1. papildinājumu) pēc eksponēšanas testējamām ķimikālijām. Tomēr citotoksicitātes noteikšanai var izmantot citas kvantitatīvas metodes (piem., uz tetrazolu balstītu kolorimetrisko (MTT) testu vai citotoksicitātes CALUX biotestu). Parasti testējamo ķimikāliju koncentrācijas, pie kādām šūnu dzīvotspēja samazinās par vairāk nekā 20 %, uzskatāmas par citotoksiskām, tāpēc tās nav izmantojamas datu novērtēšanai. Attiecībā uz LDH noplūdes testu testējamās ķimikālijas koncentrācija uzskatāma par citotoksisku, ja LDH noplūdes procents ir lielāks par 120 %.

Eksponēšana testējamai ķimikālijai un izkārtojums testa platē

36. Pēc saplūdušu kultivētu šūnu kolbas tripsinizācijas šūnas atkārtoti suspendē 1 x 10^5 šūnas/ml bezestrogēna testa barotnē. Simts µl atkārtoti suspendētu šūnu uzsēj 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iekšējās iedobēs. Ārējās iedobēs iepilda 200 µl fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma (PBS) (sk. 1. un 2. attēlu). Uzsētās šūnas 24 stundas vispirms inkubē CO_2 inkubatorā (5 % CO_2, 37 °C, 100 % mitrums).

37. Pēc preinkubācijas plates vizuāli pārbauda, lai noteiktu citotoksicitāti (sk. 4.1. papildinājumu), kontamināciju un konfluenci. Testēšanai izmanto tikai tās plates, kurās nav redzamas citotoksicitātes un kontaminācijas un ir vismaz 85 % konfluences. No iekšējām iedobēm uzmanīgi izvada barotni, ko aizstāj ar 200 µl bezestrogēna testa barotnes, kas satur references standartu, testējamo ķimikāliju, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un šķīdinātāja kontroļu

attiecīgo atšķaidījumu sēriju (5. tabula: agonistu pētījumi; 6. tabula: antagonistu pētījumi). Visus references standartus, testējamās ķimikālijas, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un šķīdinātāja kontroles testē trīs atkārtojumos. 1. attēlā redzams plates izkārtojums agonistu testēšanai. 2. attēlā redzams plates izkārtojums antagonistu testēšanai. Plates izkārtojums priekšskrīningā un visaptverošajā testēšanā ir vienāds. Antagonistu testēšanā visās iekšējās iedobēs, izņemot nesēja kontroles (VC) iedobes, ir arī agonistu references standarts (17β-estradiols) konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M). Jāievēro, ka katrā TC platē jāpievieno references standarti C8 un C4.

38. Pēc šūnu eksponēšanas visām ķimikālijām 96 iedobju mikrotitrēšanas plates jāinkubē vēl 24 stundas CO_2 inkubatorā (5 % CO_2, 37 °C, 100 % mitrums).

1. attēls.

Izkārtojums 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā

1. plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Nākamās plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = references standartšķīdinātājs.

C(1-8) = references standarta atšķaidījumu sērija (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai).

PC = pozitīvā kontrole.

NC: = negatīvā kontrole.

TCx-(1–8) = testējamās ķimikālijas atšķaidījumi (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai), ko izmanto testējamās ķimikālijas priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā.

SC = testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole (optimāli tas pats šķīdinātājs, kas ir C0, taču, iespējams, no citas partijas).

Pelēkās šūnas: = ārējās iedobes, kurās iepilda 200 µl PBS.

2. attēls.

Izkārtojums 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs priekšskrīningā un antagonistiskās iedarbības novērtēšanā

1. plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Nākamās plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = references standartšķīdinātājs.

C(1-8) = references standarta atšķaidījumu sērija (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai).

NC: = negatīvā kontrole.

PC = pozitīvā kontrole.

TCx-(1–8) = testējamās ķimikālijas atšķaidījumi (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai), ko izmanto testējamās ķimikālijas priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā.

SC = testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole (optimāli tas pats šķīdinātājs, kas ir C0, taču, iespējams, no citas partijas).

VC = nesēja kontrole (šķīdinātāja kontrole bez agonistu references standarta (17β-estradiola) konstantā koncentrācijā.

Pelēkās šūnas: = ārējās iedobes, kurās iepilda 200 µl PBS.

Piezīme. Visās iekšējās iedobēs, izņemot nesēja kontroles (VC) iedobes, ir arī agonistu references standarts (17β-estradiols) konstantā koncentrācijā ($3{,}0 * 10^{-12}$ M).

Luminiscences mērīšana

39. Luminiscences mērīšana ir detalizēti aprakstīta agonistu un antagonistu testu protokolā (10). Barotne no iedobēm jāizvada, bet šūnas pēc 24 stundu inkubēšanas jālizē, lai atvērtu šūnas membrānu un varētu izmērīt luciferāzes aktivitāti.

40. Luminiscences izmērīšanai šajā procedūrā nepieciešams luminometrs ar 2 inžektoriem. Luciferāzes reakciju sāk, inžektējot substrāta luciferīnu. Reakciju pārtrauc, pievienojot 0,2 M NaOH. Reakciju pārtrauc, lai nepieļautu luminiscences pārnešanu no vienas iedobes citā.

41. No katras iedobes izstaroto gaismu izsaka kā relatīvās gaismas vienības (RLU) uz katru iedobi.

Priekšskrīnings

42. Priekšskrīninga analīzes rezultātus izmanto, lai noteiktu visaptverošajā testēšanā testējamo ķimikāliju precīzāku koncentrāciju diapazonu. Priekšskrīninga analīzes rezultātu novērtēšana un visaptverošajā testēšanā testējamo ķimikāliju precīzāka koncentrāciju diapazona noteikšana ir detalizēti aprakstīta agonistu un antagonistu testu protokolā (10). Šeit ir sniegts īss kopsavilkums par testējamo ķimikāliju precīzāka koncentrāciju diapazona noteikšanu agonistu un antagonistu testēšanā. Norādījumus par sērijveida atšķaidījumiem sk. 5. un 6. tabulā.

Koncentrāciju izvēle agonistiskās iedarbības novērtēšanai

43. Priekšskrīningā testējamās ķimikālijas jātestē, izmantojot 5. tabulā (agonisms) un 6. tabulā (antagonisms) norādītās atšķaidījumu sērijas. Visas koncentrācijas jātestē trīs atkārtojumu iedobēs atbilstoši 1. attēlā (agonisms) vai 2. attēlā (antagonisms) norādītajam plašu izkārtojumam.

44. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (3. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

45. Testējamo ķimikāliju sākotnējie koncentrāciju diapazoni jākoriģē un priekšskrīnings jāatkārto, ja:

— novēro citotoksicitāti. Priekšskrīninga procedūra jāatkārto ar testējamās ķimikālijas mazākām, necitotoksiskām koncentrācijām;

— testējamās ķimikālijas priekšskrīningā neiegūst pilnu devas–atbildreakcijas līkni, jo testētās koncentrācijas rada maksimālu indukciju. Priekšskrīnings jāatkārto ar mazākām testējamās ķimikālijas koncentrācijām.

46. Ja novēro derīgu, no devas atkarīgu atbildreakciju, jāizvēlas (mazākā) koncentrācija, kādā novēro maksimālo indukciju un nenovēro citotoksicitāti. Testējamās ķimikālijas augstākajai koncentrācijai, kas jātestē visaptverošajā testā, jābūt 3 reizes lielākai par šo izvēlēto koncentrāciju.

47. Testējamās ķimikālijas visa precīzāku atšķaidījumu sērija jāsagatavo atbilstoši 5. tabulā norādītajiem atšķaidīšanas etapiem, sākot ar minēto augstāko koncentrāciju.

48. Testējamā ķimikālija, kas neizraisa nekādu agonistisku iedarbību, jātestē visaptverošajos testos, sākot ar augstāko necitotoksisko koncentrāciju, kas konstatēta priekšskrīningā.

Koncentrāciju izvēle antagonistiskās iedarbības novērtēšanai

49. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (4. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

50. Testējamo ķimikāliju sākotnējie koncentrāciju diapazoni jākoriģē un priekšskrīnings jāatkārto, ja:

— novēro citotoksicitāti. Priekšskrīninga procedūra jāatkārto ar testējamās ķimikālijas mazākām, necitotoksiskām koncentrācijām;

— testējamās ķimikālijas priekšskrīningā neiegūst pilnu devas–atbildreakcijas līkni, jo testētās koncentrācijas rada maksimālu inhibīciju. Priekšskrīnings jāatkārto ar mazākām testējamās ķimikālijas koncentrācijām.

51. Ja novēro derīgu, no devas atkarīgu atbildreakciju, jāizvēlas (mazākā) koncentrācija, kādā novēro maksimālo inhibīciju un nenovēro citotoksicitāti. Testējamās ķimikālijas augstākajai koncentrācijai, kas jātestē visaptverošajā testā, jābūt 3 reizes lielākai par šo izvēlēto koncentrāciju.

52. Testējamās ķimikālijas visa precīzāku atšķaidījumu sērija jāsagatavo atbilstoši 6. tabulā norādītajiem atšķaidīšanas etapiem, sākot ar minēto augstāko koncentrāciju.

53. Testējamā ķimikālija, kas neizraisa nekādu antagonistisku iedarbību, jātestē visaptverošajos testos, sākot ar augstāko necitotoksisko koncentrāciju, kas konstatēta priekšskrīningā..

Visaptverošie testi

54. Kad noteikts precīzākais koncentrāciju diapazons, testējamās ķimikālijas jātestē visaptverošajā testā, izmantojot 5. tabulā (agonisms) un 6. tabulā (antagonisms) norādītās atšķaidījumu sērijas. Visas koncentrācijas jātestē trīs atkārtojumu iedobēs atbilstoši 1. attēlā (agonisms) vai 2. attēlā (antagonisms) norādītajam plašu izkārtojumam.

55. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (3.un 4. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

5. tabula.

References standartu, kontroļu un testējamo ķimikāliju koncentrācija un atšķaidījumi, ko izmanto agonistu testēšanā

References standarts 17β-estradiols		TCx — priekšskrīnings		TCx — visaptverošais tests		Kontroles	
konc. (M)		atšķaidījums		atšķaidījums		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 00-0 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC:	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx —testējamā ķimikālija x.
PC —pozitīvā kontrole (17α-metiltestosterons).
NC —negatīvā kontrole (kortikosterons).
C0 —references standarta šķīdinātāja kontrole
SC —testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole

6. tabula.

References standartu, kontroļu un testējamo ķimikāliju koncentrācija un atšķaidījumi, ko izmanto antagonistu testēšanā

References standarts tamoksifēns		TCx — priekšskrīnings		TCx — visaptverošais tests		Kontroles	
konc. (M)		atšķaidījums		atšķaidījums		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 00-0 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC:	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Pievienotais agonists**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiols	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx —testējamā ķimikālija x.
PC —pozitīvā kontrole (4-hidroksitamoksifēns)
NC —negatīvā kontrole (resveratrols).
C0 —references standarta šķīdinātāja kontrole
SC —testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole
VC —nesēja kontrole (nesatur agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M)

Datu apkopošana un datu analīze

56. Agonistu testēšana: [pēc priekšskrīninga un visaptverošajiem testiem nosaka testējamās ķimikālijas EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} un maksimālo indukciju (TCx_{max}). Antagonistu testēšana: aprēķina IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} un minimālo indukciju (TCx_{min}). 3. attēlā (agonisms) un 4. attēlā (antagonisms) šie parametri attēloti grafiski. Nepieciešamos parametrus aprēķina, pamatojoties uz katras testējamās ķimikālijas relatīvo indukciju (attiecībā pret references standarta maksimālo indukciju (= 100 %)). Datu novērtēšanai jāizmanto nelineārā regresija (mainīgs slīpums, 4 parametri) atbilstoši šim vienādojumam:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

kur:

X = devas vai koncentrācijas logaritms;

Y = atbildreakcija (relatīvā indukcija (%));

Virsotne = maksimālā indukcija (%)

Bāze = minimālā indukcija (%);

$LogEC_{50}$ = koncentrācijas, pie kuras novēro 50 % no maksimālās atbildreakcijas, logaritms

Hilla virziena koeficients = Virziena koeficients vai Hilla virziena koeficients.

57. Neapstrādātie dati no luminometra, kas izteikti kā relatīvās gaismas vienības (RLU), jāpārsūta uz priekšskrīningam un visaptverošajam testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Neapstrādātajiem datiem jāatbilst 3.A un 3.B tabulā (agonisms) vai 4.A un 4.B tabulā (antagonisms) norādītajiem pieņemamības kritērijiem. Ja neapstrādātie dati atbilst pieņemamības kritērijiem, nepieciešamo parametru noteikšanai veic tālāk aprakstītos aprēķinus.

Agonisms

— References standarta šķīdinātāja kontroles vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par references standartiem.

— Testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroles vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem datiem par testējamo ķimikāliju.

— Aprēķina references standarta katras koncentrācijas relatīvo indukciju. References standarta augstākās koncentrācijas indukcija ir 100 %.

— Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrācijas relatīvo indukciju salīdzinājumā ar references standarta augstāko koncentrāciju 100 %.

— Pēc nelineārās regresijas (mainīgs slīpums, 4 parametri) novērtē analīzes rezultātus.

— Nosaka references standarta EC_{50} un EC_{10}.

— Nosaka testējamo ķimikāliju EC_{50} un EC_{10}.

— Nosaka testējamās ķimikālijas maksimālo relatīvo indukciju (TC_{max}).

— Nosaka testējamo ķimikāliju PC_{10} un PC_{50}.

Testējamām ķimikālijām ne vienmēr var iegūt pilnu devas–atbildreakcijas līkni, piem., citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ. Tad nav iespējams noteikt arī EC_{50}, EC_{10} un PC_{50}. Tādos gadījumos iespējams noteikt tikai PC_{10} un TC_{max}.

Antagonisms

— References standarta augstākās koncentrācijas vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par references standartiem.

— References standarta augstākās koncentrācijas vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par testējamām ķimikālijām.

— Aprēķina references standarta katras koncentrācijas relatīvo indukciju. References standarta zemākās koncentrācijas indukcija ir 100 %.

— Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrācijas relatīvo indukciju salīdzinājumā ar references standarta zemāko koncentrāciju 100 %.

— Pēc nelineārās regresijas (mainīgs slīpums, 4 parametri) novērtē analīzes rezultātus.

— Nosaka references standarta IC_{50} un IC_{20}.

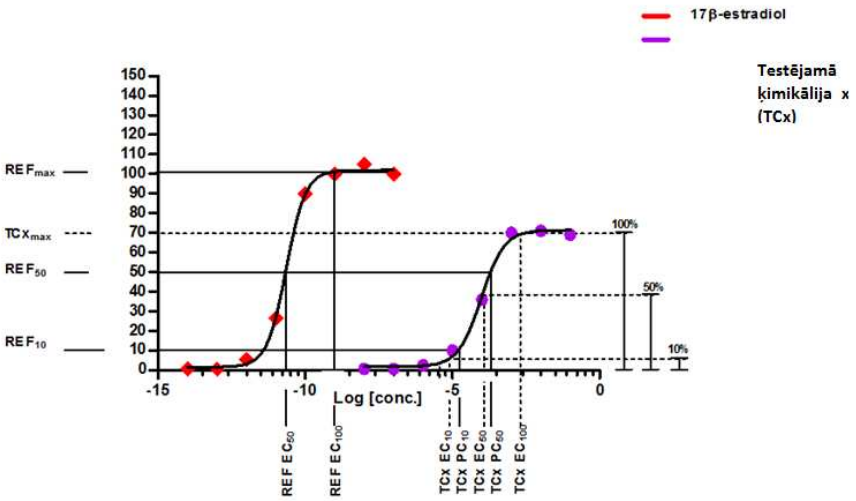
— Nosaka testējamo ķimikāliju IC_{50} un IC_{20}.

— Nosaka testējamās ķimikālijas minimālo relatīvo indukciju (TC_{min}).

— Nosaka testējamo ķimikāliju PC_{80} un PC_{50}.

3. attēls.

Pārskats par agonistu testā noteiktajiem parametriem



EC_{10} = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 10 % no tās maksimālās atbildreakcijas.

EC_{50} = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 50 % no tās maksimālās atbildreakcijas.

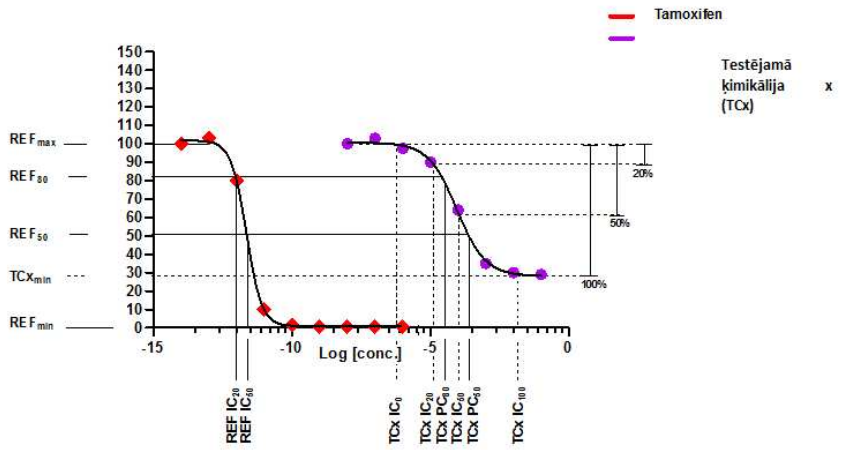
PC_{10} = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta EC_{10}.

PC_{50} = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta EC_{50}.

TCx_{max} = testējamās ķimikālijas maksimālā relatīvā indukcija.

4. attēls.

Pārskats par antagonistu testā noteiktajiem parametriem



IC20 = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 80 % no tās maksimālās atbildreakcijas (20 % inhibīcija).

IC50 = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 50 % no tās maksimālās atbildreakcijas (50 % inhibīcija).

PC80 = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta IC_{20}.

PC50 = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta IC_{50}.

TCxmin = testējamās ķimikālijas minimālā relatīvā indukcija.Testējamām ķimikālijām ne vienmēr var iegūt pilnu devas–atbildreakcijas līkni, piem., citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ. Tad nav iespējams noteikt arī IC_{50}, IC_{20} un PC_{50}. Tādos gadījumos iespējams noteikt tikai PC_{20} un TC_{min}.

58. Rezultātu pamatā ir divas (vai trīs) neatkarīgas izpildes reizes. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti salīdzināmi un līdz ar to reproducējami rezultāti, nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi. Rezultāti ir pieņemami, ja tie:

— atbilst pieņemamības kritērijiem (sk. 14.–22. punktu sadaļā "Pieņemamības kritēriji");

— ir reproducējami.

Datu interpretācijas kritēriji

59. Interpretējot datus un lemjot, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva, jāizmanto tālāk aprakstītie kritēriji.

Agonisms

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **pozitīvu**, ja:

1 TC_{max} ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{10}).

2 Vismaz 2 secīgas testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{10}.

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **negatīvu**, ja:

1 TC_{max} nepārsniedz 10 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{10});

2 mazāk nekā 2 testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{10}.

Antagonisms

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **pozitīvu**, ja:

1 TC_{min} ir vienāda ar vai mazāka par 80 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{80} = 20 % inhibīcija).

2 Vismaz 2 secīgas testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai mazākas par REF_{80}.

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **negatīvu**, ja:

1 TC_{min} pārsniedz 80 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{80} = 20 % inhibīcija).

2 Mazāk nekā 2 testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{80}.

60. Lai raksturotu testējamās ķimikālijas pozitīvās atbildreakcijas potenci, apskata šādus parametrus: ietekmes intensitāte (agonisms: TC_{max}; antagonisms: TC_{min}) un koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme (agonisms: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonisms: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

LITERATŪRA

(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

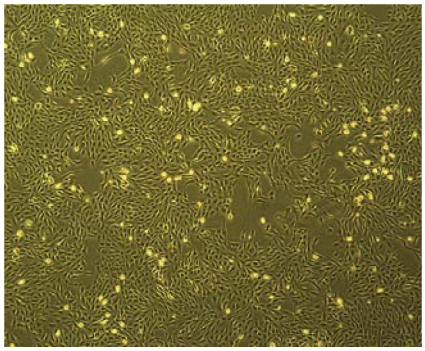
(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

4.1.

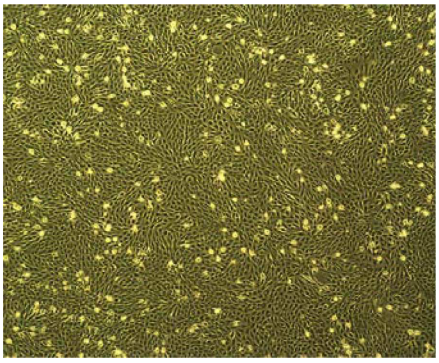
PAPILDINĀJUMS. ŠŪNU DZĪVOTSPĒJAS VIZUĀLA PĀRBAUDE



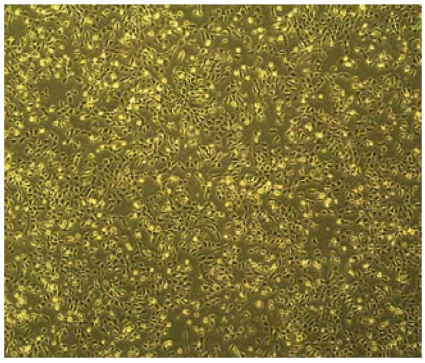
Konfluence < 5 %. Šūnas ir tikko uzsētas. Šūnu dzīvotspēja 100 %. Klasifikācija "citotoksicitātes nav".



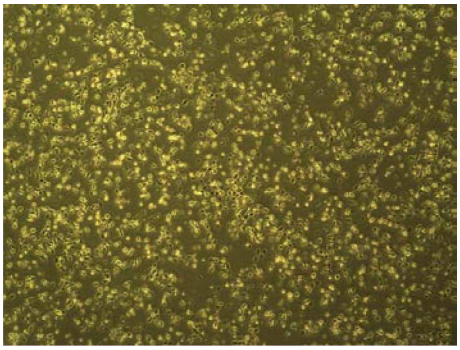
Konfluence > 85 %. Šajā posmā šūnas ir eksponētas testējamām ķimikālijām. Šūnu dzīvotspēja 95 %.Klasifikācija "citotoksicitātes nav".



Konfluence > 95 %. Šūnas ir blīvi saspiedušās un sāk pāraugt. Šūnu dzīvotspēja 95 %.Klasifikācija "citotoksicitātes nav".



Šūnu dzīvotspēja 25 %. Šūnas atdalās, un saskare starp šūnām samazinās. Šūnas ir noapaļotas. Klasifikācija "citotoksicitāte".



Šūnu dzīvotspēja 5 %. Šūnas ir pavisam atdalījušās, un nesaskaras. Šūnas ir noapaļotas. Klasifikācija "citotoksicitāte".

B.67. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR TIMIDĪNKINĀZES GĒNU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 490 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, normatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Peļu limfomas ķīmiskā analīze (MLA) un TK6 tests ar timidīnkināzes (TK) lokusu sākotnēji bija iekļauti B.17. testēšanas metodē. Vēlāk Genotoksiskuma testēšanas starptautiskā darbsemin--āra (*IWGT*) MLA ekspertu darbgrupa sagatavoja starptautiski saskaņotus ieteikumus par MLA ķīmiskās analīzes pieņemamības kritērijiem un datu interpretēšanu (1)(2)(3)(4)(5), un minētie ieteikumi ir iestrādāti šajā jaunajā, B.67. testēšanas metodē. Šī testēšanas metode ir paredzēta MLA un – tā kā tajā izmanto TK lokusu – arī TK6 testam. MLA jau iepriekš plaši izmantota normatīvām vajadzībām, bet TK6 lietots daudz retāk. Lai gan abu šūnu līniju beigupunkti ir līdzīgi, tās nav savstarpēji aizstājamas, un normatīvajās programmās var būt pamatoti dota priekšroka vienas vai otras līnijas izmantošanai kādai konkrētai normatīvai vajadzībai. Piemēram, MLA validācijā pierādījās, ka tā ir piemērota, lai detektētu ne tikai gēnu mutāciju, bet arī testējamās ķimikālijas spēju inducēt strukturālus hromosomu bojājumus. Šī testēšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO ģenētiskā toksiskuma testēšanas vadlīniju grozījumiem (6).

2. Šā zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testa nolūks ir detektēt ķimikāliju izraisītas gēnu mutācijas. Ar šajos testos izmantotajām šūnu līnijām mēra turpvērstas reportiergēnu mutācijas endogēniskajā timidīnkināzes gēnā (cilvēka šūnu *TK* un grauzēju šūnu *Tk*; šajā testēšanas metodē abi dēvēti par *TK*). Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar divām šūnu līnijām, proti, L5178Y $TK^{+/-}$–3.7.2C peļu limfomas šūnu līniju (vispārīgais nosaukums L5178Y) un TK6 cilvēka limfoblastoīdo šūnu līniju (vispārīgais nosaukums TK6). Kaut arī abas šūnu līnijas atšķiras izcelsmes, šūnu augšanas, p53 statusa un citādā ziņā, *TK* gēnu mutācijas testēšanu abu tipu šūnās ir iespējams veikt līdzīgā veidā, kas aprakstīts šajā testēšanas metodē.

3. Timidīnkināzes gēna autosomālā un heterozigotiskā iedaba ļauj detektēt dzīvotspējīgas kolonijas, kuru šūnās pēc mutācijas no $TK^{+/-}$ uz $TK^{-/-}$ timidīnkināzes ferments vairs neizpaužas. Šo neesību var radīt *TK* gēnu ietekmējoši ģenētiski notikumi, un to vidū var būt kā gēnu mutācijas (punktveida mutācijas, nolasīšanas fāzes nobīdes mutācijas, sīkas delēcijas u. c.), tā hromosomāli notikumi (plašas delēcijas, strukturālas hromosomu aberācijas un mitotiskā rekombinācija). Pēdējie minētie notikumi izpaužas kā heterozigotitātes zudums, un cilvēka kanceroģenēzē tā ir parasta ģenētiska tumorsupresorgēnu pārmaiņa. Teorētiski ar MLA ir iespējams detektēt pilnīgu *TK* nesējas hromosomas zudumu dalīšanās vārpstas traucējumu un/vai mitotiskas neizšķiršanās ietekmē. Citoģenētiskā un molekulārā analīze, izmantotas kopā, skaidri parāda, ka daļa MLA TK mutantu ir neizšķiršanās rezultāts. Tomēr pierādījumu svars rāda, ka, piemērojot citotoksicitātes standartkritērijus (aprakstīti šajā testēšanas metodē), ar *TK* gēnu mutācijas testiem nav iespējams uzticami detektēt aneigēnus, un tāpēc šie testi aneigēnu detektēšanai nav piemēroti (7)(8)(9).

4. *TK* gēnu mutācijas testos tiek ģenerēti divām atšķirīgām fenotipiskajām klasēm piederīgi *TK* mutanti: normāli augošie mutanti, kas aug tikpat ātri kā TK heterozigotiskās šūnas, un lēnaudzīgie mutanti, kuru augšanu raksturo pagarināts dubultošanās laiks. Normāli augošie un lēnaudzīgie mutanti MLA tiek saukti attiecīgi par lielo un mazo koloniju mutantiem, bet TK6 – par agrīno un vēlīno koloniju mutantiem. Lielo un mazo koloniju MLA mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības ir sīki izpētītas (8)(10)(11)(12)(13). Visnotaļ sīki pētītas arī agrīno un vēlīno TK6 mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības (14)(15)(16)(17). Abu šūnu tipu lēnaudzīgos mutantus ietekmējuši ģenētiski bojājumi, kuri izpaužas ar augšanu regulējošu varbūtīgu gēnu vai gēniem *TK* lokusa tuvumā un kuru rezultāts ir ilgāks dubultošanās laiks un vēlīno jeb mazo koloniju veidošanās (18). Lēnaudzīgo mutantu inducēšana tiek saistīta ar ķimikālijām, kas inducē plašas strukturālas izmaiņas hromosomālā līmenī. Šūnas, kuru bojājumi neizpaužas ar augšanu regulējošu varbūtīgu gēnu vai gēniem *TK* lokusa tuvumā, aug līdzīgā ātrumā kā vecākšūnas un kļūst par normāli augošiem mutantiem. Tādu mutantu inducēšana, kuri aug galvenokārt normāli, tiek saistīta ar ķimikālijām, kas iedarbojas galvenokārt kā punktveida mutagēni. Tāpēc ir svarīgi pieskaitīt gan lēnaudzīgos, gan normāli augošos mutantus, lai tādā veidā apzinātu tos visus un iegūtu priekšstatu par testējamās ķimikālijas inducēto bojājumu tipu vai tipiem (mutagēni / klastogēni) (10)(12)(18)(19).

5. Šis testēšanas metodes apraksts strukturēts tā, lai dotu vispārīgu informāciju, kas attiecas gan uz MLA, gan uz TK6, un pēc tam sīkākas vadlīnijas par katru atsevišķo testu.

6. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

7. *In vitro* testos metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēnisks avots. Eksogēniskā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi.

8. Būtu jāraugās, lai nerodas tādi apstākļi (proti, varbūtēja mijiedarbība ar testa sistēmu), kas noved pie artefaktuāli pozitīviem rezultātiem, kurus nerada testējamās ķimikālijas un šūnas ģenētiskā materiāla mijiedarbība; pie tādiem apstākļiem pieder arī pH vai osmolalitātes pārmaiņas, mijiedarbība ar barotnes sastāvdaļām (20)(21) vai pārāk augsti citotoksicitātes līmeņi (22)(23)(24). MLA un TK6 testā par pārāk augstiem uzskata līmeņus, kas pārsniedz 28. punktā definētos ieteicamos augšējos citotoksicitātes līmeņus. Turklāt jāatzīmē, ka testējamās vielas, kuras ir timidīna analogi vai iedarbojas kā timidīna analogi, šūnu apstrādes laikā var izraisīt spontānu fona mutantu selektīvu augšanu un tādējādi palielināt mutantu biežumu, tāpēc šo vielu adekvātas izvērtēšanas labad jāizmanto papildu testēšanas metodes (25).

9. Attiecībā uz nanomateriāliem, kas iegūti ar inženierijas paņēmieniem, šo testēšanas metodi var būt vajadzīgs pielāgot, taču tas šeit nav konkrēti aprakstīts.

10. Pirms šo testēšanas metodi izmantot maisījuma testēšanai nolūkā iegūt datus kādam normatīvam mērķim, jāapsver, vai un kādā veidā tā varētu dot minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, šāda apsvēršana nav vajadzīga.

11. Mutantšūnas, kurās pēc mutācijas no $TK^{+/-}$ uz $TK^{-/-}$ vairs neizpaužas timidīnkināzes fermentatīvā darbība, ir rezistentas pret pirimidīna analoga trifluortimidīna (TFT) citostatisko iedarbību. *TK* standartšūnas ir jutīgas pret TFT, kas izraisa šūnu metabolisma inhibēšanu un aptur šūnu turpmāko dalīšanos. Tātad mutantšūnas TFT klātbūtnē spēj proliferēt un veidot redzamas kolonijas, turpretī TK fermentu saturošās šūnas to nespēj.

TESTA PRINCIPS

12. Šūnas, kas ir suspensijā, uz piemērotu laiku (sk. 33. punktu) gan ar eksogēnisku metaboliskas aktivācijas avotu, gan bez tā (sk. 19. punktu) eksponē testējamajai ķimikālijai un pēc tam subkultivē, lai noteiktu citotoksicitāti un lai pirms mutantu atlasīšanas varētu notikt fenotipiskā ekspresija. Citotoksicitāti nosaka pēc relatīvā kopējā pieauguma (RTG; sk. 25. punktu) MLA gadījumā un pēc relatīvās izdzīvotības (RS; sk. 26. punktu) TK6 gadījumā. Lai inducēto mutāciju fenotipiskā ekspresija varētu izpausties gandrīz optimāli, apstrādātās kultūras barotnē tur pietiekami ilgu laiku, kas ir raksturīgs katram izvēlētajam šūnu tipam (sk. 37. punktu). Kad notikusi fenotipiskā ekspresija, nosaka mutantu biežumu, noteiktu skaitu šūnu izsējot barotnē, kas satur selektīvo aģentu, ar kuru detektē mutantkolonijas, un barotnē bez selektīvā aģenta, pēc kuras nosaka klonēšanās efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc piemērota inkubēšanas laika kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantkoloniju skaita, ko koriģē ar klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Šūnas

13. Attiecībā uz MLA: tā kā MLA ir izstrādāta un aprakstīta, izmantojot L5178Y šūnu $TK^{+/-}$ −3.7.2C apakšlīniju, jāņem šī konkrētā apakšlīnija. L5178Y šūnu līnija tikusi atvasināta no DBA-2 peļu timīnās limfomas, kas inducēta ar metilholantrēnu (26). *Clive* un līdzstrādnieki L5178Y šūnas (*Clive* klasificētas kā $TK^{+/+}$ −3) apstrādāja ar etilmetāna

sulfonātu un izolēja $TK^{-/-}$ (klasificēta kā $TK^{-/-}$ −3.7) klonu, par selektīvo aģentu izmantojot bromdeoksiuridīnu. No $TK^{-/-}$ tika izolēts un izmantošanai MLA aprakstīts spontāns $TK^{+/-}$ klons (klasificēts kā $TK^{+/-}$ −3.7.2.) un apakšklons (klasificēts kā $TK^{+/-}$−3.7.2C) (27). Šīs šūnu līnijas kariotips tika publicēts (28)(29)(30)(31). Tā modālais hromosomu skaits ir 40. Ir viena metacentriska hromosoma (t12 13), kas būtu jāpieskaita kā viena hromosoma. Peļu *TK* lokuss atrodas 11. hromosomas distālajā galā. L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C šūnu līnijai mutācijas ir abās p53 alēlēs, un tā rada p53 mutantproteīnu (32)(33). Visdrīzāk $TK^{+/-}$−3.7.2C šūnu līnijas p53 statuss ir tas, kas nosaka, cik labi tests spēj detektēt plašus bojājumus (17).

14. Attiecībā uz TK6: TK6 ir cilvēka limfoblastoīdo šūnu līnija. Vecākšūnu līnija ir *Epstein–Barr* vīrusa transformēta šūnu līnija, WI-L2, sākotnēji iegūta no piecgadīga zēna, kurš sirga ar pārmantotu sferocitozi. Pirmo izolēto klonu, HH4, mutagenizēja ar ICR191, un rezultātā ieguva *TK* heterozigotisku šūnu līniju, TK6 (34). TK6 šūnas ir gandrīz diploīdas, un reprezentatīvais kariotips ir 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Cilvēka *TK* lokuss atrodas 17. hromosomas garajā plecā. TK6 ir p53 ziņā kompetenta šūnu līnija, jo tai abās alēlēs ir savvaļas tipa p53 sekvence un ekspresijā – tikai savvaļas tipa p53 proteīns (53).

15. Kad testēšanas laboratorija veic izejkultūras veidošanu vai papildināšanu, gan MLA, gan TK6 gadījumā ieteicams nodrošināt, ka nav kontaminācijas ar *Mycoplasma*, noteikt šūnu kariotipu vai iekrāsot *TK* lokusu nesošās hromosomas un pārbaudīt populāciju dubultošanās laikus. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem (16)(19)(37). Šī izejkultūra jāglabā -150 °C vai zemākā temperatūrā, un no tās gatavojamas visas šūnu darbkultūras.

16. Pirms ar krioprezervācijas palīdzību lielā skaitā veidot darbkultūras vai vienkārši pirms kultūras izmantošanas eksperimentā tā var būt jāattīra no iepriekš pastāvošajām mutantšūnām [, izņemot tad, ja šķīdinātāja kontrolē mutantu biežums (MF) jau tolaik ir pieņemamā diapazonā (attiecībā uz MLA sk. 2. tabulu)]. Tas darāms, izmantojot metotreksātu (*aminopterīnu*), lai šūnas, kurās TK neizpaužas, tiktu negatīvi atlasītas, un pievienojot kultūrai timidīnu, hipoksantīnu un glicīnu (L5178Y) vai 2'-deoksicitidīnu (TK6), lai tādā veidā nodrošinātu TK ziņā kompetento šūnu optimālu augšanu (19)(38)(39), TK6 gadījumā (40). Vispārīgus ieteikumus par labu praksi šūnu kultūru uzturēšanā, kā arī ieteikumus konkrēti par L5178Y un TK6 šūnām skatīt (19)(31)(37)(39)(41). Laboratorijām, kam šūnu izejkultūras vajadzīgas MLA vai TK6 iniciēšanas nolūkiem vai kam vajadzīgas jaunas šūnu izejkultūras, ir pieejams labi aprakstītu šūnu repozitorijs (37).

Barotne un kultivēšanas apstākļi

17. Abos testos kultūru uzturēšanai jāizmanto attiecīgas barotnes un attiecīgi inkubācijas apstākļi (piem., kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar CO_2 koncentrāciju 5 %, inkubācijas temperatūra 37 °C). Šūnu kultūras vienmēr jātur tādos apstākļos, lai būtu nodrošināts, ka augšana notiek eksponenciālā fāzē. Īpaši svarīgi ir izraudzīties tādu barotni un tādus kultivēšanas apstākļus, kuri nodrošina šūnu optimālu augšanu ekspresijas periodā un gan mutantšūnu, gan nemutējušo šūnu klonēšanos. Gan MLA, gan TK6 gadījumā svarīgi ir arī tas, lai kultivēšanas apstākļi nodrošinātu optimālu augšanu kā lielo/agrīno, tā mazo/vēlīno koloniju TK mutantiem. Vairāk par kultivēšanu, arī par vajadzību pienācīgi termiski inaktivēt zirgu serumu, ja mutantu atlasē tiek izmantota RPMI barotne, skatīt (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Kultūru sagatavošana

18. No izejkultūrām tiek pavairotas šūnas, tās iesētas kultūras barotnē tādā blīvumā, lai apstrādes periodā un ekspresijas periodā kultūras suspensijās joprojām augtu eksponenciāli.

Metaboliskā aktivācija

19. Ja strādā ar L5178Y un TK6 šūnām – to endogēniskā metaboliskā kapacitāte nav pietiekama –, jāizmanto eksogēniskas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no grauzēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piemēram, Aroclor 1254 (43)(44)(45) vai fenobarbitālu

kombinācijā ar β-naftoflavonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (52) un izrādījusies tikpat produktīva jauktas funkcijas oksidāžu inducētāja kā Aroclor 1254 (45)(46)(47)(48)(49). S9 frakciju parasti izmanto 1–2 % tilpumkoncentrācijā, bet galīgajā testa barotnē tilpumkoncentrāciju var palielināt līdz 10 %. Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķimikāliju klase.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

20. Cietas testējamās ķimikālijas jāsagatavo attiecīgos šķīdinātājos un attiecīgā gadījumā pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 21. punktu). Šķidras testējamās ķimikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķimikālijas jātestē pēc attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (53)(54)(55). Testējamās ķimikālijas preparāti jāpagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var glabāt.

TESTĒŠANAS NOSACĪJUMI

Šķīdinātāji

21. Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķimikālijas šķīdību, šķīdinātājam negatīvi neietekmējot testa norisi, piemēram, nemainot šūnu augšanu, neskarot testējamās ķimikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Ja vien iespējams, ieteicams vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju (vai kultūras barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji ir ūdens vai dimetilsulfoksīds. Galīgajā apstrādes barotnē organisko šķīdinātāju tilpumkoncentrācijai parasti nevajadzētu pārsniegt 1 %, bet uz (sālsūdens vai saldūdens) bāzes pagatavotu šķīdinātāju tilpumkoncentrācijai – 10 %. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamajām ķimikālijām, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja šādu apliecinošu datu nav, svarīgi ir izmantot arī neapstrādātas kontroles (sk. definīciju 1. papildinājumā), lai ar tām pierādītu, ka izraudzītajam šķīdinātājam nav deletējošas vai mutagēniskas ietekmes.

CITOTOKSICITĀTES MĒRĪŠANA UN APSTRĀDES KONCENTRĀCIJU IZRAUDZĪŠANĀS

22. Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizraugās koncentrācijas, kas spēj izraisīt tādas artefaktuāli pozitīvas atbildreakcijas kā pārmērīga citotoksicitāte (sk. 28. punktu), izgulsnēšanās (sk. 29. punktu) kultūras barotnē vai manāmas pH vai osmolalitātes pārmaiņas (sk. 8. punktu). Lai nepieļautu artefaktuāli pozitīvus rezultātus un uzturētu pienācīgus kultivēšanas apstākļus gadījumā, ja testējamā ķimikālija pievienošanas brīdī manāmi maina barotnes pH, to var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu.

23. Koncentrācijas izraugās pēc citotoksicitātes un citiem apsvērumiem (sk. 27.–30. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var noderēt, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Pat ja citotoksicitāte izvērtēta jau no sākuma, galvenajā eksperimentā tā joprojām jānosaka katrai kultūrai. Ja eksperimentā nosaka diapazonu, būtu jāaptver plašs koncentrāciju spektrs un eksperiments jābeidz vai nu pirmajā dienā pēc apstrādes, vai (ja izmantotās koncentrācijas izrādās piemērotas) tas jāturpina divu dienu ilgajā ekspresijas laikā līdz mutantu atlasei.

24. Citotoksicitāte jānosaka katrā individuālā testa kultūrā un kontrolkultūrā: MLA (2) un TK6 (15) atbilstošās metodes ir definētas ar starptautiski saskaņotu praksi.

25. Abās (agara un mikroiedobju) MLA versijās citotoksicitāte jāizvērtē, izmantojot relatīvo kopējo pieaugumu (RTG), kuru 1975. gadā sākotnēji definējuši *Clive* un *Spektor* (2). Tas ietver relatīvo suspensijas pieaugumu (RSG: testa kultūra / šķīdinātāja kontrole) šūnu apstrādes laikā, ekspresijas laiku un relatīvo klonēšanās efektivitāti (RCE: testa kultūra / šķīdinātāja kontrole) mutantu atlasīšanas brīdī (2). Jāatzīmē, ka ar RSG ir ņemts vērā arī apstrādes laikā novērojamais šūnu zudums testa kultūrā (sk. formulas 2. papildinājumā).

26. Attiecībā uz TK6 citotoksicitāte jāizvērtē pēc relatīvās izdzīvotības (RS), proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (CE), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, CE koriģējot atkarībā no šūnu zuduma apstrādes laikā salīdzinājumā ar šūnu skaitu negatīvajā kontrolē (kurā izdzīvotību pieņem par 100 %), sk. formulu 2. papildinājumā.

27. Jāizvērtē vismaz četras testējamās koncentrācijas (nerēķinot šķīdinātāja un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (attiecīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Lai gan ir ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ar katru testējamo koncentrāciju var izmantot vai nu replikatīvas, vai atsevišķas apstrādātas kultūras. Ar replikatīvajām kultūrām pie kādas konkrētas koncentrācijas iegūtie rezultāti pārskatā būtu jāatspoguļo atsevišķi, bet datu analīzes vajadzībām tos drīkst apvienot (55). Attiecībā uz testējamajām ķimikālijām, kas uzrāda nelielu vai neuzrāda nekādu citotoksicitāti, parasti noderēs divkāršotas līdz trīskāršotas koncentrācijas intervāli. Ja citotoksicitāte ir novērojama, koncentrācijas jāizraugās tā, lai citotoksitātes diapazons aptvertu gan koncentrācijas, pie kurām citotoksicitāte ir tāda, kāda aprakstīta 28. punktā, gan koncentrācijas, pie kurām citotoksicitāte ir vidēji liela vai maza, vai arī tās nav. Daudzām testējamajām ķimikālijām ir novērojama stāva koncentrācijatkarīgās atbildreakcijas līkne, un, lai aptvertu visu citotoksicitātes diapazonu vai lai detalizēti izpētītu devas un atbildreakcijas sakarību, var būt nepieciešams izmantot koncentrācijas ar tuvākiem intervāliem un vairāk nekā četras koncentrācijas, jo īpaši situācijās, kur eksperiments jāatkārto (sk. 70. punktu). Vairāk nekā 4 koncentrācijas var būt īpaši vajadzīgas, ja jāizmanto atsevišķas kultūras.

28. Ja maksimālo koncentrāciju izraugās pēc citotoksicitātes, ar augstāko koncentrāciju MLA gadījumā būtu jācenšas panākt 20 līdz 10 % lielu RTG, bet TK6 gadījumā – 20 līdz 10 % lielu RS (67. punkts).

29. Mazšķīstošu testējamo ķimikāliju gadījumā, kuras pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, nav citotoksiskas, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas augstāka par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīmredzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Tā kā MLA un TK6 tiek izmantotas suspensijas kultūras, īpaši būtu jāraugās, lai nogulsnes netraucētu testa izdarīšanā. Turklāt var būt lietderīgi pirms eksperimenta noteikt šķīdību kultūras barotnē.

30. Ja nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte netiek novēroti, augstākajai testējamajai koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (57)(58). Ja testējamās ķimikālijas sastāvs nav noteikts, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, tā ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls [t. i., ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs (*UVCB*)], vidiski ekstrakti u. tml., gadījumos, kur netiek novērota pietiekama citotoksicitāte, augstākā koncentrācija var būt jāpalielina (piem., līdz 5 mg/ml), lai būtu panākta augstāka katras sastāvdaļas koncentrācija. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēkiem paredzētajām zālēm šīs prasības var būt citādas (59).

Kontroles

31. Ikvienā eksperimentā jāiekļauj paralēlas negatīvās kontroles (sk. 21. punktu), proti, tikai šķīdinātāju apstrādes barotnē, ar ko rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādātajām kultūrām.

32. Paralēlās pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt mutagēnus izmantotā testēšanas protokola apstākļos, (attiecīgā gadījumā) eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un to, ka tiek adekvāti detektēti kā mazo/vēlīno, tā lielo/agrīno koloniju TK mutanti. Pozitīvo kontroļu piemēri sniegti zemāk 1. tabulā. Var izmantot alternatīvas pozitīvās kontrolvielas, ja tas ir pamatoti. Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti īslaicīgām (3–4 stundu ilgām) apstrādēm, kas tiek veiktas paralēli ar tikpat ilgu metabolisko aktivāciju un bez tās, ir iespēja pozitīvās kontroles izmantot tik vien kā attiecībā uz mutagēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Šajā gadījumā viena vienīga pozitīva kontroles atbildreakcija apliecinās gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Ilglaicīgas (piem., 24 stundas bez S9) apstrādes gadījumā tomēr vajadzīga atsevišķa pozitīvā kontrole, jo apstrādes ilgums atšķirsies no tā, ko izmanto testā ar metabolisko aktivāciju. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību, katra pozitīvā kontrole būtu jāizmanto ar vienu vai vairākām tādām koncentrācijām, ar kurām gaidāma reproducējama un detektējama palielināšanās salīdzinājumā ar fonu, turklāt atbildreakciju nedrīkstētu kompromitēt citotoksicitāte, kas pārsniedz šai testēšanas metodei specificētās robežas (sk. 28. punktu).

1. tabula

References vielas, ko ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanai un pozitīvo kontroļu izraudzīšanās vajadzībām

Kategorija	Viela	CAS Nr.
1. Mutagēni, kuriem metaboliskā aktivācija nav vajadzīga		
Metilmetānsulfonāts		66-27-3
Mitomicīns C		50-07-7
4-Nitrohinolīn-*N*-oksīds		56-57-5
2. Mutagēni, kuriem metaboliskā aktivācija ir vajadzīga		
Benz(a)pirēns		50-32-8
Ciklofosfamīds (monohidrāts)		50-18-0 (6055-19-2)
7,12-Dimetilbenzantracēns		57-97-6
3-Metilholantrēns		56-49-5

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķimikāliju

33. Proliferējošas šūnas ar testējamo ķimikāliju apstrādā gan metaboliskās aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ekspozīcijai jāilgst attiecīgu laiku (parasti pietiek ar 3–4 stundām). Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēkiem paredzētajām zālēm šīs prasības var būt citādas (59). MLA gadījumā, ja īslaicīga apstrāde dod negatīvus rezultātus un ir informācija, kas liecina, ka var būt vajadzīga ilgāka apstrāde [piem., nukleozīda analogiem, mazšķīstošām ķimikālijām (5)(59)], jāapsver testa izdarīšana, izmantojot ilglaicīgāku apstrādi, piem., 24 stundas bez S9.

34. Minimālais šūnu skaits, ko izmanto katrai testa kultūrai (gan kontrolkultūrai, gan apstrādātai kultūrai), katrā testa posmā jābalsta uz spontāno mutantu biežumu. Vispārīgs princips ir šūnas apstrādāt un pasāžām ņemt tādā skaitā, lai visās testa fāzēs (apstrādē, fenotipiskajā ekspresijā un mutantu atlasē) katrā eksperimentālajā kultūrā saglabātos vismaz 10, bet ideālā gadījumā 100 spontāno mutantu (56).

35. MLA gadījumā ieteicamais pieņemamais spontāno mutantu biežums ir $35–140 \times 10^{-6}$ (agara versijā) un $50–170 \times 10^{-6}$ (mikroiedobju versijā) (sk. 2. tabulu). Lai katrā testa kultūrā pēc apstrādes paliktu vismaz 10 un ideāli 100 spontāno mutantu, ir jāapstrādā vismaz 6×10^6 šūnu. Šāda skaita apstrāde un pietiekama šūnu skaita uzturēšana ekspresijas un mutantu atlasei vajadzīgās klonēšanas laikā visās eksperimenta fāzēs nodrošina pietiekami daudz (10 vai vairāk) spontāno mutantu, arī kultūrās, kas apstrādātas ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (izmērīta ar 10 % RGT) (19)(38)(39).

36. TK6 gadījumā spontāno mutantu biežums parasti ir $2–10 \times 10^{-6}$. Lai katrā kultūrā pēc apstrādes paliktu vismaz 10 spontāno mutantu, ir jāapstrādā vismaz 20×10^6 šūnu. Šāda šūnu skaita apstrāde nodrošina pietiekami daudz (10 vai vairāk) spontāno mutantu, arī kultūrās, kas apstrādātas ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (10 % RS). Turklāt pietiekamā skaitā jābūt arī šūnām, ko kultivē ekspresijas periodā un mutantu atlasīšanas nolūkā uzsēj uz platēm (60).

Fenotipiskās ekspresijas laiks un citotoksicitātes un mutantu biežuma mērīšana

37. Lai jauninducēto mutantu fenotipiskā ekspresija varētu izpausties gandrīz optimāli, pēc apstrādes šūnas vēl kultivē noteiktu laiku, kas ir katrai šūnu līnijai specifisks. MLA gadījumā fenotipiskās ekspresijas periods ilgst 2 dienas. TK6 gadījumā fenotipiskās ekspresijas periods ir 3–4 dienas. Ja veic 24 stundu ilgu apstrādi, ekspresijas periodu sāk skaitīt no apstrādes beigu brīža.

38. Fenotipiskās ekspresijas perioda laikā šūnas katru dienu tiek saskaitītas. MLA gadījumā šūnu skaitīšanas rezultātu izmanto, lai aprēķinātu dienišķo suspensijas pieaugumu (SG). Kad beidzies 2 dienu ilgais ekspresijas periods, barotnē ar selektīvo aģentu un bez tā šūnas tiek suspendētas, lai noteiktu attiecīgi mutantu skaitu (selekcijas plates) un klonēšanās efektivitāti (dzīvotspējas plates). Ir divas vienādi pieņemamas metodes, ar kurām MLA tiek klonēti atlasīšanai vajadzīgie mutanti: vienā metodē izmanto mīksto agaru, bet otrā – šķidru barotni 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs (19)(38)(39). TK6 gadījumā klonēšana notiek, izmantojot šķidras barotnes un 96 iedobju mikrotitrēšanas plates (16).

39. Vienīgais ieteicamais selektīvais aģents TK mutantiem ir trifluortimidīns (TFT).

40. MLA gadījumā agara platēm un mikroiedobju platēm skaitīšanu veic pēc 10–12 dienu ilgas inkubācijas. TK6 gadījumā agrīnos mutantus nosaka, kolonijas uz mikroiedobju platēm pieskaitot pēc 10–14 dienām. Lai parādītos lēnaudzīgie (vēlīnie) TK6 mutanti, pēc agrīno mutantu pieskaitīšanas šūnām no jauna jāpievieno barotne un TFT, un tad plates jāinkubē vēl 7–10 dienas (62). Vairāk par lēnaudzīgo un normāli augošo TK mutantu pieskaitīšanu skatīt 42. un 44. punktā.

41. Attiecīgās aprēķina formulas abiem testiem, arī abām MLA (agara un mikroiedobju) metodēm skatīt 2. papildinājumā. Pēc MLA agara metodes pieskaita kolonijas, atbilstoši klonēšanās efektivitātei koriģē mutantu koloniju skaitu un tad aprēķina MF. MLA un TK6 mikroiedobju versijā klonēšanās efektivitāti gan selekcijas platēm, gan klonēšanās efektivitātes platēm nosaka pēc t. s. Puasona sadalījuma (63). MF aprēķina, vadoties pēc šīm divām klonēšanās efektivitātes vērtībām.

Mutantkoloniju raksturošana

42. MLA gadījumā, ja testējamā ķimikālija ir pozitīva (sk. 62.–63. punktu), koloniju lielums vai augšana jāraksturo vismaz vienā no testa kultūrām (parasti pie augstākās pieņemamās pozitīvās koncentrācijas) un negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Ja testējamā ķimikālija ir negatīva (sk. 64. punktu), mutantkoloniju raksturošana jāveic negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Pēc MLA mikroiedobju metodes mazo koloniju mutantus definē kā tādus, kuri klāj mazāk nekā 25 % no iedobes platības, mērot pēc diametra, bet lielo koloniju mutantus – kā tādus, kuri klāj vairāk nekā 25 % no iedobes platības, mērot pēc diametra. Pēc agara metodes mutantkolonijas skaita un to lielumu nosaka automātiski, izmantojot koloniju skaitītāju. Koloniju lieluma noteikšanā iespējamās pieejas sīkāk aprakstītas literatūrā (19)(38)(40). Koloniju raksturošana negatīvajā un pozitīvajā kontrolē vajadzīga tādēļ, lai pierādītu, ka pētījums izdarīts adekvāti.

43. Testējamo ķimikāliju nevar noteikt par negatīvu, ja pozitīvajā kontrolē nav adekvāti detektēti kā lielo, tā mazo koloniju mutanti. Koloniju raksturošanu var izmantot, lai sniegtu vispārīgu informāciju par testējamās ķimikālijas spēju izraisīt punktveida mutācijas un/vai hromosomālus notikumus (4. punkts).

44. TK6: normāli augošos un lēnaudzīgos mutantus diferencē pēc inkubācijas laika atšķirības (sk. 40. punktu). TK6 gadījumā parasti saskaita gan agrīnos, gan vēlīnos mutantus visās kultūrās, arī negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Koloniju raksturošana negatīvajā un pozitīvajā kontrolē vajadzīga tādēļ, lai pierādītu, ka pētījums izdarīts adekvāti. Testējamo ķimikāliju nevar noteikt par negatīvu, ja pozitīvajā kontrolē nav adekvāti detektēti kā agrīnie, tā vēlīnie mutanti. Koloniju raksturošanu var izmantot, lai sniegtu vispārīgu informāciju par testējamās ķimikālijas spēju izraisīt punktveida mutācijas un/vai hromosomālus notikumus (4. punkts).

Laboratorijas kompetence

45. Lai pirms testa pastāvīgas izmantošanas demonstrētu pietiekamu vajadzīgo pieredzi, laboratorijai jābūt veikušai eksperimentu sēriju ar pozitīvās kontroles references vielām, kam ir dažādi iedarbības mehānismi (tās izraugās no 1. tabulas saraksta un vismaz vienai no tām aktīvai jābūt ar metabolisku aktivāciju un vienai — bez tās), un ar dažādām negatīvajām kontrolēm (neapstrādātām kultūrām un dažādiem šķīdinātājiem/nesējiem). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāsaskan ar literatūras datiem. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 47.–50. punktā. MLA gadījumā pozitīvās un negatīvās kontroles vērtībām jābūt saskaņā ar *IWGT* ieteikumiem (sk. 2. tabulu).

46. Lai varētu pierādīt, ka laboratorija ir kompetenta detektēt mutagēniskas ķimikālijas, noteikt metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un pierādīt, ka šūnu augšanas apstākļi apstrādes laikā, fenotipiskā ekspresija un mutantu atlase, kā arī skaitīšanas procedūras atbilst vajadzīgajam, pozitīvas kontroles vielu (sk. 1. tabulu) izlase jāpēta gan pie īslaicīgas un ilglaicīgas (ja izmanto) apstrādes bez metaboliskas aktivācijas, gan pie īslaicīgas apstrādes metaboliskas aktivācijas apstākļos. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, jāizraugās tāds izlases ķimikāliju koncentrāciju diapazons, kurā palielinājumi virs fona līmeņa būs reproducējami un koncentrācijatkarīgi.

Vēsturisko kontroļu dati

47. Laboratorijai jānosaka:

— vēsturisks pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,

— vēsturisks negatīvo (neapstrādātu, ar šķīdinātāju) kontroļu diapazons un sadalījums.

48. Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par negatīvajām kontrolēm. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar jauniem eksperimentu datiem, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt minētā sadalījuma 95 % kontrolrobežās (64)(65).

49. Laboratorijas vēsturiskā negatīvo kontroļu datubāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tajā būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimentēšanas apstākļos. Lai varētu noteikt, cik mainīgi ir laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu dati, un parādīt, ka laboratorijā šī metodika "tiek kontrolēta" (66), laboratorijām jāizmanto tādas kvalitātes kontroles metodes kā kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (65)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu atrodami literatūrā (64).

50. Negatīvo kontroļu datiem vajadzētu būt mutantu biežumam atsevišķās vai, ieteicams, replikatīvajās kultūrās; sk. aprakstu 27. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma 95 % kontrolrobežās. Tādus negatīvo kontroļu datus, kas ir ārpus 95 % kontrolrobežas, iekļaušanai vēsturiskajā kontroļu sadalījumā var pieņemt tikai tad, ja šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ja ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (sk. 49. punktu) un nav gadījusies ne tehniska kļūme, ne cilvēka kļūda.

51. Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā attiecīgo datu atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izklāsts

52. Datu izklāstā gan MLA, gan TK6 gadījumā jāiekļauj zemāk aprakstītie dati, kas vajadzīgi, lai aprēķinātu citotoksicitāti (attiecīgi RTG vai RS) un mutantu biežumu apstrādātajās un kontroles kultūrās.

53. MLA gadījumā jānorāda individuālu kultūru dati par RSG, RTG, klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī un mutantkoloniju skaits (agara versijā) vai tukšo iedobju skaits (mikroiedobju versijā). Mutantu biežums (MF) jāizteic ar mutantšūnu skaitu uz miljonu izdzīvojušo šūnu. Ja atbildreakcija ir pozitīva, vismaz pie vienas no testējamās ķimikālijas koncentrācijām (parasti pie augstākās pozitīvās koncentrācijas) un negatīvajā un pozitīvajā kontrolē jānorāda mazo un lielo koloniju MF (un/vai to īpatsvars kopējā MF). Ja atbildreakcija ir negatīva, mazo un lielo koloniju MF jānorāda negatīvajā kontrolē un pozitīvajā kontrolē.

54. TK6 gadījumā jānorāda individuālu kultūru dati par RS, klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī un tukšo iedobju skaits attiecībā uz agrīnajiem un vēlīnajiem mutantiem. MF jāizteic ar mutantšūnu skaitu uz izdzīvojušo šūnu skaitu un jānorāda gan kopējais MF, gan agrīno un vēlīno mutantu MF (un/vai to īpatsvars kopējā MF).

Pieņemamības kritēriji

55. Lai varētu noteikt konkrētas ķimikālijas testēšanas koprezultātus, gan MLA, gan TK6 gadījumā jābūt izpildītiem šādiem kritērijiem:

— testēšana notikusi ar diviem eksperimentēšanas nosacījumiem (īslaicīga apstrāde ar metabolisko aktivāciju un bez tās, sk. 33. punktu), ja vien vienā no tiem rezultāti nav bijuši pozitīvi;

— pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits ir analizēšanai derīgs (sk. 27. punktu un 34.–36. punktu);

— augstākās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 28.–30. punktā aprakstītajiem.

Negatīvo un pozitīvo kontroļu pieņemamības kritēriji

56. *IWGT* izveidotā MLA ekspertu darbgrupa ir analizējusi lielu daudzumu MLA datu, un rezultātā ir panākta starptautiska vienprātība par konkrētiem MLA pieņemamības kritērijiem (1)(2)(3)(4)(5). Tāpēc šajā testēšanas metodē sniegti konkrēti ieteikumi par to, kā MLA gadījumā nosakāma negatīvās un pozitīvās kontroles pieņemamība un izvērtējami individuālu vielu rezultāti. TK6 datubāze ir daudz mazāka un nav tikusi izvērtēta darbgrupā.

57. MLA gadījumā ikviens eksperiments jāizvērtē to tāda viedokļa, vai neapstrādātā/šķīdinātāja kontrole atbilst *IWGT* izveidotās MLA darbgrupas noteiktajiem pieņemamības kritērijiem (sk. (4) un zemāk 2. tabulu) attiecībā uz: 1) MF (turklāt MLA agara un mikroiedobju versijās *IWGT* pieņemamie MF ir atšķirīgi); 2) klonēšanās efektivitāti (CE) mutantu atlasīšanas brīdī un 3) suspensijas pieaugumu (SG) šķīdinātāja kontrolē (formulas sk. 2. papildinājumā).

2. tabula

MLA pieņemamības kritēriji

Parametrs	Mīkstā agara metode	Mikroiedobju metode
Mutantu biežums	$35–140 \times 10^{-6}$	$50–170 \times 10^{-6}$
Klonēšanās efektivitāte	65–120 %	65–120 %
Suspensijas pieaugums	8 līdz 32-kārtīgs (3–4 stundu apstrādē) 32 līdz 180-kārtīgs (24 stundu apstrādē, ja tādu veic)	8 līdz 32-kārtīgs (3–4 stundu apstrādē) 32 līdz 180-kārtīgs (24 stundu apstrādē, ja tādu veic)

58. MLA gadījumā ikviens tests jāizvērtē arī no tā viedokļa, vai pozitīvā kontrole (kontroles) atbilst vismaz vienam no šādiem diviem *IWGT* darbgrupas izstrādātiem pieņemamības kritērijiem:

— pozitīvajai kontrolei jāuzrāda absolūts kopējā MF palielinājums, t. i., palielinājums, kas pārsniedz vismaz 300×10^{-6} lielo spontāno fona MF [inducēto MF jeb IMF]. Vismaz 40 % no IMF jābūt mazo koloniju MF;

— pozitīvajā kontrolē mazo koloniju MF palielinājumam vismaz par 150×10^{-6} jāpārsniedz tas, kas ir paralēlajā neapstrādātajā/šķīdinātāja kontrolē (150×10^{-6} liels mazo koloniju IMF).

59. TK6 gadījumā tests ir pieņemams, ja paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē saskaņā ar 48.–49. punktu. Turklāt paralēlajām pozitīvajām kontrolēm (sk. 32. punktu) jāinducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturiskajā pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un jāizsaka statistiski ievērojams palielinājums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli.

60. Abos testos pozitīvajā kontroles kultūrā novērotās citotoksicitātes augšējai robežvērtībai jābūt tādai pašai kā eksperimentālajās kultūrās. Tas nozīmē, ka RTG/RS jābūt ne mazākam par 10 %. Lai pierādītu, ka pozitīvās kontroles pieņemamības kritēriji ir izpildīti, pietiek ar vienu koncentrāciju (vai pietiek izmantot vienu no pozitīvās kontroles kultūras koncentrācijām, ja tādas ir vairākas). Turklāt pozitīvās kontroles MF jābūt laboratorijas noteiktā pieņemamā diapazona robežās.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

61. *IWGT* Peļu limfomas ekspertu darbgrupa ir daudz izdarījusi MLA bioloģiskā relevantuma un pozitīvas atbildreakcijas kritēriju jomā (4). Tāpēc šajā testēšanas metodē sniegti konkrēti ieteikumi par to, kā interpretēt ar MLA testēto ķimikāliju rezultātus (sk. 62.–64. punktu). TK6 datubāze ir daudz mazāka un nav tikusi izvērtēta darbgrupā. Tāpēc ieteikumi par TK6 datu interpretēšanu ir vispārīgāki (sk. 65.–66. punktu). Papildus doti daži ieteikumi, kas attiecas uz abiem testiem (sk. 67.–71. punktu).

Tikai MLA

62. Lai nodrošinātu MF palielinājuma bioloģisko relevantumu, ieteicama šāda pieeja pozitīvas un negatīvas atbildreakcijas noteikšanā. Tajā neizmanto statistisko analīzi kā vairumā pārējo testu, bet gan iepriekš noteiktu inducēto mutantu biežumu (t. i., MF palielinājumu, kas pārsniedz paralēlās kontroles uzrādīto), ko apzīmē ar vispārējo izvērtējuma koeficientu (GEF), kurš noteikts, analizējot līdzdalīgo laboratoriju iegūto negatīvās kontroles MF datu sadalījumu (4). MLA agara versijā GEF ir 90×10^{-6}, un MLA mikroiedobju versijā GEF ir 126×10^{-6}.

63. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, kad pie kāda no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu) MF palielinājums, kas pārsniedz paralēlās kontroles uzrādīto, ir lielāks par GEF un palielinājums ir koncentrācijatkarīgs (piem., ar dinamikas rindas trenda testu noteikts). Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija spēj inducēt mutācijas.

64. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, kad ne pie viena no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu) nav koncentrācijatkarīgas atbildreakcijas vai, ja MF palielinājums ir, tas nepārsniedz GEF. Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj inducēt mutācijas.

Tikai TK6

65. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, kad pie kāda no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu):

— vismaz vienā no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— šo palielinājumu izvērtējot ar attiecīgu dinamikas rindas trenda testu, konstatējams, ka tas ir koncentrācijatkarīgs,

— kāds no rezultātiem ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā; sk. 48. punktu).

Ja visi šie kritēriji izpildīti, šajā testēšanas sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija spēj inducēt mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (66)(67).

66. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, kad ne pie viena no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu):

— nevienā testa koncentrācijā nav statistiski nozīmīga palielinājuma salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,

— ar attiecīgu dinamikas rindas trenda testu nav konstatējams palielinājuma koncentrācijatkarīgums,

— visi rezultāti ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā); sk. 48. punktu).

Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj inducēt mutācijas.

Kopīgi MLA un TK6

67. Ja maksimālo koncentrāciju izraugās pēc citotoksicitātes, ar augstāko koncentrāciju būtu jācenšas panākt 20 līdz 10 % lielu RTG/RS. Pastāv vienprātība par to, ka jābūt piesardzīgiem, interpretējot vienīgi 20 līdz 10 % RTG/RS robežās esošos pozitīvos rezultātus, un rezultāts nebūtu jāuzskata par pozitīvu, ja MF palielinājums (ja vērtēts) ir tik tikko 10 % RTG/RS līmenī vai mazāks par to (2)(59).

68. Ja nav kultūras, kas uzrādītu 10–20 % lielu RGT/RS, noteikt, vai testējamā ķimikālija ir mutagēna, zināmos apstākļos var palīdzēt papildu informācija. Šīs situācijas ir šādas: 1) datu punktu rindas no 100 % līdz 20 % RTG/RS robežās nedod mutagenitātes pierādījumus (t. i., nav konstatējama atbildreakcijas atkarība no devas, mutantu biežums nav lielāks kā paralēlajā negatīvajā kontrolē vai vēsturiskajos fona diapazonos u. c.), un vismaz viens datu punkts atrodas 20 līdz 25 % RTG/RS robežās; 2) datu punktu rindas no 100 % līdz 25 % RTG/RS robežās nedod mutagenitātes pierādījumus (t. i., nav konstatējama atbildreakcijas atkarība no devas, mutantu biežums nav lielāks kā paralēlajā negatīvajā kontrolē vai vēsturiskajos fona diapazonos u. c.), un ir arī viens negatīvs datu punkts nedaudz zem 10 % RTG/RS līmeņa. Abās šajās situācijās var secināt, ka testējamā ķimikālija ir negatīva.

69. Nepārprotami pozitīva vai negatīva atbildreakcija nav obligāti jāverificē.

70. Ja atbildreakcija nav atbilstoši iepriekš rakstītajam nedz nepārprotami negatīva, nedz nepārprotami pozitīva un/vai lai rezultāta bioloģiskais relevantums būtu labāk nosakāms, šie dati jāizvērtē ekspertam un/vai jāturpina pētīt. Var būt lietderīgi izdarīt atkārtotu eksperimentu ar modificētiem nosacījumiem [piem., koncentrācijas intervāliem, kas palielinātu varbūtību iegūt datu punktus 10–20 % RTG/RS diapazonā, atšķirīgi metaboliskās aktivācijas nosacījumi (proti, S9 koncentrācija vai S9 avots) un apstrādes ilgums].

71. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izpētes datu kopums neļauj izdarīt slēdzienu par pozitīviem vai negatīviem rezultātiem. Tāpēc būtu jāsecina, ka testējamās ķimikālijas atbildreakcija bijusi neskaidra (to vienlīdz varbūtīgi ir interpretēt gan kā pozitīvu, gan kā negatīvu).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

72. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja zināma,

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota.

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums,

— šķīdinātāja īpatsvars galīgajā kultūras barotnē.

Šūnas:

Laboratorijas izejkultūru gadījumā:

— šūnu tips un avots un to vēsture testēšanas laboratorijā,

— kariotipiskās īpašības un/vai modālais hromosomu skaits,

— šūnu kultūru uzturēšanas metodes,

— mikoplazmas neesība,

— šūnu dubultošanās laiks.

Testēšanas nosacījumi:

— koncentrāciju izvēles un šūnu kultūru skaita izraudzīšanās pamatojums, piem., dati par citotoksicitāti un šķīdības ierobežojumi,

— barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis,

— testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija kultūras barotnē (piem., kultūras barotnes µg vai mg/ml vai mM),

— kultūras barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums),

— inkubācijas temperatūra,

— inkubācijas laiks,

— apstrādes ilgums,

— šūnu blīvums apstrādes laikā,

— metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā kultūras barotnē, S9 kvalitātes kontroles),

— attiecībā uz katru no apstrādes nosacījumiem — pozitīvās un negatīvās kontroles vielas, galīgās koncentrācijas,

— fenotipiskās ekspresijas periods (norādot uzsēto šūnu skaitu, subkultūras un attiecīgā gadījumā barošanas grafiku),

— selektīvā aģenta identitāte un koncentrācija,

— MLA gadījumā norāda izmantoto versiju (agars vai mikroiedobes),

— testu pieņemamības kritēriji,

— dzīvotspējīgo šūnu un mutantšūnu skaitīšanas metodes,

— citotoksicitātes mērīšanas metodes,

— jebkāda citotoksicitātei un izmantotajai metodei relevanta papildinformācija,

— inkubācijas laiks pēc uzsēšanas,

— uzskaitīto koloniju lielums un veids (attiecīgā gadījumā norādot kritērijus, pēc kuriem kolonijas definē kā "mazas" vai "lielas"),

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

— par katru kultūru — apstrādāto šūnu un apakškultūrām izmantoto šūnu skaits,

— toksicitātes parametri (MLA gadījumā RTG, un TK6 gadījumā RS),

— izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks,

— selektīvā un neselektīvā barotnē uzsēto šūnu skaits,

— koloniju skaits neselektīvajā barotnē un rezistento koloniju skaits selektīvajā barotnē, saistītais mutantu biežums,

— koloniju lielums negatīvajā un pozitīvajā kontrolē un (ja testējamā ķimikālija ir pozitīva) vismaz pie vienas koncentrācijas un saistītais mutantu biežums,

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,

— paralēlo negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),

— vēsturisko negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji), norādot diapazonus, vidējās vērtības un standartnovirzes, vēsturisko kontroļu pamatā esošo testu skaits,

— statistiskās analīzes (par atsevišķām kultūrām un attiecīgā gadījumā par apkopotiem replikātiem) un p-vērtības, ja tādas ir. MLA gadījumā – arī GEF izvērtējums.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

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

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

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

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

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

(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. In: 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. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

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

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: [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.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneigēns: ķimikālija vai process, kas mijiedarbībā ar mitotiskā un mejotiskā šūnu dalīšanās cikla komponentiem izraisa šūnu vai organismu aneiploīdiju.

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Bāzu pāru maiņas mutagēni: ķimikālijas, kas izraisa DNS bāzu pāru maiņu.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Klonēšanās efektivitāte: to zemā blīvumā uzsēto šūnu procents, no kurām var izaugt pieskaitāma kolonija.

Klastogēns: ķimikālija vai process, kas šūnu vai organismu populācijās izraisa strukturālas hromosomu aberācijas.

Citotoksicitāte: attiecībā uz šīs testēšanas metodes aptverto ķīmisko analīzi citotoksicitāte ir relatīvā kopējā pieauguma (RTG) samazinājums MLA gadījumā vai relatīvās izdzīvotības (RS) samazinājums TK6 gadījumā.

Tieša mutācija: tāda gēna mutācija no vecāktipa uz mutantformu, kura maina vai izdzēš iekodētā proteīna fermentatīvo darbību vai tā funkciju.

Nolasīšanas fāzes nobīdes mutagēni: ķimikālijas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanos vai izzušanu.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp DNS pārrāvumus, aduktus, pārkārtojumus, mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai noturīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskā rekombinācija: mitozes laikā notiekoša homoloģisku hromatīdu rekombinācija, kuras rezultātā var inducēties DNS dubultpavedienu pārrāvumi vai zust heterozigotāte.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Mutantu biežums (MF): novēroto mutantšūnu skaita attiecība pret dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Fenotipiskās ekspresijas laiks: pēcapstrādes laiks, kad ģenētiskā pārmaiņa nostiprinās genomā un jebkādi līdzšinējā gēna produkti izsīkst tiktāl, ka mainās arī fenotipiskā pazīme.

Relatīvā izdzīvotība (RS): RS attiecībā uz TK6 izmanto par apstrādes radīta citotoksicitātes mēru. Tā ir tūlīt pēc apstrādes uz platēm uzsētu šūnu relatīvā klonēšanās efektivitāte (CE) salīdzinājumā ar negatīvās kontroles klonēšanās efektivitāti.

Relatīvais suspensijas pieaugums (RSG): MLA gadījumā tas ir relatīvais kopējais suspensijas divdienu pieaugums testa kultūrā attiecībā pret kopējo suspensijas divdienu pieaugumu negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē (Clive and Spector, 1975). Ar RSG būtu jāizsaka testa kultūras un negatīvās/šķīdinātāja kontroles relatīvā pieauguma salīdzinājums apstrādes periodā.

Relatīvais kopējais pieaugums (RTG): RTG attiecībā uz MLA izmanto par apstrādes radītas citotoksicitātes mēru. Tas ir testa kultūru relatīvā pieauguma mērs (salīdzinājumā ar nesēja kontroli) noteiktās testa fāzēs, proti, apstrādē, divu dienu ilgajā ekspresijas laikā un atlasīšanai vajadzīgo mutantu klonēšanā. Katras testa kultūras RSG tiek reizināts ar testa kultūras relatīvo klonēšanas efektivitāti mutantu atlasīšanas laikā un izteikts attiecībā pret klonēšanas efektivitāti negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē (Clive and Spector, 1975).

Aknu S9 frakcijas: aknu homogenāta supernatants pēc centrifugēšanas pie 9 000 g, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: aknu S9 frakcijas un metaboliskajai fermentatīvajai darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Suspensijas pieaugums (SG): MLA apstrādes un ekspresijas fāzes laikā konstatētā šūnu skaita palielinājuma reižu skaits. Īslaicīgā (3–4 stundu ilgā) apstrādē SG tiek aprēķināts, reizinot palielinājuma reižu skaitu 1. dienā un palielinājuma reižu skaitu 2. dienā. Ja izmanto 24 stundu ilgu apstrādi, SG ir 24 stundu apstrādes laikā notikušā palielinājuma reižu skaits, reizināts ar ekspresijas 1. un 2. dienā notikušā palielinājuma reižu skaitu.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins, ar ko definē kontroles kultūras, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķimikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

2. papildinājums

FORMULAS

Citotoksicitāte

Abām (agara un mikroiedobju) MLA versijām

Citotoksicitāti definē kā relatīvo kopējo pieaugumu (RTG), un tas ietver relatīvo suspensijas pieaugumu (RSG) divu dienu ilgajā ekspresijas periodā un relatīvo klonēšanās efektivitāti (RCE), kuru nosaka mutantu atlases brīdī. Gan RTG, gan RSG un RCE izsaka procentuāli.

RSG aprēķināšana. Suspensijas pieaugums viens (SG_1) ir pieauguma temps laikā no 0. dienas līdz 1. dienai (šūnu koncentrācija 1. dienā, dalīta ar šūnu koncentrāciju 0. dienā), un suspensijas pieaugums divi (SG_2) ir pieauguma temps laikā no 1. dienas līdz 2. dienai (šūnu koncentrācija 2. dienā, dalīta ar šūnu koncentrāciju 1. dienā). RSG ir apstrādātās kultūras kopējais SG (SG_1 x SG_2) salīdzinājumā ar neapstrādāto/šķīdinātāja kontroli. Tas ir: RSG = $[SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}]$ / $[SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}]$. SG_1 aprēķināms no sākotnējās šūnu koncentrācijas, kas izmantota šūnu apstrādes sākumā. Šādā veidā tiek ņemta vērā šūnu apstrādes laikā testa kultūrās izveidojusies diferenciāla citotoksicitāte, ja tāda ir.

RCE ir testa kultūras relatīvā klonēšanās efektivitāte mutantu atlasīšanas brīdī attiecībā pret klonēšanās efektivitāti negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē.

Relatīvais kopējais pieaugums (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Relatīvā izdzīvotība (RS)

Citotoksicitāti vērtē pēc relatīvās izdzīvotības, t. i., pēc tā, kāda ir tūlīt pēc apstrādes uzsētu šūnu klonēšanās efektivitāte (CE), kas koriģēta pēc jebkāda šūnu zuduma apstrādes laikā, salīdzinājumā ar klonēšanās efektivitāti negatīvajās kontrolēs (tajās konstatēto izdzīvotību pieņem par 100 %). Ar apstrādes laikā radušos šūnu zudumu saistīto korekciju var aprēķināt šādi:

$$\text{Koriģētā CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutantu biežums attiecībā uz MLA un uz TK6

Mutantu biežums (MF) ir mutantkoloniju klonēšanās efektivitāte selektīvā barotnē (CE_M), kas koriģēta pēc klonēšanās efektivitātes neselektīvā barotnē mutantu atlasīšanas brīdī (CE_V), respektīvi, MF=CE_M/CE_V. Zemāk aprakstīts, kā šīs divas klonēšanās efektivitātes aprēķināmas agara un mikroiedobju metodes gadījumā.

MLA agara versija. MLA mīkstā agara versijā koloniju skaitu uz mutantu atlasīšanas plates (C_M) un koloniju skaitu uz atlasīšanai neparedzētās jeb klonēšanās efektivitātes (dzīvotspējas uzskaites) plates (C_V) nosaka, tiešā veidā saskaitot klonus. Ja klonēšanās efektivitātes (CE) vajadzībai uz mutantu atlasīšanas (CE_M) platēm un uz atlasīšanai neparedzētām jeb klonēšanas efektivitātes (dzīvotspējas uzskaites) platēm (CE_V) uzsēj 600 šūnas un mutantu atlasīšanai izmanto 3×10^6 šūnas,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA un TK6 mikroiedobju versija. MLA mikroiedobju versijā C_M un C_V tiek noteikta, reizinot mikroiedobju kopskaitu (TW) un to koloniju varbūtīgo skaitu, kas ir katrā mikroiedobju plates iedobē (P).

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Pēc Puasona sadalījuma (Furth et al., 1981) nulles terma P iegūst šādi:

$$P = - \ln (EW / TW),$$

kur EW ir tukšās iedobes un TW ir iedobju kopskaits. Tādējādi

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Mazo un lielo koloniju mutantu biežumu MLA mikroiedobju versijā aprēķina tieši tāpat, tukšo iedobju skaitu attiecinot uz mazajām un lielajām kolonijām.

TK6 gadījumā mazo un lielo koloniju mutantu biežumu nosaka, pamatojoties uz agrīnajiem un vēlīnajiem mutantiem.

B.68. ĪSA EKSPOZĪCIJAS LAIKA IN VITRO TESTĒŠANAS METODE, AR KURU IDENTIFICĒT i) ĶIMIKĀLIJAS, KAS IZRAISA NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, UN ii) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ KĀ ACU KAIRINĀJUMA VAI NOPIETNU ACU BOJĀJUMU IZRAISĪTĀJAS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 491 (2017) aprakstītajam. Īsa ekspozīcijas laika (*STE*) testēšanas metode ir *in vitro* metode, kuru noteiktos apstākļos un ar zināmiem ierobežojumiem var lietot tādu ķimikāliju (vielu un maisījumu) bīstamības klasificēšanai un marķēšanai, kas izraisa nopietnus acu bojājumus vai kuras nav jāklasificē kā nopietnu acu bojājumu vai acu kairinājuma izraisītājas, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]).

2. Ilgus gadus ķimikāliju potenciālā bīstamība acīm tikusi vērtēta galvenokārt ar truša acu *in vivo* testu (TM B.5 (8), ekvivalents OECD TG 405). Ir vispārpieņemts, ka pārskatāmā nākotnē neviens atsevišķs alternatīvs *in vitro* tests nespēs pilnībā aizstāt truša acu *in vivo* testu, ar kuru var prognozēt pilnu nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakciju spektru un vienlaikus aptvert dažādas ķīmisko vielu klases. Tomēr truša acu testu varētu būt iespējams pilnībā aizstāt, (pakāpjveida) testēšanā stratēģiski kombinējot alternatīvas testēšanas metodes (2). Ar lejupēju pieeju tiktu testētas ķimikālijas, par kurām ir informācija, ka tās ir potenciāli ļoti kairinošas acīm vai izraisa nopietnus acu bojājumus. Ar augšupēju pieeju turpretim testētu ķimikālijas, par kurām ir informācija, ka tās acīm nav tik kairinošas, lai būtu jāklasificē. Kaut arī *STE* testēšanas metodi nevar uzskatīt par pilnīgu truša acu *in vivo* testa aizstājēju, normatīvām vajadzībām veiktas klasificēšanas un marķēšanas kontekstā tā ir piemērota izmantošanai tādā pakāpjveida testēšanas stratēģijā kā augšupējā/lejupējā pieeja un ļauj bez turpmākas testēšanas identificēt i) ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija), un ii) ķimikālijas (izņemot ļoti gaistošas vielas un visas cietās ķimikālijas, kas nav virsmaktīvās vielas), kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas) (1)(2). Tomēr, ja ar *STE* testēšanas metodi ķimikālija netiek klasificēta kā nopietnu acu bojājumu izraisītāja (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) vai kā ANO GHS / *CLP* nekategorizēta ķimikālija (neizraisa nopietnus acu bojājumus vai acu kairinājumu), būs vajadzīga papildu testēšana, lai noteiktu galīgo klasifikāciju. Turklāt, pirms ar augšupēju pieeju *STE* testēšanas metodi izmantot klasifikācijas shēmā, kas nav ANO GHS / *CLP*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm. Piemērotākās testēšanas metodes izvēle un šīs testēšanas metodes izmantošana jāskata kontekstā ar ESAO Norādījumu dokumentu par integrētu pieeju nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma testēšanā un novērtēšanā [*OECD Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation*] (14).

3. Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm izvērtētu pēc tās spējas inducēt citotoksicitāti, ja pielieto īsa ekspozīcijas laika testēšanas metodi. Ķimikāliju citotoksiskā iedarbība uz radzenes epitēlijšūnām ir nozīmīga veida iedarbība (*MOA*), kas izraisa radzenes epitēlijšūnu bojājumus un acu kairinājumu. Šūnu dzīvotspēju ar *STE* testēšanas metodi novērtē pēc tā, cik lielā mērā vitālo krāsvielu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijbromīds, saukts arī par tiazolilzilo tetrazolijbromīdu) dzīvās šūnas fermentatīvi pārvērš par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu šūnu ekstraktā nosaka kvantitatīvi (3). Iegūto šūnu dzīvotspēju salīdzina ar šķīdinātāja kontroli (relatīvā dzīvotspēja) un izmanto, lai aplēstu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm. Ja gan ar 5 %, gan ar 0,05 % koncentrāciju iegūtā šūnu dzīvotspēja ir mazāka par vai vienāda ar (≤) 70 %, testējamo ķimikāliju klasificē ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā. Ja turpretim gan ar 5 %, gan ar 0,05 % koncentrāciju iegūtā šūnu dzīvotspēja ir lielāka par (>) 70 %, pieņem, ka testējamo ķimikāliju nav vajadzības kategorizēt ANO GHS / *CLP* sistēmā.

4. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, bez sasaistes ar *STE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Definīcijas dotas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

5. Šīs testēšanas metodes pamatā ir Kao korporācijas izstrādātais protokols (4), kas izvērtēts divos dažādos validācijas pētījumos: vienu no tiem veikusi Japānas Dzīvniektestēšanas alternatīvu sabiedrība (*JSAAE*) (5), bet otru – Japānas

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

Alternatīvo metožu validācijas centrs (*JaCVAM*) (6). Pamatojoties uz šo validācijas pētījumu pārskatiem un citiem testēšanas metodi pamatojošiem dokumentiem, zinātnisko recenzēšanu veica *NICEATM/ICCVAM* (7).

6. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja, lai identificētu ķimikālijas (vielas un maisījumus), kas izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) (1), iegūtie dati par 125 ķimikālijām (gan vielām, gan maisījumiem) salīdzinājumā ar truša acu *in vivo* testu uzrādīja kopējo pareizību 83 % (104/125), pseidopozitīvu īpatsvaru 1 % (1/86) un pseidonegatīvu īpatsvaru 51 % (20/39) (7). Uzrādītais pseidonegatīvu īpatsvars šajā kontekstā nav kritiski svarīgs, jo visas testējamās ķimikālijas, kuru inducētā šūnu dzīvotspēja pie 5 % koncentrācijas ir ≤ 70 % un pie 0,05 % koncentrācijas > 70 %, vēlāk tiks testētas ar citām pienācīgi validētām *in vitro* testēšanas metodēm vai – kritiskā gadījumā – ar truša acu *in vivo* testu, izvēli izdarot atkarībā no normatīvajām prasībām un saskaņā ar patlaban ieteiktajām secīgas testēšanas stratēģijas un pierādījumu izsvēršanas pieejām (1) (8). Testētas tika galvenokārt vienkomponenta vielas, bet ir arī ierobežots daudzums datu par maisījumu testēšanu. Daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanā šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama. Tomēr pirms tās izmantošanas maisījuma testēšanai, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā klasificējamu testējamo ķimikāliju identificēšanai, nekādus citus īpašus trūkumus tā neuzrādīja. Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu ar testējamajām ķimikālijām, un tā tiktu pieņemts, ka šūnu dzīvotspēja ≤ 70 % gan pie 5 %, gan pie 0,05 % koncentrācijas uzrāda nopietnus acu bojājumus inducējošu atbildreakciju, un ķimikālija bez turpmākas testēšanas būtu jāklasificē ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā.

7. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja, lai identificētu ķimikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (t. i., ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), iegūtie dati par 130 ķimikālijām (gan vielām, gan maisījumiem) salīdzinājumā ar truša acu *in vivo* testu uzrādīja kopējo pareizību 85 % (110/130), pseidonegatīvu īpatsvaru 12 % (9/73) un pseidopozitīvu īpatsvaru 19 % (11/57) (7). Ja no datu kopas izslēdz ļoti gaistošas vielas un cietas vietas, kas nav virsmaktīvās vielas, kopējā pareizība pieaug līdz 90 % (92/102), pseidonegatīvu īpatsvars sarūk līdz 2 % (1/54) un pseidopozitīvu īpatsvars saglabājas 19 % (9/48) (7) Sekas ir tādas, ka tad, ja *STE* tiek izmantota, lai identificētu testējamās ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), metodes potenciālie trūkumi ir liels pseidonegatīvu īpatsvars i) ļoti gaistošām vielām ar tvaika spiedienu virs 6 kPa un ii) cietām ķimikālijām (vielām un maisījumiem), kas nav virsmaktīvās vielas un maisījumi, kuru sastāvā ir vienīgi virsmaktīvās vielas. Šādas ķimikālijas ir izslēgtas no *STE* testēšanas metodes piemērojamības jomas (7).

8. Papildus 6. un 7. punktā minētajām ķimikālijām ar *STE* testēšanas metodi ģenerētajā datu kopā ietilpst arī pašmāju dati par 40 maisījumiem. Šie dati, kad tos salīdzināja ar Dreiza [*Draize*] *in vivo* acu testa spēju paredzēt, kuri maisījumi nav jāklasificē ANO GHS / *CLP* klasifikācijas sistēmā, uzrādīja pareizību 88 % (35/40), pseidopozitīvu īpatsvaru 50 % (5/10) un pseidonegatīvu īpatsvaru 0 % (0/30) (9). Tāpēc *STE* metodi var izmantot, lai ar augšupēju pieeju identificētu identificētu maisījumus kā ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas. Tāpat kā cieto vielu gadījumā, izņēmums ir cietie maisījumi, ja vien tie pilnībā nesastāv no virsmaktīvajām vielām. Turklāt, lai nepieļautu to, ka ķimikālijas kaitīgums tiek paredzēts nepietiekami, ar sevišķu rūpību jāvērtē maisījumi, kuru sastāvā ir vielas ar tvaika spiedienu virs 6 kPa, un iegūtie rezultāti jāpamato katrā atsevišķā gadījumā.

9. Tā kā ar *STE* testēšanas metodi daudzas ANO GHS / *CLP* 1. kategorijas ķimikālijas tiek nepietiekami stingri novērtētas, ierindojot tās 2., 2A vai 2B kategorijā, savukārt daudzas ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas tiek novērtētas pārlieku stingri, tāpat ierindojot tās 2., 2A vai 2B kategorijā, *STE* testēšanas metodi nevar izmantot, lai testējamās ķimikālijas identificētu kā tādas, kas ietilpst ANO GHS / *CLP* 2.kategorijā vai ANO GHS / *CLP* 2A kategorijā (acu kairinājums) vai 2B kategorijā (viegls acu kairinājums) (7). Tālab var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.

10. *STE* testēšanas metode ir derīga testējamajām ķimikālijām, kuras izšķīdinātas vai vismaz 5 minūšu ilgumā vienmērīgi suspendētas fizioloģiskajā šķīdumā, 5 % dimetilsulfoksīda (DMSO), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, vai minerāleļļā. *STE* testēšanas metode nav derīga testējamajām ķimikālijām, kuras ir nešķīstošas vai kuras nevar vismaz 5 minūšu ilgumā vienmērīgi suspendēt fizioloģiskajā šķīdumā, 5 % DMSO, kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, vai minerāleļļā. Minerāleļļu *STE* testēšanas metodē ir iespējams izmantot tāpēc, ka ekspozīcijas laiks ir īss. Tāpēc *STE* testēšanas metode ir piemērota, lai paredzētu ūdenī nešķīstošu testējamo ķimikāliju (piem., garķēdes alifātisko spirtu vai ketonu) potenciālo bīstamību acīm, ja vien šīs ķimikālijas ir iespējams iejaukt kādā no trijiem iepriekš nosauktajiem šķīdinātājiem.

11. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts ([1]), bez sasaistes ar *STE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā.

TESTA PRINCIPS

12. *STE* testēšanas metode ir uz citotoksicitātes principa pamatota *in vitro* ķīmiskā analīze, kuru veic uz saplūstoša *SIRC* (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) šūnu monoslāņa, kas kultivēts uz 96 mikroiebobju polikarbonāta platēm (4). Testējamajai ķimikālijai ļauj iedarboties piecas minūtes, un tad, izmantojot MTT ķīmisko analīzi, citotoksicitāti kvantitatīvi izmēra *SIRC* šūnu relatīvās dzīvotspējas izteiksmē (4). Pēc konstatētā šūnu dzīvotspējas samazinājuma paredz potenciālo nelabvēlīgo ietekmi, kas var izraisīt acs bojājumus.

13. Ir zināms, ka 80 % no truša acī iepilinātā šķīduma trīs līdz četru minūšu laikā tiek izvadīti caur konjunktīvas maisu, bet cilvēka gadījumā vienas līdz divu minūšu laikā šādā veidā tiek izvadīti vairāk nekā 80 % iepilinātā šķīduma (10). Ar *STE* testēšanas metodi ir mēģināts tuvināties šiem ekspozīcijas laikiem, un citotoksicitāte tiek izmantota par beigupunktu, lai novērtētu kaitējumu, kas *SIRC* šūnām nodarīts piecās minūtēs, kuru laikā uz tām iedarbojusies testējamā ķimikālija.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

14. Pirms šeit aprakstīto *STE* testēšanas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 1. tabulā ieteiktās 11 vielas. Šīs vielas izraudzītas tā, lai būtu pārstāvēts pilns nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma atbildreakciju spektrs, kas noteikts ar truša acu *in vivo* testiem (TG-405) un atbilst ANO GHS / *CLP* klasifikācijas sistēmai (1). Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība, kvalitatīvu *in vivo* references datu pieejamība un kvalitatīvu ar *STE* testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība (3). Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati, ja vien tiek izmantoti šeit aprakstītie kritēriji.

1. tabula

Standartvielu saraksts

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregāt-stāvoklis	*In vivo* ANO GHS / *CLP* Kat. ([2])	Šķīdinātājs *STE* testā	*STE* ANO GHS / *CLP* Kat.
Benzalkonija hlorīds (10 %, ūdens šķīdums)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidrs	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija

([1]) 2013. gada jūnijā kopīgajā sanāksmē tika panākta vienošanās jaunajās un atjauninātajās testēšanas metodēs, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai turpmāk konsekventāk lietot apzīmējumu "testējamā ķimikālija".

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregāt-stāvoklis	*In vivo* ANO GHS / *CLP* Kat. ([2])	Šķīdinātājs *STE* testā	*STE* ANO GHS / *CLP* Kat.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ēteris	Šķidrs	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Acid Red 92	18472-87-2	Heterociklisks savienojums; bromīn-savienojums; hlorīnsavienojums	Ciets	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Nātrija hidroksīds	1310-73-2	Sārms; neorganiska ķīmiska viela	Ciets	1.kategorija ([3])	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Butirolaktons	96-48-0	Laktons; heterociklisks savienojums	Šķidrs	2A kategorija (*CLP* 2.kategorija)	Fizioloģiskais šķīdums	Nav iespējams prognozēt
1-oktanols	111-87-5	Spirts	Šķidrs	2A/B kategorija ([4]) (*CLP* 2.kategorija)	Minerāleļļa	Nav iespējams prognozēt
Ciklopentanols	96-41-3	Spirts; ogļūdeņradis, ciklisks	Šķidrs	2A/B kategorija ([5]) (*CLP* 2.kategorija)	Fizioloģiskais šķīdums	Nav iespējams prognozēt
2-etoksietilacetāts	111-15-9	Spirts; ēteris	Šķidrs	Nekategorizēts	Fizioloģiskais šķīdums	Nekategorizēts
Dodekāns	112-40-3	Ogļūdeņradis, aciklisks	Šķidrs	Nekategorizēts	Minerāleļļa	Nekategorizēts
Metilizobutilketons	108-10-1	Ketons	Šķidrs	Nekategorizēts	Minerāleļļa	Nekategorizēts

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregāt-stāvoklis	*In vivo* ANO GHS / *CLP* Kat. ([2])	Šķīdinātājs *STE* testā	*STE* ANO GHS / *CLP* Kat.
1,1-dimetilguanidīnsulfāts	598-65-2	Amidīns; sēra savienojums	Ciets	Nekategorizēts	Fizioloģiskais šķīdums	Nekategorizēts

([1]) Ķīmiskās klases piešķirtas, vadoties pēc informācijas no agrākajām *NICEATM* publikācijām un, ja tādas nebija pieejamas, vadoties pēc ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatora (MeSH®) (ar ChemIDplus® [Nacionālās medicīnas bibliotēkas] starpniecību; pieejama http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) un pēc *NICEATM* noteiktajām struktūrām.

([2]) Pamatojoties uz truša acu *in vivo* testa (ESAO TG 405) rezultātiem un izmantojot ANO GHS / *CLP* sistēmu (1).

([3]) Klasificēšana 1. kategorijā izdarīta, pamatojoties uz 100 % nātrija hidroksīda (ESAO TG 435 norādīts kā ādas koroziju izraisīt-spējīga standartviela) korozīvo potenciālu ādai un uz kritēriju iekļaušanai ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā (1).

([4]) Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 2 no 6 dzīvniekiem vai 4 no 6 dzīvniekiem. *In vivo* datu kopa aptvēra 2 pētījumus ar 3 dzīvniekiem katrā. Vienā pētījumā 7. dienā ietekme bija novērojama 2 no 3 dzīvniekiem, un tas dod pamatu klasificēšanai 2A kategorijā (11), bet otrā pētījumā visi beigupunkti visiem 3 dzīvniekiem līdz 7. dienai no jauna atradās kaitējuma nulles līmenī, un tas dod pamatu klasificēšanai 2B kategorijā (12).

([5]) Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot radzenes apduļķojumu un konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai agrāk atgriezās kaitējuma nulles līmenī. Dzīvniekam, kurš līdz 7. dienai nebija pilnībā atlabis, 7. dienā radzenes apduļķojuma rādītājs bija 1 un konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1, taču ietekme pilnībā pazuda 11. dienā.

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs.

PROCEDŪRA

Šūnu monoslāņa sagatavošana

15. *STE* testēšanas metodē jāizmanto truša radzenes (*SIRC*) šūnu līnija. *SIRC* šūnas ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas *CCL60*.

16. *SIRC* šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO_2 un mitrinātā atmosfērā kultivēšanas kolbā ar kultūras barotni, kura sastāv no Īgla minimālās barotnes (*MEM*), kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FBS*), 2 mM *L*-glutamīna, 50–100 vienībām/ml penicilīna un 50–100 µg/ml streptomicīna. Kultivēšanas kolbā kofluējušās šūnas jāatdala, izmantojot tripsīna-etilēndiamīntetraetiķskābes šķīdumu. Atdalīšanai var lietot šūnu skrāpi. Pirms šūnas izmantot rutīnas testiem, kultivēšanas kolbā tās jāpavairo (piem., 2–3 pārsējumos). Pēc atkausēšanas šūnas nebūtu jāpavairo vairāk kā 25 pārsējumos.

17. Pēc tam izmantošanai *STE* testā gatavās šūnas sagatavo attiecīgā šūnu slāņa biezumā un uzsēj uz 96 iedobju mikrotitrēšanas plates. Ieteicamais šūnu uzsēšanas blīvums ir $6{,}0 \times 10^3$ šūnas uz vienu iedobi, ja šūnas lieto četras dienas pēc uzsēšanas, vai $3{,}0 \times 10^3$ šūnas uz vienu iedobi, ja šūnas lieto piecas dienas pēc uzsēšanas, pie kultivēšanas tilpuma 200 µl. *STE* testā izmantojamās šūnas, kas kultūras barotnē uzsētas atbilstošā biezumā, līdz testēšanas brīdim, t. i., četrās vai piecās dienās pēc uzsēšanas, sasniegs vairāk nekā 80 % kofluenci.

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu aplicēšana

18. Vēlamākais šķīdinātājs, kurā izšķīdināt vai suspendēt testējamo ķimikāliju, ir fizioloģiskais šķīdums. Ja testējamā ķimikālija ir mazšķīstoša vai vismaz uz piecām minūtēm nevar tikt vienmērīgi izšķīdināta vai suspendēta fizioloģiskajā šķīdumā, otrā labākā izvēle ir 5 % DMSO (CAS Nr. 67-68-5), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. Ja testējamā ķimikālija vismaz uz piecām minūtēm nevar tikt vienmērīgi izšķīdināta vai suspendēta ne fizioloģiskajā šķīdumā, ne 5 % DMSO, kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, nākamā izvēle ir minerāleļļa (CAS Nr. 8042-47-5).

19. Izvēlētajā šķīdinātājā testējamo ķimikāliju vienmērīgi izšķīdina vai suspendē 5 % (masa/masa) koncentrācijā un pēc tam, izmantojot sērijveida 10-kārtēju atšķaidījumu, atšķaida līdz 0,5 % un 0,05 % koncentrācijai. Katra testējamā ķimikālija jātestē gan 5 %, gan 0,05 % koncentrācijā. Uz 96 iedobju plates kultivētās šūnas katrā iedobē piecas minūtes istabas temperatūrā eksponē 200 mikrolitriem (µl) testējamās ķimikālijas šķīduma (vai suspensijas), kuras koncentrācija ir 5 % vai 0,05 %. Testējamās ķimikālijas (vienkomponenta vielas, daudzkomponentu vielas vai maisījumus) uzskata par tīrām vielām un neatkarīgi no to patiesās tīrības atšķaida vai suspendē saskaņā ar aprakstīto metodi.

20. Katrā atkārtojumā uz katras plates par barotnes kontroli izmanto 16. punktā aprakstīto kultūras barotni. Turklāt katrā atkārtojumā uz katras plates šūnas jāeksponē arī šķīdinātāja kontroles paraugiem. Ir pierādīts, ka 18. punktā aprakstītajiem šķīdinātājiem nav kaitīgas ietekmes uz *SIRC* šūnu dzīvotspēju.

21. *STE* testēšanas metodē par pozitīvo kontroli katrā atkārtojumā uz katras plates jāizmanto 0,01 % nātrija laurilsulfāts (SLS), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. Lai varētu aprēķināt šūnu dzīvotspēju pozitīvajā kontrolē, katrā atkārtojumā uz katras plates jāiekļauj arī fizioloģiskā šķīduma kontrole.

22. Lai noteiktu, kā kompensēt optisko blīvumu, būs vajadzīgs tukšais paraugs, un to pielieto iedobēm, kurās ir tikai fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas nesatur kalciju un magniju (PBS-) vai šūnas.

23. Ikviens paraugs (testējamā ķimikālija 5 % un 0,05 % koncentrācijā, barotnes kontrole, šķīdinātāja kontrole un pozitīvā kontrole) jātestē trīs reizes katrā atkārtojumā, uz piecām minūtēm istabas temperatūrā šūnas eksponējot 200 mikrolitriem attiecīgās testējamās vai kontroles ķimikālijas.

24. Etalonvielas ir lietderīgi izmantot, lai novērtētu kādai konkrētai ķimikāliju vai produktu klasei piederīgas nezināmas ķimikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai arī lai novērtētu kāda acu kairinātāja relatīvo spēju izsaukt noteiktas intensitātes atbildreakciju uz kairinājumu.

Šūnu dzīvotspējas mērīšana

25. Pēc eksponēšanas šūnas divreiz mazgā ar 200 µl PBS un tad pievieno 200 µl MTT šķīduma (0,5 mg MTT uz mililitru kultūras barotnes). Pēc divu stundu ilga reakcijas laika inkubatorā (37 °C, 5 % CO_2) dekantē MTT šķīdumu, tad MTT formazānu ekstrahē, uz 60 minūtēm istabas temperatūrā tumsā pievienojot 200 mikrolitrus (µl) 0,04 N sālsskābes ar izopropanolu, un pie 570 nm ar mikroplašu lasītāju izmēra MTT formazāna šķīduma absorbciju. Testējamo ķimikāliju interference ar MTT ķīmisko analīzi (ar krāsvielām vai tiešiem MTT reducētājiem) rodas tikai tad, ja pēcekspozīcijas skalošanas laikā no testa sistēmas paliek neizvadīts ievērojams daudzums testējamās ķimikālijas. Tas ir aktuāli gadījumā ar trīsdimensionālajiem rekonstruētas cilvēka radzenes vai rekonstruētas cilvēka epidermas audiem, bet neattiecas uz divdimensionālajām šūnu kultūrām, kuras izmanto *STE* testēšanas metodē.

Rezultātu interpretēšana un prognostiskais modelis

26. Par katru testējamo ķimikāliju iegūtās optiskā blīvuma (OB) vērtības izmanto, lai aprēķinātu šūnu dzīvotspēju salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontroli, kurai to pieņem par 100 %. Šūnu relatīvo dzīvotspēju izsaka ar procentuālo īpatsvaru, testējamās ķimikālijas OB dalot ar šķīdinātāja kontroles OB (iepriekš no abām vērtībām atņem tukšā parauga OB).

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570} of\ test\ chemical) - (OD_{570} of\ blank)}{(OD_{570} solvent\ control) - (OD_{570} of\ blank)} \times 100$$

Līdzīgā veidā šūnu relatīvo dzīvotspēju procentuāli izsaka katrai šķīdinātāja kontrolei, tās OB dalot ar barotnes kontroles OB (iepriekš no abām vērtībām atņem tukšā parauga OB).

27. Jāizdara trīs neatkarīgi atkārtojumi, katrs no tiem ar trijām replikāta iedobēm (t. i., n=9). Ar katras testējamās ķimikālijas un šķīdinātāja kontroles trijām iedobēm iegūto vidējo aritmētisko katrā neatkarīgajā atkārtojumā izmanto, lai aprēķinātu šūnu relatīvās dzīvotspējas vidējo aritmētisko vērtību. Šūnu dzīvotspējas galīgo vidējo aritmētisko vērtību aprēķina no visiem trijiem neatkarīgajiem atkārtojumiem.

28. Tālāk norādītas šūnu dzīvotspējas robežvērtības tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija), un arī tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acīm kairinošas vai nopietnus acu bojājumus izraisošas (ANO GHS / *CLP* nekategorizētās ķimikālijas).

2. tabula

STE testēšanas metodes prognostiskais modelis

Šūnu dzīvotspēja		ANO GHS / *CLP* klasifikācija	Piemērojamība
Pie 5 %	Pie 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Nekategorizēta	Vielas un maisījumi, izņemot: i) ļoti gaistošas vielas, kuru tvaika spiediens pārsniedz 6 kPa (1), un ii) cietas ķimikālijas (vielas un maisījumus), kas nav virsmaktīvās vielas vai maisījumi, kuri pilnībā sastāv no virsmaktīvām vielām
≤ 70%	> 70 %	Nav iespējams prognozēt	Nepiemēro
≤ 70%	≤ 70%	1. kategorija	Vielas un maisījumi (2)

(1) Maisījumus, kas satur vielas, kuru tvaika spiediens pārsniedz 6 kPa, jāizvērtē piesardzīgi, lai nepieļautu potenciālas bīstamības neprognozēšanu, un pamatojums jādod par katru atsevišķu gadījumu.

(2) Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti pamatā ar vienkomponenta vielām, lai gan pastāv arī ierobežots daudzums datu par maisījumu testēšanu. Tomēr šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Ja šo testēšanas metodi izmanto, lai testētu maisījumu, un testēšanas nolūks ir iegūt datus kādam normatīvajam mērķim, vispirms jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

Pieņemamības kritēriji

29. Testēšanas rezultātus uzskata par pieņemamiem, ja ir izpildīti visi zemāk nosauktie kritēriji.

a) (Kultūras barotnei eksponētās) barotnes kontroles optiskajam blīvumam, no kura atņemts tukšā parauga optiskais blīvums, jābūt 0,3 vai lielākam.

b) Šķīdinātāja kontroles dzīvotspējai attiecībā pret barotnes kontroli jābūt 80 % vai lielākai. Ja katrā atkārtojumā izmanto vairāku šķīdinātāju kontroles: lai ar šiem šķīdinātajiem testētās ķimikālijas būtu kvalificējamas, ikvienā no minētajām kontrolēm šūnu dzīvotspējai jābūt lielākai par 80 %.

c) Ar pozitīvo kontroli (0,01 % SLS) iegūtajai šūnu dzīvotspējai jābūt vēsturiskās vidējās vērtības divu standartnoviržu robežās. Pozitīvās kontroles augšējās un apakšējās pieņemamības robežvērtības būtu jāatjaunina regulāri, t. i., reizi trijos mēnešos vai ikreiz, kad tests ar pieņemamu rezultātu izdarīts laboratorijā, kur testēšana notiek neregulāri (t. i., retāk nekā reizi mēnesī). Ja laboratorijas veikto eksperimentu nav pietiekami daudz, lai iegūtu statistiski robustu pozitīvo kontroļu sadalījumu, ir pieņemami izmantot metodes izstrādātāja noteiktās augšējās un apakšējās pieņemamības robežvērtības, t. i., vērtības intervālā no 21,1 % līdz 62,3 % atkarībā no izstrādātāja laboratorijas vēsturiskajiem datiem, un pašiem savu sadalījumu izveidot pirmo rutīnas testu laikā.

d) Testējamās ķimikālijas 5 % un 0,05 % koncentrācijā trijos neatkarīgos atkārtojumos iegūtas galīgās šūnu dzīvotspējas standartnovirzei jābūt mazākai nekā 15 %.

Ja viens vai vairāki no šiem kritērijiem nav izpildīti, rezultātus atmet un izdara trīs citus neatkarīgus atkārtojumus.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

30. Pārskatā jāiekļauj dati par katru individuālo mikroiebobi (piem., šūnu dzīvotspējas vērtības) visos atkārtojumos, kā arī jānorāda kopējā vidējā vērtība, standartnovirze un klasifikācija.

Testēšanas pārskats

31. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles vielas

— Vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Agregātstāvoklis, gaistamība, pH, LogP, molekulmasa, ķīmiskā klase un citas pētījuma veikšanai relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

Testēšanas metodes nosacījumi un procedūras

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotās testēšanas metodes apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās avots, pasāžas numurs un testēšanā izmantoto šūnu konfluence

— Sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru

— Izmantoto atkārtojumu un replikātu skaits

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ja atšķiras no rekomendētajām)

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums

— Ar testējamo ķimikāliju saistītās ekspozīcijas ilgums (ja atšķiras no rekomendētā)

— Testēšanas procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmumpieņemšanas kritēriju apraksts

— Atsauce uz vēsturisko pozitīvo kontroles vidējo vērtību un standartnovirzi (SD)

— Apliecināta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes ilgstoša reproducējamība

Rezultāti

— Par katru testējamo ķimikāliju un kontroles vielu un par katru testēto koncentrāciju tabulā jānorāda individuālās OD vērtības katrā replikāta mikroiedobē, OD vidējās aritmētiskās vērtības katrā neatkarīgā atkārtojumā, procentuālā šūnu dzīvotspēja katrā neatkarīgā atkārtojumā un procentuālās šūnu dzīvotspējas galīgā vidējā aritmētiskā vērtība un SD, kas aptver trīs atkārtojumus

— Barotnes, šķīdinātāja un pozitīvās kontroles rezultāti pēc piemērotiem pētījuma pieņemamības kritērijiem

— Jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts

— Kopējā atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognostisko modeli un/vai lēmumpieņemšanas kritēriju

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".

(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.

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (13).

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju izmanto par standartu. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: i) konsekvents un uzticams avots vai avoti; ii) strukturāla un funkcionāla līdzība ar testējamās vielas klases vielām; iii) labi zināmas fizikālās un ķīmiskās īpašības; iv) apliecinoši dati par zināmajām ietekmēm un v) vielas zināmajai potencei jāatbilst vēlamās atbildreakcijas diapazonam.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs iznākums), no citām ķimikālijām (pozitīvs iznākums).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnībā atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko "atgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 2. kategorija.

Pseidonegatīvu īpatsvars: pozitīvā iznākuma ķimikāliju proporcija, kuras ar testēšanas metodi aplami noteiktas par negatīvām. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseidopozitīvu īpatsvars: negatīvā iznākuma ķimikāliju proporcija, kuras ar testēšanas metodi aplami noteiktas par pozitīvām. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

Barotnes kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai tādējādi noteiktu, vai šķīdinātājs un testa sistēma mijiedarbojas.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds.

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu viela tiek iegūta ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

OB: optiskais blīvums.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (10).

Ticamība: pakāpe, kādā vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc viena un tā paša protokola var ilgāku laiku reproducējami izmantot konkrētu testēšanas metodi. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (13).

Jutība: tas, cik liela proporcija no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (10).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko "neatgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 1. kategorija.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, to vidū šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (13).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Virsmaktīvā viela: viela, piem., detergents, kas spēj samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielas; to dēvē arī par mitrinātāju.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Secīgas testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinātājpotenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinātājpotenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, un to dara tik ilgi, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto testējamai ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (viņu vidū darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ANO GHS / *CLP* 1. kategorija: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

ANO GHS / *CLP* 2. kategorija: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas: Ķimikālijas, kas nav klasificētas ANO GHS / *CLP* 1. vai 2. kategorijā (vai ANO GHS 2A vai 2B kategorijā).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

B.69 REKONSTRUĒTA, CILVĒKA RADZENEI LĪDZĪGA EPITĒLIJA (*RhCE*) TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARĶĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 492 (2017) aprakstītajam. *Nopietni acu bojājumi* ir acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska, saskaņā ar Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizēto sistēmu (ANO GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulu (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP*) ([1]). Saskaņā ar ANO GHS un *CLP acu kairinājums* ir izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnībā atgriezeniskas. Testējamās ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, klasificē ANO GHS un *CLP* 1. kategorijā, bet testējamās ķimikālijas, kas izraisa acu kairinājumu, klasificē ANO GHS un *CLP* 2. kategorijā. Testējamās ķimikālijas, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar definīciju ir ķīmiskās vielas, kuras neatbilst priekšnosacījumiem klasificēšanai ANO GHS un *CLP* 1. vai 2. kategorijā (2A vai 2B), t. i., tās tiek uzskatītas par ANO GHS un *CLP* nekategorizētām ķimikālijām.

2. Nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki (TM B.5 (2)). Vispiemērotākās testēšanas metodes izvēle un šīs testēšanas metodes izmantošana jāskata ESAO Vadlīniju par integrētu pieeju nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma testēšanai un novērtēšanai (39) kontekstā.

3. Šajā testēšanas metodē aprakstīta *in vitro* procedūra, pēc kuras var noteikt ķimikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē un jāmarķē kā tādas, kas saskaņā ar ANO GHS un *CLP* izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Tajā izmanto rekonstruētu cilvēka radzenei līdzīgu epitēliju (*RhCE*), kura īpašības ļoti līdzinās cilvēka radzenes epitēlija histoloģiskajām, morfoloģiskajām, bioķīmiskajām un fizioloģiskajām īpašībām. Vēl četras *in vitro* testēšanas metodes ir apstiprinātas, uzskatāmas par zinātniski derīgām un pieņemtas kā TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) un B.68 (6), lai noteiktu cilvēka veselības beigupunktam atbilstošos nopietnos acu bojājumus / acu kairinājumu.

4. Šajā testēšanas metodē iekļauti divi apstiprināti testi, kuros izmanto komerciāli pieejamus *RhCE* modeļus. Validācijas pētījumi acu kairinājuma / nopietnu acu bojājumu novērtēšanai veikti (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) ar EpiOcular™ acu kairinājuma testu (*EIT*) un SkinEthic™ cilvēka radzenes epitēlija (*HCE*) acu kairinājuma testu (*EIT*). Katrā no šiem testiem par testa sistēmu izmanto komerciāli pieejamas *RhCE* audu konstrukcijas, tālāk tekstā tās sauktas par validētām references metodēm: attiecīgi *VRM1* un *VRM2*. No šiem validācijas pētījumiem un to neatkarīgajiem salīdzinošajiem izvērtējumiem (9)(12) secināja, ka ar EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* iespējams pareizi identificēt ķimikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē un jāmarķē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus saskaņā ar ANO GHS, un testus ieteica kā zinātniski derīgus šim nolūkam (13).

5. Patlaban ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviena atsevišķa *in vitro* testēšanas metode nevarēs pilnībā aizstāt Dreiza [*Draize*] *in vivo* acu testu (2)(14) un prognozēt visas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakcijas dažādām ķimikāliju klasēm. Tomēr Dreiza acu testu varētu būt iespējams pilnībā aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski kombinējot vairākas alternatīvas testēšanas metodes, piem., augšupēju/lejupēju pieeju (15). Augšupējā pieeja (15) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķimikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē, savukārt lejupējā pieeja (15) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķimikālija izraisīs nopietnus acu bojājumus. EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* ieteicams izmantot tādā testēšanas stratēģijā kā *Scott et al.* ierosinātā augšupējā/lejupējā pieeja, piemēram, par sākotnējo posmu

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

augšupējā pieejā vai kā vienu no pēdējiem posmiem lejupējā pieejā, tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķīmiskās vielas) bez papildu testēšanas nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (15). Taču EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* nav paredzēti ANO GHS / *CLP* 1. kategorijas (nopietni acu bojājumi) un ANO GHS / *CLP* 2. kategorijas (acu kairinājums) atšķiršanai. Šī diferenciācija būs jānosaka citā testēšanas stratēģijas pakāpē (15). Tāpēc testējamā ķimikālija, kura ar EpiOcular™ *EIT* vai SkinEthic™ *HCE EIT* identificēta par tādu, kas jāklasificē kā acu kairinājumu / nopietnus acu bojājumus izraisoša, jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai nonāktu pie galīgā secinājuma (ANO GHS / *CLP* nekategorizēta, 2. kategorijas vai 1. kategorijas ķimikālija), izmantojot, piem., TM B.47, B.48, B.61 vai B.68.

6. Šajā testēšanas metodē aprakstīta procedūra, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm, pamatojoties uz tās spēju izraisīt citotoksicitāti *RhCE* audu konstrukcijā, ko nosaka ar MTT ķīmisko analīzi (16) (sk. 21. punktu). *RhCE* audu dzīvotspēju pēc eksponēšanas testējamai ķimikālijai nosaka salīdzinājumā ar audiem, kas apstrādāti ar negatīvās kontroles vielu (% dzīvotspējas), pēc tam to izmanto, lai prognozētu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm.

7. Lai saskaņā ar ESAO Vadlīniju Nr. 34 (18) principiem būtu vieglāk validēt jaunus vai grozītus in vitro *RhCE* testus, kas līdzinās EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT*, un lai ESAO TG 492 būtu iespējams savlaicīgi grozīt ar mērķi tajā iekļaut šos testus, ir pieejami veiktspējas standarti (17). Attiecībā uz testiem, kas validēti saskaņā ar veiktspējas standartiem, datu savstarpējā atzīšana (*MAD*) saskaņā ar ESAO nolīgumu būs garantēta tikai tad, ja ESAO šos testus būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā.

DEFINĪCIJAS

8. Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

9. Šīs testēšanas metodes pamatā ir komerciālas trīsdimensiju *RhCE* audu konstrukcijas, ko ražo, izmantojot primāros cilvēka epidermas keratinocītus (t. i., EpiOcular™ *OCL*-200) vai imortalizētas cilvēka radzenes epitēlija šūnas (t. i., SkinEthic™ *HCE/S*). EpiOcular™ *OCL*-200 un SkinEthic™ *HCE/S RhCE* audu konstrukcijas ir līdzīgas *in vivo* radzenes epitēlija trīsdimensiju struktūrai, un tās ražo no pētāmās sugas šūnām (19)(20). Turklāt ar testiem tieši nosaka citotoksicitāti, ko izraisa ķimikālijas iekļūšana cauri radzenei un šūnu un audu bojājumu rašanās, pēc tam citotoksiskā atbildreakcija nosaka nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējo iznākumu *in vivo*. Šūnu bojājumus var izraisīt vairāki iedarbības veidi (sk. 20. punktu), taču citotoksicitātei ir svarīga vai pat primāra mehānistiska nozīme ķimikālijas izraisītas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējās atbildreakcijas noteikšanā, kas neatkarīgi no audu bojājumu pamatā esošiem fizikāli ķīmiskajiem procesiem *in vivo* izpaužas galvenokārt kā radzenes apduļķošanās, irīts, konjunktīvas apsārtums un/vai konjunktīvas hemoze.

10. Šīs testēšanas metodes pamatā esošajā validēšanas pētījumā testētas ļoti daudzas ķimikālijas, aptverot ļoti dažādus ķīmisko vielu veidus, ķīmisko vielu klases, molekulmasas, LogP, ķīmiskās struktūras utt. EpiOcular™ *EIT* validēšanas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 ķimikālijas, saskaņā ar ESAO *QSAR* instrumentu kopuma analīzi aptverot 95 dažādas organiskās funkcionālās grupas (8). Vairākums šo ķimikāliju bija vienkomponenta vielas, taču pētījumā bija iekļautas arī vairākas daudzkomponentu vielas (tostarp 3 homopolimēri, 5 kopolimēri un 10 kvazipolimēri). 113 testēto ķimikāliju sadalījums pēc agregātstāvokļa un ANO GHS / *CLP* kategorijām bija šāds: 131. kategorijas šķidrumi, 151. kategorijas cietvielas, 6 2A kategorijas šķidrumi, 102A kategorijas cietvielas, 7 2B kategorijas šķidrumi, 7 2B kategorijas cietvielas, 27 nekategorizēti šķidrumi un 28 nekategorizētas cietvielas (8). SkinEthic™ *HCE EIT* validēšanas datubāzē kopumā bija ietvertas 200 ķimikālijas, aptverot 165 dažādas organiskās funkcionālās grupas (8)(10)(11). Vairākums šo ķimikāliju bija vienkomponenta vielas, taču pētījumā bija iekļautas arī vairākas daudzkomponentu vielas (tostarp 10 polimēri). 200 testēto ķimikāliju sadalījums pēc agregātstāvokļa un ANO GHS / *CLP* kategorijām bija šāds: 271. kategorijas šķidrumi, 241. kategorijas cietvielas, 192A kategorijas šķidrumi, 102A kategorijas cietvielas, 9 2B kategorijas šķidrumi, 8 2B kategorijas cietvielas, 50 nekategorizēti šķidrumi un 53 nekategorizētas cietvielas (10)(11).

11. Šī testēšanas metode attiecas uz vielām un maisījumiem, kā arī uz cietām vielām, šķidrumiem, puscietām vielām un vaskiem. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietas vielas pirms aplicēšanas jāsamaļ smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Validēšanas pētījumā nav novērtētas gāzes un aerosoli. Kaut arī domājams, ka vispār ir iespējams tos testēt ar *RhCE* tehnoloģiju, ar pašreizējo testēšanas metodi gāzes un aerosolus testēt nevar.

12. Testējamās ķimikālijas, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes), un testējamās ķimikālijas, kas spēj tiešā veidā reducēt vitālo krāsvielu MTT (par MTT formazānu), var traucēt audu dzīvotspējas mērījumiem, un korekcijai jāizmanto pielāgotas kontroles. Iespējami nepieciešamo pielāgoto kontroļu veids atšķirsies atkarībā no testējamās ķimikālijas radītās interferences veida un MTT formazāna kvantitatīvai noteikšanai izmantotās procedūras (sk. 36.–42. punktu).

13. Pirmsvalidēšanas (21)(22) un pilnās validēšanas (8)(10)(11) pētījumos iegūtie rezultāti pierādījuši, ka EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* ir izmantojams laboratorijās, kurās iepriekš nav veikta ķīmiskā analīze, un tie ir reproducējami tajā pašā un citās laboratorijās. Pamatojoties uz šiem pētījumiem, prognožu konkordantuma reproducējamības līmenis, ko var sagaidīt no EpiOcular™ *EIT* no iegūtajiem datiem par 113 ķimikālijām, ir aptuveni 95 % tajā pašā laboratorijā un 93 % citās laboratorijās. Prognožu konkordantuma reproducējamības līmenis, ko var sagaidīt no SkinEthic™ *HCE EIT* iegūtajiem datiem par 120 ķimikālijām, ir aptuveni 92 % tajā pašā laboratorijā un 95 % citās laboratorijās.

14. EpiOcular™ *EIT* var izmantot tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Ņemot vērā validēšanas pētījumā (8) iegūtos datus, EpiOcular™ *EIT* vispārējā pareizība ir 80 % (no datiem par 112 ķimikālijām), jutība ir 96 % (no datiem par 57 ķimikālijām), pseidonegatīvu īpatsvars ir 4 % (no datiem par 57 ķimikālijām), specifiskums ir 63 % (no datiem par 55 ķimikālijām) un pseidopozitīvu īpatsvars ir 37 % (no datiem par 55 ķimikālijām), salīdzinot ar truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14), kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu. Pētījumā, kurā ar EpiOcular™ *EIT* testēja 97 šķidrus agroķīmijas preparātus, pierādīja, ka šā veida maisījumu testēšanas metodes veiktspēja ir līdzīga validēšanas pētījuma veiktspējai (23). 97 preparātu sadalījums bija šāds: 211. kategorijas, 192A kategorijas, 142B kategorijas un 43 nekategorizēti, kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu atbilstoši truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14). Ieguva vispārējo pareizību 82 % (no datiem par 97 preparātiem), jutību 91 % (no datiem par 54 preparātiem), pseidonegatīvu īpatsvaru 9 % (no datiem par 54 preparātiem), specifiskumu 72 % (no datiem par 43 preparātiem) un pseidopozitīvu īpatsvaru 28 % (no datiem par 43 preparātiem) (23).

15. SkinEthic™ *HCE EIT* var izmantot tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Ņemot vērā validēšanas pētījumā (10)(11) iegūtos datus, SkinEthic™ *HCE EIT* vispārējā pareizība ir 84 % (no datiem par 200 ķimikālijām), jutība ir 95 % (no datiem par 97 ķimikālijām), pseidonegatīvu īpatsvars ir 5 % (no datiem par 97 ķimikālijām), specifiskums ir 72 % (no datiem par 103 ķimikālijām) un pseidopozitīvu īpatsvars ir 28 % (no datiem par 103 ķimikālijām), salīdzinot ar truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14), kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu.

16. Ar abiem *RhCE* testiem vielām vai maisījumiem iegūtais pseidonegatīvu īpatsvars atbilst 12 % kopējās varbūtības, ka atkārtotā testēšanā ar *in vivo* Dreiza acu testu ķimikālijas tiek identificētas kā ANO GHS un *CLP* 2. kategorijas vai ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas; tā iemesls ir metodei raksturīgā mainība viena testa ietvaros (24). Ar abām *RhCE* testēšanas metodēm vielām vai maisījumiem iegūtajam pseidopozitīvu īpatsvaram šīs testēšanas metodes

kontekstā nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu pakāpjveida testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuras rada audu dzīvotspēju, kas atbilst noteiktajām robežvērtībām vai ir mazāka par tām (sk. 44. punktu), atkarībā no regulatīvajām prasībām būs jātestē papildus ar citām *in vitro* testēšanas metodēm vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem. Šīs testēšanas metodes var izmantot visu veidu ķimikālijām, negatīvu rezultātu pieņemot par norādi, ka ķimikālija nav jāklasificē kā tāda, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (ANO GHS un *CLP* nekategorizēta). Pirms EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* izmantošanas klasificēšanas shēmās, kas nav ANO GHS / *CLP*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm.

17. Šīs testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka ar to nevar atšķirt acu kairinājumu / atgriezenisku ietekmi uz acīm (2. kategorija) no nopietniem acu bojājumiem / neatgriezeniskas ietekmes uz acīm (1. kategorija), kā noteikts ANO GHS un *CLP*, nedz arī acu kairinātājus (fakultatīvā 2A kategorija) no viegliem acu kairinātājiem (fakultatīvā 2B kategorija), kā noteikts ANO GHS (1). Šiem nolūkiem nepieciešama papildu testēšana ar citām *in vitro* testēšanas metodēm.

18. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts ([2]), bez sasaistes ar *RhCE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā.

TESTA PRINCIPS

19. Testējamo ķimikāliju vietēji aplicē uz vismaz divām trīsdimensiju *RhCE* audu konstrukcijām, un audu dzīvotspēju mēra pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas laika. *RhCE* audus rekonstruē no primāriem cilvēka epidermas keratinocītiem vai imortalizētām cilvēka radzenes epitēlija šūnām, kas kultivētas vairākas dienas, tā lai veidotos stratificēts, labi diferencēts plakans epitēlijs, kas ir morfoloģiski līdzīgs epitēlijam cilvēka radzenē. EpiOcular™ *RhCE* audu konstrukciju veido vismaz 3 dzīvotspējīgi šūnu slāņi un nekeratinizēta virsma, un tai piemīt radzenei līdzīga struktūra, kas ir analoga struktūrai *in vivo*. SkinEthic™ *HCE RhCE* audu konstrukciju līdzīgi normālam cilvēka radzenes epitēlijam veido vismaz 4 dzīvotspējīgi šūnu slāņi, to vidū cilindriskās bazālās šūnas, pārejas spārnveida šūnas un virspusējās plakanās šūnas (20)(26).

20. Ķimikālijas izraisīti nopietni acu bojājumi / acu kairinājums, kas *in vivo* izpaužas galvenokārt kā radzenes apduļķošanās, irīts, konjunktīvas apsārtums un/vai konjunktīvas hemoze, ir rezultāts virknei notikumu, kas sākas ar ķimikālijas iekļūšanu cauri radzenei un/vai konjunktīvai un šūnu bojājumu rašanos. Šūnu bojājumus var izraisīt vairāki iedarbības veidi: šūnas membrānas līze (piem., virsmaktīvo vielu, organisku šķīdinātāju izraisīta); makromolekulu (īpaši proteīnu) koagulācija (piem., virsmaktīvo vielu, organisku šķīdinātāju, sārmu un skābju izraisīta); lipīdu pārziepošanās (piem., sārmu izraisīta); alkilēšana vai cita kovalenta mijiedarbība ar makromolekulām (piem., balināšanas līdzekļu, peroksīdu un alkilētāju izraisīta) (15)(27)(28). Tomēr pierādīts, ka citotoksicitātei ir svarīga vai pat primāra mehānistiska nozīme ķimikālijas izraisītas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējās atbildreakcijas noteikšanā neatkarīgi no audu bojājumu pamatā esošiem fizikāli ķīmiskajiem procesiem (29)(30). Turklāt ķimikālijas potenciālu izraisīt nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu galvenokārt nosaka sākotnējā bojājuma apjoms (31), kas korelē ar šūnu mirstības apjomu (29) un sekojošo atbildreakciju un iespējamo iznākumu apjomu (32). Tādējādi pavisam viegli kairinātāji parasti ietekmē tikai virspusējo radzenes epitēliju, viegli un vidēji smagi kairinātāji bojā galvenokārt epitēliju un virspusējo stromu, bet smagi kairinātāji bojā epitēliju, dziļo stromu un reizēm radzenes endotēliju (30)(33). *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējas mērīšana, ko pēc vietējas eksponēšanas testējamai ķimikālijai veic, lai noteiktu ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu (ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), pamatojas uz pieņēmumu, ka visas ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus vai acu kairinājumu, radzenes epitēlijā un/vai konjunktīvā izraisīs citotoksicitāti.

([2]) 2013. gada jūnijā ESAO kopīgajā sanāksmē vienojās jaunajās un atjauninātajās ESAO testēšanas vadlīnijās, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai konsekventāk lietot apzīmējumu "testējamā ķimikālija".

21. *RhCE* audu dzīvotspēju ierasts mērīt pēc audu dzīvotspējīgo šūnu ierosinātas vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds; *CAS* Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas MTT formazāna sāli, kura daudzumu kvantitatīvi nosaka audu ekstraktā (16). Par ķimikālijām, kuras nav jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķimikālijas), nosaka tādas ķimikālijas, kas nesamazina audu dzīvotspēju zem noteiktas robežvērtības (t. i., audu dzīvotspēja > 60 % EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EITL* testā ([3]) vai > 50 % SkinEthic™ *HCE EITS* testā ([4])) (sk. 44. punktu).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

22. Pirms *RhCE* testu regulāras izmantošanas normatīviem mērķiem laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, pareizi prognozējot 1. tabulā norādītās piecpadsmit standartķimikālijas. Šīs ķimikālijas atlasītas no *VRM* validēšanas pētījumos izmantotajām ķimikālijām (8)(10)(11). Atlasē iespējamajā apjomā iekļautas ķimikālijas: i) ar atšķirīgu agregātstāvokli; ii) kas aptver visas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakcijas *in vivo* atbilstoši augstas kvalitātes rezultātiem, kas iegūti truša acu *in vivo* references testā (TM B.5) (2)(14) un ANO GHS klasifikācijas sistēmā (t. i., 1., 2A, 2B kategorijas vai nekategorizētas ķimikālijas) (1) un *CLP* klasifikācijas sistēmā (t. i., 1., 2. kategorijas vai nekategorizētas ķimikālijas); iii) kas aptver klasifikācijas atšķirīgos faktorus *in vivo* (24)(25); iv) kas atbilst validēšanas pētījumā izmantotajām ķimikāliju klasēm (8)(10)(11); v) kas plaši aptver organiskās funkcionālās grupas (8)(10)(11); vi) kuru ķīmiskā struktūra ir precīzi noteikta (8)(10)(11); vii) kurām ir krāsa un/vai kas ir tiešas MTT reducētājas; viii) ar kurām to validēšanas laikā ar *RhCE* testēšanas metodēm ieguva reproducējamus rezultātus; ix) kuras to validēšanas pētījumu laikā tika pareizi prognozētas ar *RhCE* testēšanas metodēm; x) kas aptver visas atbildreakcijas *in vitro* atbilstoši augstas kvalitātes *RhCE* testēšanas metožu datiem (dzīvotspēja no 0 līdz 100 %); xi) kas ir komerciāli pieejamas; xii) kuru lietošana nav saistīta ar pārlieku augstām iegādes un/vai atkritumu apsaimniekošanas izmaksām. Gadījumos, kad kāda no norādītajām ķimikālijām nav pieejama vai nav izmantojama citu pamatotu iemeslu dēļ, var izmantot citu ķimikāliju, kas atbilst iepriekš aprakstītajiem kritērijiem, piem., ķimikāliju, kas izmantota *VRM* validēšanai. Šādas atkāpes jāpamato.

1. tabula

Standartķimikāliju saraksts

Ķīmiskais nosaukums	*CAS* Nr.	Organiskā funkcionālā grupa ([1])	Agregātstāvoklis	*VRM1* dzīvotspēja (%) ([2])	*VRM2* dzīvotspēja (%) ([3])	*VRM* prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
***In vivo* 1. kategorija** ([4])								
Metiltioglikolāts	2365-48-2	Karbonskābes esteris; tiospirts	Šķidrs	10,9±6,4	5,5±7,4	Nav iespējams prognozēt	Jā (spēcīgs)	Nē
Hidroksietilakrilāts	818-61-1	Akrilāts; spirts	Šķidrs	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
2,5-Dimetil-2,5-heksāndiols	110-03-2	Spirts	Ciets	2,3±0,2	0,2±0,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
Nātrija oksalāts	62-76-0	Oksokarbonskābe	Ciets	29,0±1,2	5,3±4,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
***In vivo* 2A kategorija** ([4])								
2,4,11,13-Tetraazatetradekāndiimidamīds, *N*,*N*″-bis(4-hlorfenil)-3,12-diimino-, di-*D*-glikonāts (20 %, ūdens) ([6])	18472-51-0	Aromātiskais heterocikliskais halogenīds; arilhalogenīds; dihidroksilgrupa; guanidīns	Šķidrs	4,0±1,1	1,3±0,6	Nav iespējams prognozēt	Nē	Jā (vājš)

([3]) *EITL*: *EIT* šķidrumiem, ja izmanto SkinEthic™ *HCE*.
([4]) *EITS*: *EIT* cietvielām, ja izmanto SkinEthic™ *HCE*.

Ķīmiskais nosaukums	CAS Nr.	Organiskā funkcionālā grupa (1)	Agregātstāvoklis	*VRM1* dzīvotspēja (%) (2)	*VRM2* dzīvotspēja (%) (3)	VRM prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
Nātrija benzoāts	532-32-1	Arils; karbonskābe	Ciets	3,5±2,6	0,6±0,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
***In vivo* 2B kategorija** (4)								
Dietiltoluamīds	134-62-3	Benzamīds	Šķidrs	15,6±6,3	2,8±0,9	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
2,2-Dimetil-3-metilēnbiciklo [2.2.1] heptāns	79-92-5	Alkāns, sazarots ar trešējo oglekli; alkēns; biciklohepatāns; karbocikli ar tiltiņu saturošu gredzenu; cikloalkāns	Ciets	4,7±1,5	15,8±1,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
***In vivo* nekategorizētas** (4)								
1-Etil-3-metilimidazolija etilsulfāts	342573-75-5	Alkoksils; amonija sāls; arils; imidazols; sulfāts	Šķidrs	79,9±6,4	79,4±6,2	Nekategor.	Nē	Nē
Dikaprililēteris	629-82-3	Alkoksils; ēteris	Šķidrs	97,8±4,3	95,2±3,0	Nekategor.	Nē	Nē
Piperonila butoksīds	51-03-6	Alkoksils; benzdioksols; benzils; ēteris	Šķidrs	104,2±4,2	96,5±3,5	Nekategor.	Nē	Nē
Polietilēnglikola (PEG-40) hidrogenēta rīcineļļa	61788-85-0	Acilals; spirts; alils; ēteris	Viskozs	77,6±5,4	89,1±2,9	Nekategor.	Nē	Nē
1-(4-Hlorfenil)-3-(3,4-dihlorfenil)urīnviela	101-20-2	Aromātiskais heterocikliskais halogenīds; arilhalogenīds; urīnvielas atvasinājumi	Ciets	106,7±5,3	101,9±6,6	Nekategor.	Nē	Nē
2,2′-Metilēn-bis-(6-(2*H*-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenols)	103597-45-1	Alkāns, sazarots ar četraizvietoto oglekli; saplūdusi karbocikliskā aromātviela; saplūduši piesātinātie heterocikli; prekursoru hinoīdu savienojumi; *terc*-butils	Ciets	102,7±13,4	97,7±5,6	Nekategor.	Nē	Nē

Ķīmiskais nosaukums	*CAS* Nr.	Organiskā funkcionālā grupa (1)	Agregātstāvoklis	*VRM1* dzīvotspēja (%) (2)	*VRM2* dzīvotspēja (%) (3)	VRM prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
Kālija tetrafluorborāts	14075-53-7	Neorganisks sāls	Ciets	88,6±3,3	92,9±5,1	Nekategor.	Nē	Nē

Saīsinājumi:

CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs; AMO GHS = Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (1); *VRM1* = validēta references metode, EpiOcular™ *EIT*; *VRM2* = validēta references metode, SkinEthic™ *HCE EIT*; Krāsas interf. = krāsas interference ar MTT formazāna standartabsorbcijas (optiskā blīvuma jeb OB) mērījumu.

(1) Organiskā funkcionālā grupa piešķirta atbilstoši ESAO instrumentu kopuma 3.1. versijas ieligzdotai analīzei (8).

(2) Pamatojoties uz rezultātiem, kas ar EpiOcular™ *EIT* iegūti *EURL ECVAM* / *Cosmetics Europe* acu kairinājuma validēšanas pētījumā (*EIVS*) (8).

(3) Pamatojoties uz rezultātiem, kas ar SkinEthic™ *HCE EIT* iegūti validēšanas pētījumā (10)(11).

(4) Pamatojoties uz truša acu *in vivo* testa (TM B.5 / ESAO TG 405) (2)(14) rezultātiem un izmantojot ANO GHS sistēmu.

(5) Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti *CEFIC* konsorcija *in vitro* acu kairinājuma testēšanas stratēģijas (*CON4EI*) pētījumā.

(6) Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot radzenes apduļķojumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai agrāk atgriezās kaitējuma nulles līmenī. Dzīvniekam, kurš līdz 7. dienai nebija pilnībā atlabis, 7. dienā radzenes apduļķojuma rādītājs bija 1, taču ietekme pilnībā pazuda 9. dienā.

23. Ieteicams, lai kompetences testēšanas ietvaros lietotāji pēc audu saņemšanas verificētu šo audu barjerfunkcijas, kā precizējis *RhCE* audu konstrukcijas ražotājs (sk. 25., 27. un 30. punktu). Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audi sūtīti no tālienes / sūtīšana aizņēmusi ilgu laiku. Kad tests ir sekmīgi ieviests un apgūts un tā izmantošanas prasme pierādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt katru reizi. Tomēr, ja testu izmanto parastajā praksē, barjerfunkciju novērtēšanu ieteicams turpināt regulāri.

PROCEDŪRA

24. Testi, uz kuriem pašlaik attiecas šī testēšanas metode, ir zinātniski derīgie EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* (9)(12)(13), ko dēvē par validēto references metodi (attiecīgi *VRM1* un *VRM2*). *RhCE* testēšanas metodēm ir pieejamas standartprocedūras, kas jāizmanto, ieviešot un izmantojot testēšanas metodes laboratorijā (34)(35). Nākamajos punktos un 2. papildinājumā aprakstītas *RhCE* testu galvenās sastāvdaļas un procedūras.

RHCE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgi nosacījumi

25. Lai rekonstruētu radzenei līdzīga epitēlija trīsdimensiju audus, jāizmanto attiecīgas cilvēka šūnas, kam jāsastāv no pieaugoši stratificētām, bet ne pārragotām šūnām. *RhCE* audu konstrukciju gatavo insertos ar porainu sintētisku membrānu, caur kuru šūnām var piekļūt barības vielas. Rekonstruētajā radzenei līdzīgajā epitēlijā jābūt vairākiem dzīvotspējīgu, nekeratinizētu epitēlija šūnu slāņiem. *RhCE* audu konstrukcijas epitēlija virsmai jābūt tiešā saskarē ar gaisu, lai būtu iespējama tieša vietēja eksponēšana testējamajām ķimikālijām līdzīgi tam, kā *in vivo* tiktu eksponēts radzenes epitēlijs. *RhCE* audu konstrukcijai jāveido pietiekami spēcīga funkcionāla barjera, lai aizturētu citotoksisko etalonvielu, piem., *Triton* X-100 vai nātrija dodecilsulfāta (SDS), ātru penetrāciju. Barjerfunkcija būtu uzskatāmi jāpierāda, un šo funkciju iespējams novērtēt, vai nu nosakot, kāds ekspozīcijas laiks vajadzīgs, lai pēc tam, kad konkrētā noteiktā koncentrācijā aplicēta etalonviela (piem., 100 µl 0,3 % (tilp./tilp.) *Triton* X-100), par 50 % samazinātos audu dzīvotspēja (ET_{50}), vai nosakot, pie kādas koncentrācijas etalonviela pēc noteikta ekspozīcijas laika (piem., 30 minūšu ilgas apstrādes ar 50 µl SDS) par 50 % samazina audu dzīvotspēju (IC_{50}) (sk. 30. punktu). *RhCE* audu konstrukcijas aizturošajām īpašībām jānovērš testējamās ķimikālijas nokļūšana pāri dzīvotspējīgo audu malai, jo tā dēļ var tikt nepareizi modelēta faktiskā iedarbība uz radzeni. *RhCE* audu konstrukcijas izveidē izmantotās cilvēka šūnas nedrīkst būt kontaminētas ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm. Piegādātājam jāpārbauda audu konstrukcijas sterilitāte, lai pārliecinātos, ka nav kontaminācijas ar sēnītēm un baktērijām.

Funkcionāli nosacījumi

Dzīvotspēja

26. Audu dzīvotspējas kvantitatīvai noteikšanai izmanto MTT ķīmisko analīzi (16). *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT reducē par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm, ko pēc tam no audiem ekstrahē ar izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju). Ekstrahēto MTT formazānu var kvantitatīvi noteikt ar standarta absorbcijas (optiskā blīvuma jeb OB) mērījumu vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (36). Tīra ekstrakcijas šķīdinātāja

OB jābūt pietiekami zemam, t. i., OB < 0,1. *RhCE* audu konstrukcijas lietotājiem jānodrošina, ka katra izmantotā *RhCE* audu konstrukcijas partija atbilst negatīvajai kontrolei definētajiem kritērijiem. Negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazoni attiecīgajām *VRM* ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam par negatīvās kontroles apstiprināšanas kritēriju jāizmanto 2. tabulā norādītie negatīvās kontroles OB diapazoni. Testēšanas pārskatā jābūt dokumentētam, ka ar negatīvās kontroles vielu apstrādātie audi kultūrā ir stabili (nodrošina līdzīgus audu dzīvotspējas mērījumus) visas testa ekspozīcijas laikā. Audu ražotājam audu partijas izlaides kvalitātes kontroles ietvaros jāveic līdzīga procedūra, taču šajā gadījumā var būt spēkā no 2. tabulā norādītajiem atšķirīgi apstiprināšanas kritēriji. *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam jānosaka negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība) (*QC* testēšanas metodes apstākļos).

2. tabula

Testa lietotājiem paredzētie negatīvās kontroles optiskā blīvuma vērtību pieņemamības diapazoni

Tests	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiOcular™ *EIT* (*OCL*-200) – *VRM1* (gan šķidru, gan cietu vielu protokoliem)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ *HCE EIT* (*HCE*/*S*) – *VRM2* (gan šķidru, gan cietu vielu protokoliem)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Šajā pieņemamības robežvērtībā ņemta vērā iespēja, ka nosūtīšana/glabāšana bijusi ilgstoša (piemēram, > 4 dienas), un pierādīts, ka tas nav ietekmējis testēšanas metodes veiktspēju (37).

Barjerfunkcija

27. *RhCE* audu konstrukcijai jābūt pietiekami biezai un noturīgai, lai aizturētu citotoksisku etalonvielu ātru penetrāciju, ko nosaka pēc ET_{50} (*Triton* X-100) vai pēc IC_{50} (SDS) (3. tabula). *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/pārdevējam, kad tas piegādā audus gala lietotājam, jāpierāda katras izmantojamās *RhCE* audu konstrukcijas partijas barjerfunkcija (sk. 30. punktu).

Morfoloģija

28. *RhCE* audu konstrukcijas histoloģiskā izmeklējumā jāpierāda līdzība cilvēka radzenes epitēlija struktūrai (jābūt vismaz 3 slāņiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu un nekeratinizētai virsmai). Attiecīgajām *VRM* izstrādātājs/piegādātājs ir izveidojis atbilstošu morfoloģiju, tāpēc testēšanas metodes lietotājam tā nav atkārtoti jāpierāda katrai izmantojamajai audu partijai.

Reproducējamība

29. Testēšanas metodes pozitīvās un negatīvās kontroles rezultātiem uzskatāmi jāparāda to reproducējamība laika gaitā.

Kvalitātes kontrole (QC)

30. *RhCE* audu konstrukciju drīkst izmantot tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs pierāda, ka ikviena izmantojamās *RhCE* audu konstrukcijas partija atbilst definētajiem produkcijas izlaides kritērijiem, no kuriem svarīgākie ir dzīvotspēja (26. punkts) un barjerfunkcija (27. punkts). *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam jānosaka ar ET_{50} vai IC_{50} mērītas (sk. 25. un 26. punktu) barjerfunkcijas pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). ET_{50} un IC_{50} pieņemamības diapazons, ko *RhCE* audu konstrukciju izstrādātājs/piegādātājs izmanto kā *QC* partijas izlaides kritēriju (izmanto *VRM*), ir norādīts 3. tabulā. *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam dati, kas pierāda atbilstību visiem produkcijas izlaides kritērijiem, jādara pieejami testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju varētu iekļaut testēšanas pārskatā. Tikai ar visiem šiem produkcijas izlaides kritērijiem atbilstošiem audiem iegūti rezultāti. ir pieņemami tādu ķimikāliju ticamai prognozēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS / *CLP* nav jāklasificē un jāmarķē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas.

3. tabula

Partiju izlaides *QC* kritērijs

Tests	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiOcular™ *EIT* (*OCL*-200) – *VRM1* (100 µl 0,3 % (tilpums/tilpums) *Triton* X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ *HCE EIT* (*HCE/S*) – *VRM2* (30 minūšu ilga apstrāde ar 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu aplicēšana

31. Katrai testējamai ķimikālijai un katrai kontroles vielai katrā izpildes reizē vajadzīgi vismaz divi audu replikāti. Izmanto divus atšķirīgus apstrādes protokolus: vienu šķidrām testējamajām ķimikālijām un vienu cietām testējamajām ķimikālijām (34)(35). Atbilstoši abām metodēm un protokoliem pirms testējamo ķimikāliju aplicēšanas audu konstrukcijas virsma jāsamitrina ar kalciju un magniju nesaturošu Dulbeko fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS), lai atdarinātu cilvēka acs mitruma apstākļus. Audu apstrādi sāk, tos eksponējot testējamai ķimikālijai (ķimikālijām) un kontroles vielām. Atbilstoši abiem apstrādes protokoliem abās *VRM* testējamā ķimikālija vai kontroles viela uz epitēlija virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, taču izvairoties no pārmērīgas devas (sk 32. un 33. punktu) (2. papildinājums).

32. Testējamās ķimikālijas, kas 37 °C vai zemākā temperatūrā ir pilināmas ar pipeti (ja nepieciešams, izmantojot pozitīvo maināmo uzgaļu virzuļpipeti), saskaņā ar *VRM* uzskata par šķidrumiem, pārējos gadījumos tās uzskatāmas par cietām vielām (sk 33. punktu). Saskaņā ar *VRM* šķidras testējamās ķimikālijas vienmērīgi uzklāj audu virsmai (t. i., aplicē vismaz 60 µl/cm^2) (sk. 2. papildinājumu, (33)(34)). Lai nodrošinātu audu pareizu devu, ciktāl iespējams, jāizvairās no kapilārās iedarbības (virsmas spraiguma efekta), kas var rasties insertam (uz audu virsmas) aplicētā nelielā tilpuma dēļ. Ar šķidrām testējamajām ķimikālijām apstrādātos audus 30 minūtes inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM). Ekspozīcijas laika beigās šķidrā testējamā ķimikālija un kontroles vielas no audu virsmas rūpīgi jānoņem, istabas temperatūrā intensīvi skalojot ar Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošu DPBS. Nākamā darbība pēc skalošanas ir pēcekspozīcijas iegremdēšana svaigā istabas temperatūras barotnē (lai atbrīvotos no audos absorbējušās testējamās ķimikālijas) uz iepriekš noteiktu laiku, kas atšķiras atkarībā no izmantotās *VRM*. Tikai saskaņā ar *VMR1* pēcekspozīcijas inkubēšanai svaigā barotnē standarta kultivēšanas apstākļos jānotiek pirms MTT ķīmiskās analīzes (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)).

33. Testējamās ķimikālijas, kas līdz 37 °C temperatūrā nav pilināmas ar pipeti, saskaņā ar *VRM* uzskata par cietām vielām. Aplicējamajam testējamās ķimikālijas daudzumam jābūt pietiekamam, lai pilnībā nosegtu audu virsmu, t. i., jāaplicē vismaz 60 mg/cm^2 (2. papildinājums). Ja iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Ar cietām testējamajām ķimikālijām apstrādātos audus iepriekš noteiktu laiku (atkarībā no izmantotās *VRM*) inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)). Ekspozīcijas laika beigās cietā testējamā ķimikālija un kontroles vielas no audu virsmas rūpīgi jānoņem, istabas temperatūrā intensīvi skalojot ar Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošu DPBS. Nākamā darbība pēc skalošanas un pirms MTT ķīmiskās analīzes ir pēcekspozīcijas iegremdēšana svaigā istabas temperatūras barotnē (lai atbrīvotos no audos absorbējušās testējamās ķimikālijas) uz iepriekš noteiktu laiku, kas atšķiras atkarībā no izmantotās *VRM*, un pēcekspozīcijas inkubēšana svaigā barotnē standarta kultivēšanas apstākļos (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)).

34. Katrā izpildes reizē jāiekļauj paralēlas negatīvās un pozitīvās kontroles, lai pierādītu, ka audu dzīvotspēja (kas noteikta ar negatīvo kontroli) un jutība (kas noteikta ar pozitīvo kontroli) atbilst pēc vēsturiskajiem datiem noteiktajiem pieņemamības diapazoniem. Paralēlā negatīvā kontrole arī nodrošina pamatdatus (100 % audu dzīvotspēja), lai aprēķinātu ar testējamo ķimikāliju apstrādāto audu relatīvo dzīvotspēju procentos (%$Viability_{test}$). Ar *VRM* lietojamā ieteicamā pozitīvās kontroles viela ir neatšķaidīts metilacetāts (*CAS* Nr. 79-20-9, komerciāli pieejams, piem., no *Sigma-Aldrich*, kat. Nr. 45997; šķidrums). Ar *VRM1* un *VRM2* lietojamās ieteicamās negatīvās kontroles vielas ir attiecīgi ultratīrs H_2O un Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS. Šīs ir *VRM* validēšanas pētījumos izmantotās kontroles vielas, un par tām ir visvairāk vēsturisko datu. Piemērotu alternatīvu pozitīvās vai negatīvās kontroles vielu izmantošana zinātniski un pienācīgi jāpamato. Negatīvās un pozitīvās kontroles jātestē pēc tiem pašiem protokoliem, ko izmanto izpildes reizē iekļautajām testējamajām ķimikālijām (t. i., šķidrumiem un/vai cietām vielām). Nākamā darbība pēc aplicēšanas un pirms MTT ķīmiskās analīzes attiecīgā gadījumā ir apstrādājamā parauga ekspozīcija, skalošana, pēcekspozīcijas iegremdēšana un pēcekspozīcijas inkubēšana, kā paredzēts kontrolēm, kuras izpilda paralēli šķidrām testējamajām ķimikālijām (sk. 32. punktu), vai kontrolēm, kuras izpilda paralēli cietām testējamajām ķimikālijām (sk. 33. punktu) (sk. 35. punktu) (34)(35). Ar vienu negatīvās un pozitīvās kontroles komplektu pietiek visām vienāda agregātstāvokļa (šķidrumiem vai cietām vielām) testējamajām ķimikālijām vienā un tajā pašā izpildes reizē.

Audu dzīvotspējas mērījumi

35. Audu dzīvotspējas mērīšanai ar šo testēšanas metodi izmantojamā standartizētā kvantitatīvā metode (16) ir MTT ķīmiskā analīze. Tā ir audu trīsdimensiju konstrukcijai piemērota metode. MTT ķīmisko analīzi veic tūlīt pēc pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda. Saskaņā ar *VRM RhCE* audu konstrukcijas paraugu uz 180 ± 15 minūtēm ievieto 0,3 ml MTT šķīduma koncentrācijā 1 mg/ml standarta kultivēšanas apstākļos. *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT reducē par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm. Pēc tam izgulsnēto zilās krāsas MTT formazāna produktu no audiem ekstrahē, piemērotā tilpumā izmantojot izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju) (34)(35). Ar šķidrām testējamajām ķimikālijām testētie audi jāekstrahē gan no audu augšpuses, gan apakšpuses, bet ar cietām testējamajām ķimikālijām un krāsainiem šķidrumiem testētos audus pietiek ekstrahēt no audu apakšpuses (lai mazinātu izopropanola ekstrakcijas šķīduma iespējamo kontaminēšanu ar testējamo ķimikāliju, kas varētu būt palikusi uz audiem). Arī ar šķidrām testējamajām ķīmiskajām vielām, kas nav viegli noskalojamas, testētos audus pietiek ekstrahēt tikai no audu apakšpuses. Paralēli testētās negatīvās un pozitīvās kontroles vielas jāapstrādā līdzīgi testējamajai ķimikālijai. Ekstrahēto MTT formazānu var kvantitatīvi noteikt ar standarta absorbcijas (OB) mērījumu pie viļņa garuma 570 nm, izmantojot frekvenču joslas filtru, kas nepārsniedz ± 30 nm, vai ar *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 42. punktu) (11)(36).

36. Testējamās ķimikālijas optiskās īpašības vai ķīmiskās reakcijas ar MTT var traucēt MTT formazāna noteikšanu, un tāpēc dzīvotspēja var būt noteikta nepareizi. Testējamās ķimikālijas var ietekmēt MTT formazāna noteikšanu, MTT tieši reducējot par zilas krāsas MTT formazānu un/vai krāsas interferences dēļ, ja testējamā ķimikālija dabiski vai apstrādes procedūru rezultātā absorbējas tādā pašā OB diapazonā kā MTT formazāns (t. i., apmēram 570 nm). Pirms testēšanas jāveic priekšpārbaudes, lai varētu identificēt potenciālus tiešos MTT reducētājus un/vai krāsu interferējošas ķimikālijas, un šādu testējamo ķimikāliju radītās iespējamās interferences noteikšanai un korekcijām jāizmanto papildu kontroles (sk. 37.–41. punktu). Īpaši svarīgi tas ir tad, ja kādu konkrētu testējamo ķimikāliju pilnībā nenoskalo no *RhCE* audu konstrukcijas vai ja tā iespiežas radzenei līdzīgajā epitēlijā un tāpēc MTT ķīmiskās analīzes laikā atrodas *RhCE* audu konstrukcijās. Testējamām ķimikālijām, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes) un kurām pārāk lielas interferences, t. i., lielas absorbcijas pie viļņa garuma 570 ± 30 nm, dēļ nav izmantojams MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērījums, MTT formazāna noteikšanai var izmantot *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 41. un 42. punktu) (11)(36). *VRM* standartprocedūrās ir pieejams plašs apraksts par to, kā noteikt un koriģēt tiešo MTT redukciju un krāsvielu interferenci (34)(35). III un IV papildinājumā sniegtas arī ilustratīvas diagrammas ar norādījumiem par to, kā identificēt tiešos MTT reducētājus un/vai krāsu interferējošas ķimikālijas un kā ar tām rīkoties attiecīgi *VRM1* un *VRM2* gadījumā.

37. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes), un lemtu par papildu kontroļu nepieciešamību, testējamo ķimikāliju pievieno ūdenim un/vai izopropanolam un attiecīgo laiku inkubē istabas temperatūrā (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)). Ja ar *VRM1* testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē pietiekamu gaismu diapazonā 570 ± 20 nm (sk. 3. papildinājumu) vai ja ar *VRM2*, sajaucot testējamo ķimikāliju ar ūdeni, iegūst krāsainu šķīdumu (sk. 4. papildinājumu), pieņem, ka testējamā ķimikālija interferē ar MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērīšanu, un tad jāizpilda papildu kontroles ar krāsvielu vai arī jāizmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūra; minētās kontroles šādā gadījumā nav vajadzīgas (sk. 41. un 42. punktu un III un IV papildinājumu) (34)(35). Mērot standartabsorbciju (OB), katru interferējošo testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču, lai iegūtu NSC_{living} kontroli (nespecifiska krāsa dzīvos audos), MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā (34)(35). Ņemot vērā dzīvajiem audiem raksturīgo bioloģisko mainību, NSC_{living} kontrole jāveic paralēli iekrāsotās ķimikālijas testēšanai un vairākkārtējas testēšanas gadījumā katram veiktajam testam (katrā izpildes reizē) jāveic neatkarīga NSC_{living} kontrole. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar interferējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem ($\%Viability_{test}$), atņemot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar interferējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamajam testam inkubēti barotnē bez MTT ($\%NSC_{living}$). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = [$\%Viability_{test}$] - [$\%NSC_{living}$].

38. Lai identificētu tiešos MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi pagatavotam MTT šķīdumam. MTT šķīdumam pievieno attiecīgu daudzumu testējamās ķimikālijas un maisījumu apmēram 3 stundas inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (skatīt III un IV papildinājumu) (34)(35). Ja MTT maisījums, kas satur testējamo ķimikāliju (nešķīstošas testējamās ķimikālijas gadījumā, tās suspensiju), kļūst zils/violets, pieņem, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un neatkarīgi no standarta absorbcijas (OB) mērījuma vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūras izmantošanas dzīvotnespējīgu *RhCE* audu konstrukcijām jāveic papildu funkcionāla pārbaude. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nonāvētus audus, kuriem piemīt vairs tikai atlikusī metaboliskā aktivitāte, taču kuri testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā tāpat kā dzīvotspējīgie audi. *VRM1* nonāvētos audus sagatavo, tos eksponējot zemai temperatūrai ("nonāvēti aukstumapstrādāti"). *VRM2* nedzīvos audus sagatavo, tos ilgstoši (piem., vismaz 24 stundas ± 1 stundu) inkubējot ūdenī un pēc tam glabājot zemā temperatūrā ("nonāvēti ūdensapstrādāti"). Katru MTT reducējošo testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, lai iegūtu nespecifisku MTT redukcijas (*NSMTT*) kontroli (34)(35). Ar vienu *NSMTT* kontroli pietiek vienai testējamai ķimikālijai neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu / izpildes reižu skaita. Audu faktisko dzīvotspēju tad aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem ($\%Viability_{test}$), atņemot procentuālo nespecifisko MTT redukciju, kas iegūta ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nonāvētiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam ($\%NSMTT$). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = [$\%Viability_{test}$] - [$\%NSMTT$].

39. Testējamām ķimikālijām, kas identificētas kā krāsu interferējošas (sk. 37. punktu) un tiešu MTT redukciju izraisošas (sk. 38. punktu), standarta absorbcijas (OB) mērījumu veikšanai papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām *NSMTT* un NSC_{living} kontrolēm būs nepieciešams arī trešais kontroļu komplekts. Parasti tā ir tumšas krāsas testējamajām ķimikālijām, kas gaismu absorbē 570 ± 30 nm diapazonā (piemēram, zilām, violetām, melnām), jo to sākotnējā krāsa traucē novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 38. punktā. Tāpēc pēc noklusējama jālieto *NSMTT* kontroles kopā ar NSC_{living} kontrolēm. Testējamās ķimikālijas, kuras tiek pārbaudītas ar abām – *NSMTT* un NSC_{living} – kontrolēm, var absorbēt un saglabāt gan dzīvie, gan nonāvētie audi. Tāpēc šajā gadījumā *NSMTT* kontrole var

koriģēt ne tikai testējamās ķimikālijas izraisīto iespējamo tiešo MTT redukciju, bet arī krāsas interferenci, kas rodas no tā, ka testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā nonāvētie audi. Šādi kļūst iespējama dubulta krāsas interferences koriģēšana, jo NSC_{living} kontrole jau koriģē krāsas interferenci, kas rodas no tā, ka testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā dzīvie audi. Lai novērstu iespējamo dubulto krāsas interferences koriģēšanu, jāveic trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nedzīvos audos (NSC_{killed}) (sk. III un IV papildinājumu) (34)(35). Pārbaudē ar šo papildu kontroli testējamo ķimikāliju izmanto vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Ar vienu NSC_{killed} kontroli pietiek vienai testējamai ķimikālijai neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu / izpildes reižu skaita, taču tā jāizdara paralēli *NSMTT* kontrolei un ar to pašu audu partiju. Audu faktisko dzīvotspēju tad aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem (%$Viability_{test}$), atņemot %*NSMTT* un atņemot %NSC_{living}, un pieskaitot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nonāvētajiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (%NSC_{killed}). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = [%$Viability_{test}$] - [%*NSMTT*] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

40. Svarīgi ievērot, ka (tad, kad veic standarta absorbcijas mērījumus) nespecifiskā MTT redukcija un nespecifiskā krāsas interference var palielināt audu ekstrakta OB virs spektrofotometra linearitātes diapazona un ka (tad, kad veic *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas mērījumus) nespecifiskā MTT redukcija var palielināt arī audu ekstrakta MTT formazāna smailes laukumu virs spektrofotometra linearitātes diapazona. Pamatojoties uz to, ir svarīgi, lai pirms normatīviem mērķiem veiktas ķimikāliju testēšanas sākuma katra laboratorija noteiktu sava spektrofotometra OB/smailes laukuma linearitātes diapazonu, piem., ar MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7), kas komerciāli pieejams, piem., no *Sigma-Aldrich* (kat. Nr. M2003).

41. Standarta absorbcijas (OB) noteikšana ar spektrofotometru ir piemērota tiešu MTT reducētāju un krāsu interferējošu testējamo ķimikāliju novērtēšanai, ja novērotā interference MTT formazāna noteikšanā nav pārāk spēcīga (t. i., ar testējamo ķimikāliju iegūtie audu ekstraktu OB, nekoriģējot tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, atbilst spektrofotometra lineārajam diapazonam). Tomēr par testējamajām ķimikālijām iegūtie rezultāti, kuriem negatīvās kontroles %*NSMTT* un/vai %NSC_{living} ir ≥ 60 % (*VRM1* un *VRM2* šķidrumu protokolam) vai 50 % (*VRM2* cietu vielu protokolam), būtu jāuztver piesardzīgi, jo tā ir robežvērtība, ko *VRM* izmanto, lai nošķirtu klasificējamas ķimikālijas no neklasificējamām ķimikālijām (sk. 44. punktu). Standarta absorbciju (OB) tomēr nevar noteikt, ja interference MTT formazāna noteikšanā ir pārāk liela (t. i., izraisa to, ka nekoriģētie testējamo audu ekstraktu OB ir ārpus spektrofotometra lineārā diapazona). Ja krāsainas testējamās ķimikālijas vai testējamās ķimikālijas, kam krāsa izveidojas saskarē ar ūdeni vai izopropanolu, pārāk stipri interferē ar MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērīšanu, tās tomēr var novērtēt ar *HPLC/UPLC* spektrofotometriju (sk. III un IV papildinājumu). Tas ir tāpēc, ka ar *HPLC/UPLC* sistēmu MTT formazānu no ķimikālijas var atdalīt pirms kvantitatīvās noteikšanas (36). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC/UPLC* spektrofotometrija, NSC_{living} vai NSC_{killed} kontroles nav jāveic. Ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, *NSMTT* kontroles tomēr jāizmanto (atbilstoši 38. punktā aprakstītajai procedūrai). *NSMTT* kontroles jāizmanto arī testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa (jau sākotnēji vai parādās, kad viela ir ūdenī), kas traucē novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 38. punktā. MTT formazāna mērīšanai izmantojot *HPLC/UPLC* spektrofotometriju, kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, aprēķina audu procentuālo dzīvotspēju. Testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no %$Viability_{test}$atņemot %*NSMTT*, kā aprakstīts 38. punkta pēdējā teikumā. Visbeidzot jāņem vērā, ka tādus tiešus MTT reducētājus vai tiešus MTT reducētājus, kas turklāt ir krāsu interferējoši, kuri pēc apstrādes saglabājas audos un reducē MTT tik spēcīgi, ka testējamo audu ekstraktu OB (noteikti ar standarta OB mērījumu) vai smaiļu laukumi (noteikti ar *UPLC/HPLC* spektrofotometriju) ir ārpus spektrofotometra lineārā diapazona, nav iespējams novērtēt ar *RhCE* testēšanas metodēm, lai gan tas sagaidāms tikai ļoti retās situācijās.

42. *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai var izmantot ar visa veida testējamajām ķimikālijām (ar krāsu, bez krāsas, MTT reducētāji un MTT nereducētāji) (11) (36). *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmas ir dažādas, tāpēc katram lietotājam nav praktiski iespējams noteikt pilnīgi vienādus sistēmas darbības apstākļus. Tāpēc, pirms *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmantot, lai kvantificētu no audu ekstraktiem iegūtu MTT formazānu, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācijas atbilstība pieņemamības kritērijiem, kas noteikti kvalifikācijas standartparametru kopumam, kuru pamatā ir parametri, kas aprakstīti ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātājās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu (36)(38). Šie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 5. papildinājumā. Kad 5. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji izpildīti, *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu tam, lai noteiktu MTT formazāna daudzumu, ievērojot šīs testēšanas metodes aprakstā sniegtos eksperimentēšanas nosacījumus.

Pieņemamības kritēriji

43. Katrā testēšanas reizē, kad izmanto *RhCE* audu partijas, kas atbilst kvalitātes kontroles prasībām (sk. 30. punktu), ar negatīvās kontroles vielu apstrādāto audu OB jābūt tādam, kas atspoguļo to audu kvalitāti, kuriem ievērotas prasības sūtīšanas, saņemšanas posmiem un visiem protokola procesiem, un to rezultāti nedrīkst būt ārpus 2. tabulā aprakstītajām vēsturiski noteiktajām robežām (sk. 26. punktu). Tāpat ar pozitīvās kontroles vielu, t. i., metilacetātu, apstrādāto audu vidējai dzīvotspējai jābūt < 50 % attiecībā pret negatīvo kontroli *VRM1* šķidrumu vai cietu vielu protokoliem un ≤ 30 % (šķidrumu protokolam) vai ≤ 20 % (cietu vielu protokolam) attiecībā pret negatīvo kontroli *VRM2*, tādējādi atspoguļojot audu spēju reaģēt uz kairinošu testējamo ķimikāliju šīs testēšanas metodes apstākļos (34)(35). Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu audu replikātu mainībai jāatbilst pieņemtajām robežām (t. i., dzīvotspējas atšķirībai starp diviem audu replikātiem jābūt mazākai par 20 % vai arī standartnovirze (SD) starp trim audu replikātiem nedrīkst pārsniegt 18 %). Ja izpildes reizē iekļautā negatīvā kontrole vai pozitīvā kontrole neatbilst pieņemtajiem diapazoniem, izpildes reizi uzskata par "nekvalificētu", un tā jāatkārto. Ja testējamās ķimikālijas audu replikātu mainība neatbilst pieņemtajam diapazonam, tests jāuzskata par "nekvalificētu", un testējamā ķimikālija jātestē atkārtoti.

Rezultātu interpretēšana un prognostiskais modelis

44. Katras testējamās ķimikālijas audu replikātu ekstraktiem iegūtās OB vērtības / smailes laukumi jāizmanto vidējās audu dzīvotspējas procentos (vidējā vērtība starp audu replikātiem) aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kas noteikta kā 100 %. Audu procentuālās dzīvotspējas robežvērtības, pēc kurām nosaka, kuras testējamās ķimikālijas nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), norādītas 4. tabulā. Tādējādi rezultāti jāinterpretē, kā aprakstīts tālāk tekstā.

— Testējamo ķimikāliju nosaka par tādu, kas nav jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķimikālijas), ja audu vidējā procentuālā dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda ir lielāka par (>) audu procentuālajai dzīvotspējai noteikto robežvērtību, kas norādīta 4. tabulā. Šādā gadījumā nav nepieciešama papildu testēšana ar citām testēšanas metodēm.

— Ja audu vidējā procentuālā dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda ir mazāka par vai vienāda ar (≤) audu procentuālajai dzīvotspējai noteikto robežvērtību, prognozēšana nav iespējama (norādīts 4. tabulā). Šādā gadījumā būs nepieciešama papildu testēšana ar citām testēšanas metodēm, jo *RhCE* testēšanas metodes uzrāda zināmu skaitu pseidopozitīvu rezultātu (sk. 14.–15. punktu), un nav iespējams izšķirties starp ANO GHS un *CLP* 1. un 2. kategoriju (sk. 17. punktu).

4. tabula

Prognostiskie modeļi sakaņā ar ANO GHS / *CLP* klasifikāciju

VRM	Nekategorizēta	Nav iespējams prognozēt
VRM1 — EpiOcular™ *EIT* (abiem protokoliem)	Audu vidējā dzīvotspēja > 60 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 60 %
VRM2 — SkinEthic™ *HCE EIT* (šķidrumu protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 60 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 60 %
VRM2 — SkinEthic™ *HCE EIT* (cietvielu protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 50 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 50 %

45. Vienam testam ar vismaz diviem audu replikātiem jābūt pietiekamam gadījumos, kad testējamās ķimikālijas uzrādītais rezultāts ir nepārprotams. Tomēr, kad rezultāti ir neskaidri, piem., nesakritīgi mērījumu rezultāti atkārtojumos un/vai vidējā audu dzīvotspēja procentos ir 60 ± 5 % (*VRM1*, kā arī *VRM2* šķidrumu protokolam) vai 50 ± 5 % (*VRM2* cietvielu protokolam), jāapsver vajadzība pēc otrā vai pat pēc trešā testa, ja nesakrīt pirmo divu testu rezultāti.

46. Īpašu veidu maisījumiem, ja tas ir piemēroti un pamatoti, var apsvērt atšķirīgas audu dzīvotspējas procentos robežvērtības, pēc kā klasificējamas ķimikālijas nošķir no neklasificējamām ķimikālijām, lai palielinātu testēšanas metodes vispārējo veiktspēju šādu veidu maisījumiem (sk. 14. punktu). Etalonķimikālijas var noderēt, lai novērtētu nezināmu testējamo ķimikāliju vai produktu klases spēju izraisīt nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu vai novērtētu klasificētas ķimikālijas relatīvo spēju izraisīt acu toksicitāti konkrētā pozitīvu atbildreakciju diapazonā.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

47. Datus par atsevišķiem audu replikātiem katrā izpildes reizē, arī par atkārtotiem testiem, ja tos veic, (piem., OB vērtības / MTT formazāna smailes laukumus un aprēķinātās audu procentuālās dzīvotspējas datus par testējamo ķimikāliju un kontrolēm, kā arī galīgo *RhCE* testēšanas metodes prognozi) tabulas veidā apkopo par katru testējamo ķimikāliju. Pārskatā jāiekļauj arī vidējā audu dzīvotspēja procentos un dzīvotspējas atšķirība starp diviem audu replikātiem (ja n = 2 audu replikāti) vai SN (ja n ≥ 3 audu replikāti) par katru atsevišķu testējamo ķimikāliju un kontroli. Pārskatā jāiekļauj visas katrai testējamai ķimikālijai novērotās interferences MTT formazāna mērīšanā, kuras izpaužas kā tieša MTT redukcija un/vai krāsas interference.

Testēšanas pārskats

48. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta viela

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati.

— Agregātstāvoklis, gaistamība, pH, LogP, molekulmasa, ķīmisko vielu klase un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā un ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

— Agregātstāvoklis un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Pozitīvās un negatīvās kontroles vielas

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati.

— Agregātstāvoklis, gaistamība, molekulmasa, ķīmisko vielu klase un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Pamatojums citas tādas negatīvās kontroles izmantošanai, kas nav ultratīrs H_2O vai Ca_{2+}/Mg_{2+} nesaturošs DPBS, ja tāda izmantota.

— Pamatojums citas tādas pozitīvās kontroles izmantošanai, kas nav neatšķaidīts metilacetāts, ja tāda izmantota.

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo un negatīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem.

Informācija par sponsoru un testējošo iestādi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese.

— RhCE *audu konstrukcija un izmantotais protokols (attiecīgā gadījumā ar izvēles pamatojumu)*

Testēšanas metodes apstākļi

— Izmantotā *RhCE* audu konstrukcija, arī partijas numurs.

— MTT formazāna noteikšanai izmantotais viļņa garums un frekvenču josla (attiecīgā gadījumā), kā arī mērierīces (piem., spektrofotometra) linearitātes diapazons.

— MTT formazāna noteikšanai izmantotās metodes apraksts.

— Izmantotās *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas apraksts (attiecīgā gadījumā).

— Pilnīga papildinformācija par konkrēto izmantoto *RhCE* audu konstrukciju, arī tās veiktspējas raksturlielumi. No tiem jānorāda vismaz:

i) dzīvotspējas kvalitātes kontrole (piegādātājs);

ii) dzīvotspēja testēšanas metodes apstākļos (lietotājs);

iii) barjerfunkcijas kvalitātes kontrole;

iv) morfoloģija, ja ir pieejama informācija;

v) reproducējamība un prognozētspēja;

vi) *RhCE* audu konstrukcijas citas kvalitātes kontroles (*QC*), ja ir pieejama informācija.

— Norāde uz *RhCE* audu konstrukcijas vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz: *QC* datu pieņemamība saskaņā ar vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem.

— Paziņojums, ka pirms regulāras izmantošanas testējošā iestāde ir pierādījusi kompetenci testēšanas metodes izmantošanā, testējot standartķimikālijas.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji

— Pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem.

— Pieņemamā mainība pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem.

— Pieņemamā mainība testējamai ķimikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Testa procedūra

— Informācija par izmantoto testēšanas procedūru.

— Izmantotās testējamās ķimikālijas un kontroles vielu devas.

— Ekspozīcijas, pēcekspozīcijas iegremdēšanas un pēcekspozīcijas inkubēšanas periodu ilgums un temperatūra (attiecīgā gadījumā).

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

— Kontroles, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamajām ķimikālijām, kurām ir krāsa (attiecīgā gadījumā).

— Katrai testējamai ķimikālijai un kontrolēm (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, *NSMTT*, NSC_{living} un NSC_{killed}, ja tādas izmantotas) izmantoto audu replikātu skaits.

Rezultāti

— Datu apkopojums tabulā par atsevišķām testējamajām ķimikālijām un kontroles vielām par katru izpildes reizi (arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tādi veikti) un par katru replikāta mērījumu, arī OB vērtība vai MTT formazāna smailes laukums, audu dzīvotspēja procentos, vidējā audu dzīvotspēja procentos, atšķirība starp audu replikātiem vai SN un galīgā prognoze.

— Attiecīgā gadījumā tiešiem MTT reducētājiem un/vai krāsainām testējamajām ķimikālijām izmantoto kontroļu rezultāti, arī OB vērtība vai MTT formazāna smailes laukums, $\%NSMTT$, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, atšķirība starp audu replikātiem vai SN, galīgā pareizā audu dzīvotspēja procentos un galīgā prognoze.

— Rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolķimikālijām, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem.

— Citas novērotās ietekmes, piem., krāsainas testējamās ķimikālijas izraisītas audu iekrāsošanās, apraksts.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".

(3) Šā pielikuma B.47. nodaļa "Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētājas ķimikālijas un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".

(4) Šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētājas ķimikālijas un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē".

(5) Šā pielikuma B.61. nodaļa "Fluoresceīna caurplūdes testēšanas metode acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītāju identificēšanai".

(6) Šā pielikuma B.68. nodaļa "Īsa ekspozīcijas laika *in vitro* testēšanas metode, ar kuru identificēt i) ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas".

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Available at: 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. (Manuscript in Preparation).

(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. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [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. Available at: 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. Available at: 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.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (18).

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: i) konsekvents un uzticams avots vai avoti tās identificēšanas un raksturošanas vajadzībām; ii) struktūrāla, funkcionāla un/vai ķīmiska un produktklases līdzība ar testējamo ķimikāliju; iii) labi zināmas fizikālķīmiskās īpašības; iv) papildu dati par zināmajiem iedarbības veidiem; v) vielas zināmais iedarbības stiprums atbilst vēlamās atbildreakcijas diapazonam.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto testējamai ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē vai jāmarķē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē vai jāmarķē (negatīvs iznākums), no citām ķimikālijām (pozitīvs iznākums).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: sk. "Pareizības" definīciju.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

VK: variācijas koeficients.

Nov.: novirze.

EIT: acu kairinājuma tests.

EURL-ECVAM: Eiropas Savienības References laboratorija dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko "atgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 2. kategorija.

ET_{50}: ekspozīcijas laiks, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams audu dzīvotspējas samazināšanai par 50 %.

Pseidonegatīvu īpatsvars: visu to vielu daļa, kurām ir attiecīgā veida iedarbība, bet kuras ar konkrēto testēšanas metodi tiek kļūdaini identificētas par vielām bez attiecīgā veida iedarbības. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseidopozitīvu īpatsvars: visu to vielu daļa, kurām nav attiecīgā veida iedarbības, bet kuras ar konkrēto testēšanas metodi tiek kļūdaini identificētas par vielām ar attiecīgā veida iedarbību. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

HCE: SkinEthic™ cilvēka radzenes epitēlijs.

HPLC: augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

IC_{50}: koncentrācija, kādā etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika (piem., 30 minūšu apstrādes ar SDS) audu dzīvotspēju samazina par 50 %.

Pārmērīga deva: uz *RhCE* audu konstrukcijas aplicētās testējamās ķimikālijas daudzums, kas ir lielāks par epitēlija virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu.

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

LLOQ: kvantitatīvās noteikšanas apakšējā robeža.

LogP: oktanola-ūdens sadalījuma koeficienta logaritms.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu viela tiek iegūta ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds.

Negatīvā kontrole: paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka konkrētajā testa sistēmā tā neinducē pozitīvu atbildreakciju. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, un to izmanto, lai noteiktu 100 % audu dzīvotspēju.

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma (ANO GHS / *CLP* 2. kategorija, ANO GHS 2A vai 2B kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko "ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas".

NSC_{killed}: nespecifiska krāsa nedzīvos audos.

NSC_{living}: nespecifiska krāsa dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiskā MTT redukcija.

OB: optiskais blīvums.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi (tādu, kura tiek uzskatīta par zinātniski validētu) bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Šeit iekļauti: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; iii) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testēšanas metodi, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (18).

Pozitīvā kontrole: paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka konkrētajā testa sistēmā tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (18).

Ticamība: pakāpe, kādā vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc viena un tā paša protokola var ilgāku laiku reproducējami izmantot konkrētu testēšanas metodi. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (18).

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķimikālijām (18).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķimikāliju (sk. "Ticamības" definīciju) (18).

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

RhCE: rekonstruēts cilvēka radzenei līdzīgs epitēlijs.

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli negatīvai kontrolei un pozitīvai kontrolei.

SD: standartnovirze.

Jutība: tā visu pozitīvo/aktīvo testējamo ķimikāliju daļa, kas ar testu tiek pareizi klasificētas. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (18).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko "neatgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 1. kategorija.

Darbības standartprocedūras (*SOP*): oficiālas, rakstiskas procedūras, kas detalizēti apraksta, kā veicamas konkrētas rutīnas un konkrētam testam specifiskas laboratorijas darbības. Tās ir nepieciešamas saskaņā ar labu laboratorijas praksi (*GLP*).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām testējamajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (18).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Tests: atsevišķas testējamās ķimikālijas paralēla testēšana ar vismaz diviem audu replikātiem, kā noteikts attiecīgajā *SOP*.

Audu dzīvotspēja: parametrs, ar ko šūnu populācijas kopējo aktivitāti rekonstruētos audos mēra kā to spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT, kas atkarībā no nosakāmā beigupunkta un izmantotās testēšanas shēmas korelē ar dzīvo šūnu kopskaitu un/vai dzīvotspēju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķimikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Secīgas testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā testēšanas metodes pielieto noteiktā secībā. Izmantojot pierādījumu izsvēršanu, visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju pārskata, lai pirms pārejas uz nākamo stratēģijas pakāpi noteiktu, vai pieejamās informācijas apjoms ir pietiekams, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas bīstamības potenciālu/potenci var noteikt, pamatojoties uz konkrētajā pakāpē pieejamo informāciju, papildu testēšana nav jāveic (18).

ULOQ: kvantitatīvās noteikšanas augšējā robeža.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ANO GHS un *CLP* 1. kategorija: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

ANO GHS un *CLP* 2. kategorija: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas: Ķimikālijas, kas neatbilst prasībām klasificēšanai ANO GHS / *CLP* 1. vai 2. kategorijā (vai ANO GHS 2A vai 2B kategorijā). Nozīmē to pašu, ko "neklasificētas ķimikālijas".

UPLC: īpaši augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (18).

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (18).

VRM: validēta references metode.

VRM1: EpiOcular™ *EIT* dēvē par 1. validēto references metodi.

VRM2: SkinEthic™ *HCE EIT* dēvē par 2. validēto references metodi.

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās vielas bīstamības potenciālu.

2. papildinājums

ĶIMIKĀLIJU, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARĶĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, IDENTIFICĒŠANAI VALIDĒTO *RHCE* TESTU GALVENĀS SASTĀVDAĻAS

Testa sastāvdaļas	**EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)**		**SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)**	
Protokoli	Šķidrumi (pilināmi ar pipeti 37 ± 1 °C vai zemākā temperatūrā 15 min)	Cietas vielas (nav pilināmas ar pipeti)	Šķidrumi un viskozas vielas (pilināmi ar pipeti)	Cietas vielas (nav pilināmas ar pipeti)
Modeļa virsma	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Audu replikātu skaits	Vismaz 2	Vismaz 2	Vismaz 2	Vismaz 2
Priekšpārbaude attiecībā uz krāsas interferenci	50 µl + 1 ml H_2O 60 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM (bezkrāsainas testējamās ķimikālijas), vai 50 µl + 2 ml izopropanola, maisa 2–3 h RT (krāsainas testējamās ķimikālijas) →ja testējamās ķimikālijas OB pie 570±20 nm pēc izopropanola vai ūdens OB atņemšanas ir > 0,08 (tas atbilst apmēram 5 % no negatīvās kontroles vidējā OB), jāpielieto dzīvas pielāgotas kontroles	50 mg + 1 ml H_2O 60 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM (bezkrāsainas testējamās ķimikālijas) un/vai 50 mg + 2 ml izopropanola, maisa 2–3 h pie RT (krāsainas un bezkrāsainas testējamās ķimikālijas) →ja testējamās ķimikālijas OB pie 570±20 nm pēc izopropanola vai ūdens OB atņemšanas ir > 0,08 (tas atbilst apmēram 5 % no negatīvās kontroles vidējā OB), jāpielieto dzīvas pielāgotas kontroles	10 mg + 90 µl H_2O maisa 30 ± 2 min pie istabas temperatūras (RT, 18-28°C) →ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāpielieto pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	10 mg + 90 µl H_2O maisa 30 ± 2 min pie RT →ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāpielieto pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Priekšpārbaude attiecībā uz tiešo MTT reducēšanos	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM →ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 50 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM →ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 50 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RM →ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 30 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RM →ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 30 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)
Priekšapstrāde	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS 30 ± 2 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM, sargājot no gaismas	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS 30 ± 2 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM, sargājot no gaismas	—	—
Apstrādes devas un aplicēšana	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) ar kalibrētu instrumentu (piem., pilna karote bez kaudzes, kas kalibrēta 50 mg nātrija hlorīda ietveršanai).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) viskozām vielām izmanto neilona sietu	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Ekspozīcijas ilgums un temperatūra	30 min (± 2 min) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	6 stundas (± 0,25 h) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	30 min (± 2 min) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	4 stundas (± 0,1 h) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM

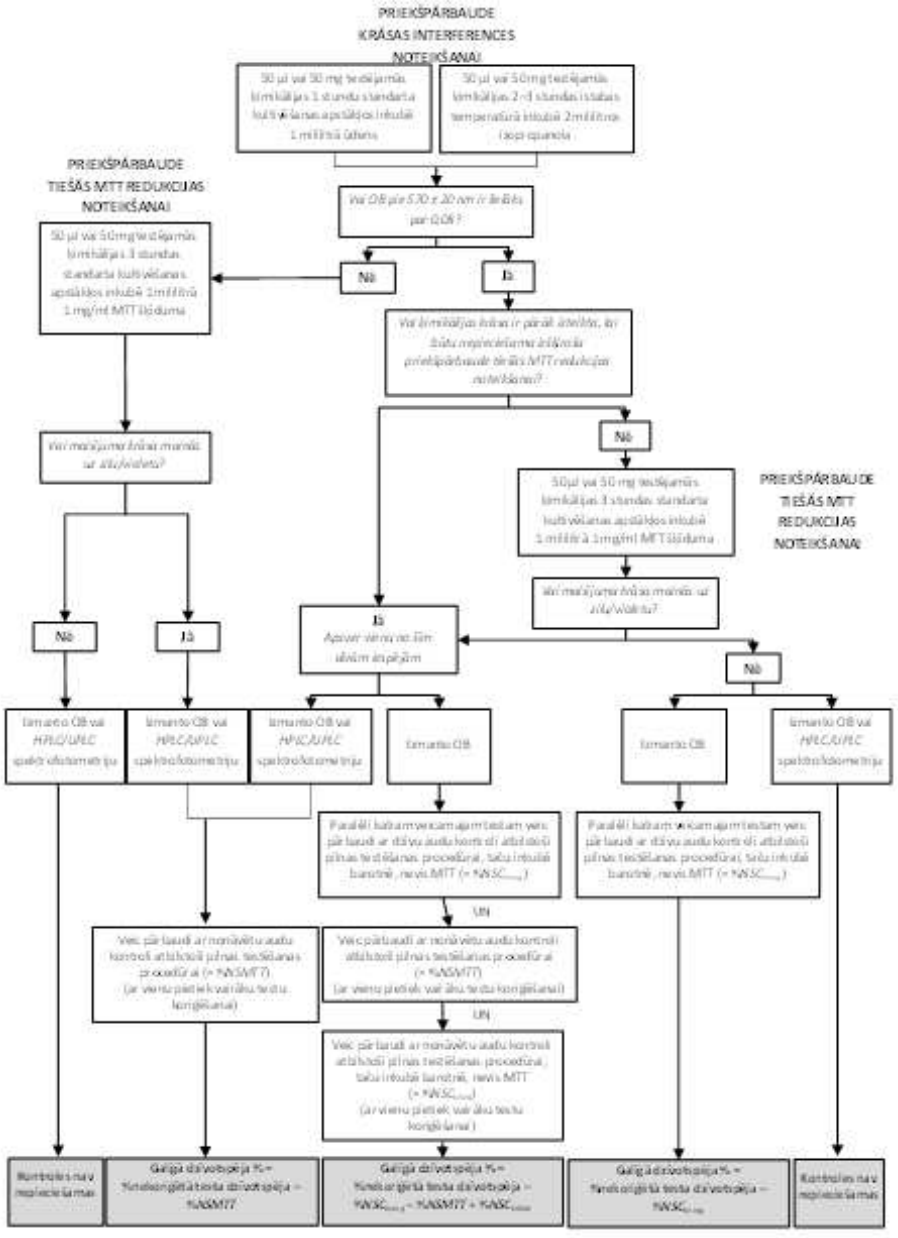
Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Skalošana istabas temperatūrā	3 reizes 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošā DPBS	3 reizes 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošā DPBS	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS
Pēcekspozīcijas iegremdēšana	12 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē	25 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē	30 min (± 2 min) 37 °C temperatūrā, 5 % CO_2, 95 % RM, kultūras barotnē	30 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē
Pēcekspozīcijas inkubēšana	120 min (± 15 min) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	18 h (± 0,25 h) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	nav	18 h (± 0,5 h) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM
Negatīvā kontrole	50 µl H_2O Testē paralēli	50 µl H_2O Testē paralēli	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS Testē paralēli	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS Testē paralēli
Pozitīvā kontrole	50 µl metilacetāta Testē paralēli	50 µl metilacetāta Testē paralēli	30 ± 2 µl metilacetāta Testē paralēli	30 ± 2 µl metilacetāta Testē paralēli

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
MTT šķīdums	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubācijas ilgums un temperatūra	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM
Ekstrakcijas šķīdinātājs	2 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta augšas un apakšas, caurdurot audus)	2 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta apakšas, caurdurot audus)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta augšas un apakšas)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta apakšas)
Ekstrakcijas ilgums un temperatūra	2–3 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai pa nakti 4–10 °C temperatūrā	2–3 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai pa nakti 4–10 °C temperatūrā	4 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai vismaz pa nakti bez kratīšanas 4–10 °C temperatūrā	Vismaz 2 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT
OB rādījums	570 nm (550–590 nm) bez references filtra	570 nm (550–590 nm) bez references filtra	570 nm (540–600 nm) bez references filtra	570 nm (540–600 nm) bez references filtra
Audu kvalitātes kontrole	Apstrāde ar 100 µl 0,3 % (tilpums/tipums) *Triton* X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Apstrāde ar 100 µl 0,3 % (tilpums/tipums) *Triton* X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 min apstrāde ar SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 min apstrāde ar SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Pieņemamības kritēriji	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 0,8 un < 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 30 min eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt < 50 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 0,8 un < 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 6 stundas eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt < 50 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 1,0 un ≤ 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 30 min eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt ≤ 30 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 1,0 un ≤ 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 4 stundas eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt ≤ 20 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.

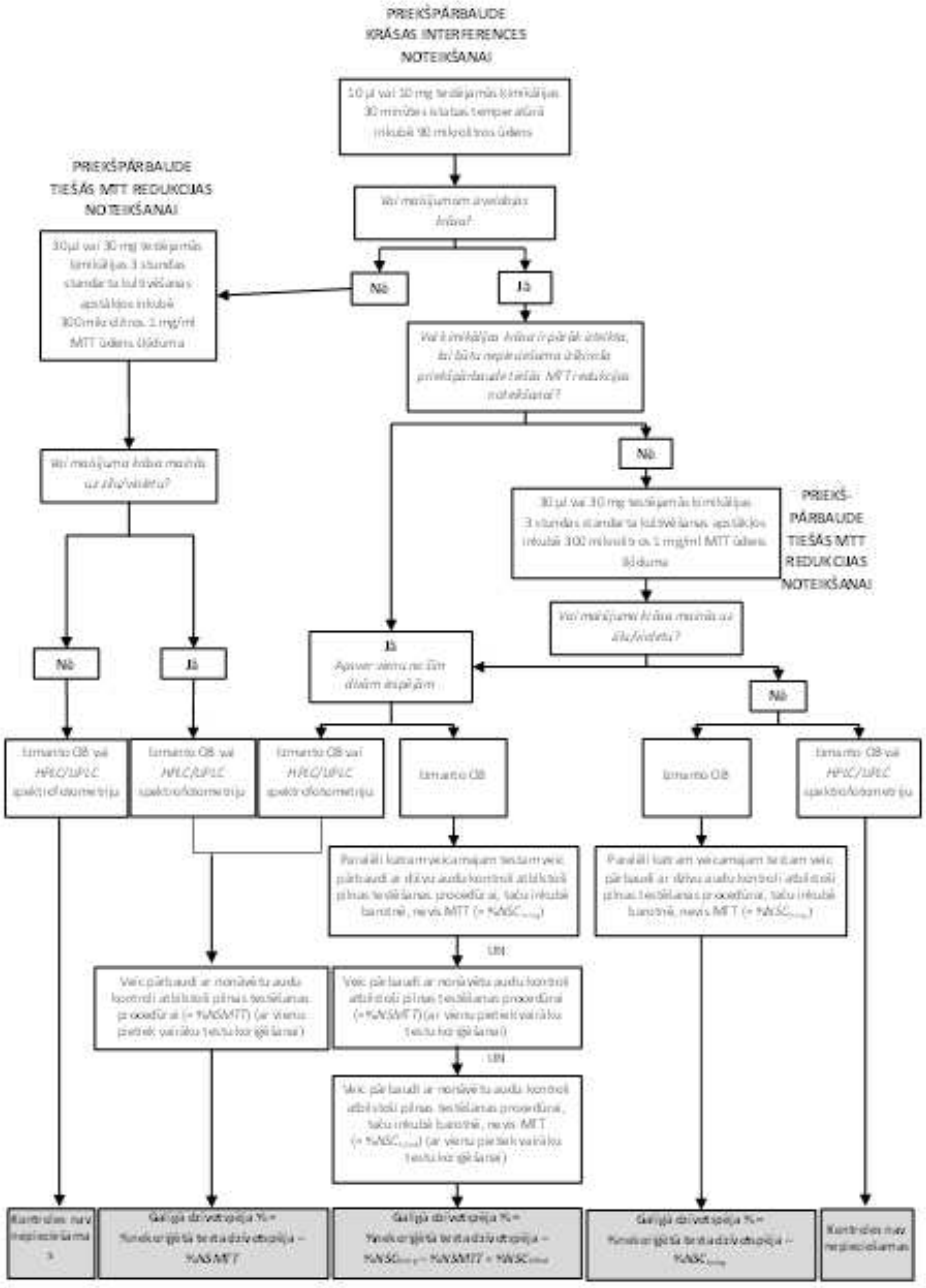
3. papildinājums

ILUSTRATĪVA DIAGRAMMA AR NORĀDĪJUMIEM PAR TO, KĀ IDENTIFICĒT TIEŠOS MTT REDUCĒTĀJUS UN/VAI KRĀSU INTERFERĒJOŠAS ĶIMIKĀLIJAS UN KĀ AR TĀM RĪKOTIES ATBILSTOŠI *VRM1* STANDARTPROCEDŪRAI



4. papildinājums

ILUSTRATĪVA DIAGRAMMA AR NORĀDĪJUMIEM PAR TO, KĀ IDENTIFICĒT TIEŠOS MTT REDUCĒTĀJUS UN/VAI KRĀSU INTERFERĒJOŠAS ĶIMIKĀLIJAS UN KĀ AR TĀM RĪKOTIES ATBILSTOŠI *VRM2* STANDARTPROCEDŪRAI



5. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO *RhCE* AUDU KONSTRUKCIJĀM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS *HPLC/UPLC* SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Saskaņā ar *FDA* norādījumiem izstrādāts protokols (36)(38)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātu dzīvu *RhCE* audu konstrukcijām), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātu nonāvē*RhCE* audu konstrukcijām) un krāsas (piem., metilēnzilā) analīze	$Laukums_{interference} \leq 20\ \%$ no $laukuma_{LLOQ}$ [1]
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	*CV* ≤ 15 % vai attiecībā uz *LLOQ* ≤ 20 %
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% nov. ≤ 15 % vai attiecībā uz *LLOQ* ≤ 20 %
Matrices efekts	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	85 % ≤ matrices efekts % ≤ 115 %
Pārnesums	Izopropanola analīze pēc *ULOQ* [2] standarta	$Laukums_{interference} \leq 20\ \%$ no $laukuma_{LLOQ}$
Reproducējamība (tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no *ULOQ*, t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % nov. ≤ 15 % vai attiecībā uz *LLOQ* ≤ 20 % Kvalitātes kontroles: % nov. ≤ 15 % un *CV* ≤ 15 %
Reproducējamība (no vienas dienas otrā)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīgā stabilitāte *RhCE* audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	% nov. ≤ 15 %
MTT formazāna ilglaicīgā stabilitāte *RhCE* audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas -20°C temperatūrā	% nov. ≤ 15 %

[1] LLOQ: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu audu dzīvotspēju 1–2 %, proti, 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas saskaņā ar definīciju vismaz divreiz pārsniedz augstāko gaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos (~70 µg/ml ar *VRM*), proti, 200 µg/ml.

B.70. **CILVĒKA REKOMBINANTIE ESTROGĒNRECEPTORU (*hr*ER) *IN VITRO* TESTI TĀDU ĶIMIKĀLIJU NOTEIKŠANAI, KAM PIEMĪT ER AFINITĀTE**

VISPĀRĪGS IEVADS

Veiktspējā balstītas testēšanas ESAO vadlīnija

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 493 (2015). Minētā *TG* Nr. 493 ir veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnija (*PBTG*), kas apraksta cilvēka rekombinantās *in vitro* testēšanas metodiku tādu vielu noteikšanai, kam piemīt estrogēnreceptoru afinitāte (*hr*ER saistīšanās testi). Tajā ietilpst divas mehānistiski un funkcionāli līdzīgas testēšanas metodes, ko izmanto, lai identificētu vielas, kas saistās ar estrogēnreceptoru (t. i., ERα), un tā varētu atvieglot jaunu līdzīgu vai modificētu testēšanas metožu izstrādi atbilstīgi validēšanas principiem, kas izklāstīti ESAO vadlīniju dokumentā *Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). Šīs *PBTG* pamatā ir divas pilnībā validētas references testēšanas metodes (sk. 2. un 3. papildinājumu):

— Freibergera–Vilsona (*Freyberger–Wilson*; turpmāk *FW*) estrogēnreceptoru (ER) saistīšanās *in vitro* tests, kurā izmanto pilnu cilvēka rekombinanto ERα (2), un

— Ķīmiskās izvērtēšanas un pētniecības institūta (*Chemical Evaluation and Research Institute and Research Institute*; turpmāk "*CERI*") estrogēnreceptoru saistīšanās *in vitro* tests, kurā izmanto cilvēka rekombinanto liganda saistīšanās domēna proteīnu (2).

Ir izstrādāti veiktspējas standarti (VS) (3), kas sekmē līdzīgu testēšanas metožu izstrādi un validēšanu attiecībā uz to pašu bīstamības beigupunktu un dod iespēju savlaicīgi grozīt *PBTG* Nr. 493, atjaunināto *PBTG* ļaujot papildināt ar jauniem līdzīgiem testiem. Tomēr līdzīgus testus pievieno tikai pēc to izskatīšanas un ESAO apstiprinājuma, ka ir izpildīti veiktspējas standarti. Izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, *TG* Nr. 493 iekļautos testus bez izšķirības var izmantot, lai nodrošinātu ESAO dalībvalstu prasības pēc testēšanas rezultātiem attiecībā uz estrogēnreceptora saistīšanos.

Testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

2. ESAO 1998. gadā sāka īstenot prioritārus pasākumus ar mērķi pārskatīt esošās un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas potenciālo endokrīno disruptoru skrīningam un testēšanai. 2012. gadā tika pārskatīts ESAO potenciālo endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālais satvars (KS). Gan sākotnējais, gan pārskatītais KS ir iekļauts pielikumā Vadlīniju dokumentam par standartizētām testēšanas metodēm ķimikāliju vērtēšanai attiecībā uz potenciālu endokrīni disruptīvu iedarbību (4). KS aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim. Šajā testēšanas metodē aprakstītie ER saistīšanās testi atbilst 2. līmenim, kas ietver "*in vitro testus, kas sniedz datus par izvēlētiem endokrīniem mehānismiem/ceļiem*". Testēšanas metode paredzēta *in vitro* receptoru saistīšanās testiem, ar ko identificē cilvēka estrogēnreceptora alfa (ERα) ligandus.

3. Ir skaidri pierādīts *in vitro* ER saistīšanās testa relevantums attiecībā uz bioloģiskajām funkcijām. ER saistīšanās testi izstrādāti, lai identificētu ķimikālijas, kam piemīt disruptīvs potenciāls attiecībā uz estrogēnu tipa hormonu ceļu, un pēdējo divdesmit gadu laikā tie plaši izmantoti, lai raksturotu ER audu izkliedi, kā arī identificētu ER agonistus/antagonistus. Šie testi atspoguļo ligandu–receptoru mijiedarbību, kas attiecībā uz reproduktīvo funkciju visiem mugurkaulniekiem ir estrogēnu signālceļa sākumpunkts.

4. Estrogēnu–ER mijiedarbība var ietekmēt estrogēnu regulēto gēnu transkripciju un inducēt negenomisku ietekmi, un tā rezultātā var tikt inducēti vai inhibēti šūnu procesi, tostarp tādi, kas saistīti ar šūnu vairošanos, normālu augļa attīstību un reproduktīvo funkciju (5)(6)(7). Normālu estrogēnisko sistēmu traucējumi var negatīvi ietekmēt normālu attīstību (ontoģenēzi), reproduktīvo veselību un reproduktīvās sistēmas integritāti. Neatbilstoši ER signāli var radīt, piemēram, palielinātu hormonatkarīgu audzēju risku, pasliktinātu auglību un mainītu augļa augšanas un attīstības gaitu (8).

5. *In vitro* saistīšanās testu pamatā ir vielu tieša vai netieša mijiedarbība ar specifisku receptoru liganda saistīšanās domēnu, kas regulē gēnu transkripciju. Cilvēka rekombinantā estrogēnreceptora alfa (*hr*ERα) saistīšanās testa galvenais komponents mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^{3}H]17β-estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t. i., konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus un dokumentē ER specifiskumu, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

6. *CERI* validējošie pētījumi un *FW* saistīšanās testi ir pierādījuši, ka minētie komponenti ir relevanti un ticami paredzētajam nolūkam (2).

7. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

Receptora saistīšanās testu tvērums un ierobežojumi

8. Šie testi paredzēti skrīninga un prioritizēšanas vajadzībām, tomēr tie var sniegt arī informāciju par molekulāro iniciācijas notikumu (*MIE*), ko var izmantot pierādījumu svara pieejā. Šie testi *in vitro* sistēmā aplūko ķīmisko saistīšanos ar ERα liganda saistīšanās domēnu. Tāpēc rezultātus nevajadzētu tieši ekstrapolēt uz neskartas endokrīnās sistēmas kompleksajiem signalizēšanas un regulēšanas mehānismiem *in vivo*.

9. Dabīgā liganda (17β-estradiola) saistīšanās ir sākumpunkts molekulāru notikumu sērijā, kas aktivizē mērķa gēnu transkripciju un galu galā kulminē ar fizioloģiskām pārmaiņām (9). Tādējādi saistīšanās ar ERα liganda saistīšanās domēnu tiek uzskatīta par vienu no svarīgākajiem ER mediētiem endokrīnās disrupcijas (ED) mehānismiem, lai gan pastāv arī citi ED izraisoši mehānismi, t. sk.: i) mijiedarbība ar citiem ERα domēniem, ne tikai ar liganda saistīšanās kabatu; ii) mijiedarbība ar citiem estrogēnu signalizēšanā būtiskiem receptoriem, ar ERβ un estrogēnreceptoru, kas sasaistīts ar G proteīnu, ar citiem endokrīnās sistēmas receptoriem un fermentu sistēmām; iii) hormonu sintēze; iv) metaboliska hormonu aktivācija un/vai inaktivācija; v) hormonu izkliede mērķaudos un vi) hormonu izvadīšana no organisma. Neviens šajā testēšanas metodē iekļautais tests neattiecas uz uzskaitītajiem iedarbības veidiem.

10. Šī testēšanas metode aplūko vielu spēju saistīties ar cilvēka ERα, un tā neizšķir ERα agonistus un antagonistus. Šajos testos netiek aplūkoti tādi tālāki lejupēji notikumi kā gēnu transkripcija vai fizioloģiskas pārmaiņas. Tā kā validācijā tika izmantotas tikai vienkomponenta vielas, nav informācijas par testa izmantojamību ar maisījumiem. Tomēr teorētiski šie testi ir izmantojami daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

11. Šūnas nesaturošām receptoru sistēmām nepiemīt iekšēja metaboliskā spēja, un tās nav validētas kombinācijā ar metaboliskām fermentu sistēmām. Pētījumu plānā gan varētu iekļaut metabolisku aktivitāti, bet tam būtu vajadzīga papildu validācija.

12. Nedrīkst testēt tādas ķimikālijas, kas varētu atņemt proteīna, proti, receptorproteīna, dabiskās īpašības (piem., virsmaktīvie aģenti) vai mainīt testa buferšķīduma pH, vai arī tās drīkst testēt tikai koncentrācijās, kas šādu mijiedarbību nepieļauj. Visos pārējos gadījumos testā izmantojamās testējamās ķimikālijas koncentrācijas diapazons ir atkarīgs no tās šķīdības testa buferšķīdumā.

13. Informatīvā nolūkā 1. tabulā ir sniegti testa rezultāti par 24 vielām, kas testētas ar abiem pilnībā validētajiem references testiem, kas aprakstīti šajā testēšanas metodē. No publicētajiem testēšanas pārskatiem t. sk. no *in vitro* testiem uz ER transkripcionālo aktivāciju un/vai uterotrofiskā testa izriet, ka 17 no šīm vielām klasificētas kā tādas, kas saistās ar ER, bet 6 vielas ir nesaistās ar ER (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Runājot par 1. tabulā apkopotajiem datiem, abu testu rezultāti gandrīz 100 % sakrita attiecībā uz visu vielu klasifikāciju līdz pat 10^{-4}M, un visas vielas bija pareizi klasificētas kā saistīgas vai nesaistīgas ar ER. Papildu informācija par šo vielu grupu un par citām vielām, kas validācijas pētījumu gaitā testētas ER saistīšanās testos, ir sniegta *hr*ER saistīšanās testa veiktspējas standartos (3), 2. papildinājumā (1., 2. un 3. tabulā).

1. tabula

Vielu klasifikācija pēc to saistīšanās vai nesaistīšanās ar ER, testējot tās ar *FW* un *CERI hr*ER saistīšanās testiem, un salīdzinājums ar sagaidāmo rezultātu

	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	*FW* tests		*CERI* tests		Klase pēc *MeSH* klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
1	17β-estradiols	50-28-2	*saisteklis*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
2	Noretinodrels	68-23-5	*saisteklis*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
3	Noretindrons	68-22-4	*saisteklis*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
4	Di-*n*-butilftalāts	84-74-2	*nesaisteklis* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis (**) ()	ogļūdeņradis (ciklisks), esteris	plastifikators, ķimikāliju starpprodukts
5	DES	56-53-1	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
6	17α-etinilestradiols	57-63-6	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
7	Mezo-heksestrols	84-16-2	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
8	Genisteīns	446-72-0	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (heterociklisks), flavonoīds	dabisks produkts
9	Ekvols	531-95-3	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	fitoestrogēna metabolīts	dabisks produkts
10	Butilparabēns (*n* butil-4-hidroksibenzoāts)	94-26-8	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	parabēns	konservants

	Vielas nosaukums	CAS reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	*FW* tests		*CERI* tests		Klase pēc *MeSH* klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
11	Nonilfenols (maisījums)	84852-15-3	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	alkilfenols	starpproduktu savienojums
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	hlororganiska viela	insekticīds
13	Kortikosterons	50-22-6	*nesaisteklis* (*)	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	nesaisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	nesaisteklis	steroīds	dabisks produkts
14	Zearalenons	17924-92-4	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (heterociklisks), laktons	dabisks produkts
15	Tamoksifēns	10540-29-1	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisks)	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
16	5α-dihidrotestosterons	521-18-6	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	nefenolisks steroīds	dabisks produkts
17	Bisfenols A	80-05-7	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	fenols	ķimikāliju starpprodukts
18	4-*n*-heptilfenols	1987-50-4	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	neskaidra [a]	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	alkilfenols	starpprodukts
19	Kepons (hlordekons)	143-50-0	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	ogļūdeņradis (halogenēts)	pesticīds
20	Benz(a)antracēns	56-55-3	*nesaisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	nesaisteklis [b]	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	nesaisteklis [b]	aromātiskais ogļūdeņradis	starpprodukts
21	Enterolaktons	78473-71-9	*saisteklis*	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-3}$	saisteklis	fitoestrogēns	dabisks produkts
22	Progesterons	57-83-0	*nesaisteklis* (*)	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	nesaisteklis	$1\times10^{-10} – 1\times10^{-4}$	nesaisteklis	steroīds	dabisks produkts

	Vielas nosaukums	CAS reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	*FW* tests		*CERI* tests		Klase pēc *MeSH* klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
23	Oktiltrietoksisilāns	2943-75-1	*nesaisteklis*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	nesaisteklis	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	nesaisteklis	silāns	virsmas modifikators
24	Atrazīns	1912-24-9	*nesaisteklis* (*)	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	nesaisteklis	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	nesaisteklis	heterociklisks savienojums	herbicīds

(*) Šķīdības robeža $< 1 \times 10^{-4}$M.

(**) Di-*n*-butilftalāts (DBP) tiek lietots un klasificēts kā nesaisteklis, balstoties uz testēšanu koncentrācijā līdz 10^{-4} M, tāpēc ka pirmsvalidācijas pētījumos dažās laboratorijās pie 10^{-3}M koncentrācijas tika novērota vielas nešķīdība (t. i., tā kļuva duļķaina).

(+) Validēšanas pētījumā di-*n*-butilftalāts (DBP) tika testēts kā kodēta testējamā viela koncentrācijās līdz 10^{-3}M. Šādos testa apstākļos dažas laboratorijas novēroja vai nu radioaktīvi marķētā liganda saistīšanās samazinājumu pie augstākās koncentrācijas (10^{-3}M), vai/un neviennozīmīgi interpretējamu līkni. Šajās testēšanas reizēs DBP klasifikācija bija "neskaidra" vai tas tika klasificēts kā "saisteklis" trijās no piecām laboratorijām, kuras izmantoja *CERI* testu, un piecās no sešām laboratorijām, kuras izmantoja *FW* testu (sk. (2) atsauces IV.B.3a.,b. un VI.A. iedaļu).

([a]) Klasifikācija atšķīrās no sagaidāmā rezultāta. Ņemot vērā, ka trijās no piecām laboratorijām 4-*n*-heptilfenola klasifikācija bija "neskaidra" vai tas tika klafisicēts kā "nesaisteklis", tā klasifikāciju definēja kā neskaidru. Sīkāka izpēte atklāja, ka šādu rezultātu izraisīja ķīmiskās šķīdības ierobežojums, kas neļāva izveidot pilnu saistīšanās līkni.

([b]) Validēšanas pētījuma gaitā, balstoties uz publicēto literatūru, kas pierāda, ka šai vielai paziņotā *in vitro* estrogēnu aktivitāte (16) primāri ir atkarīga no tās metaboliskās aktivācijas(17)(18), benz(a)antracēns tika pārkvalificēts par nesaistekli (t.i. negatīvs rezultāts). Šūnas nesaturošos *hr*ER saistīšanās testos, kādi izmantoti šajā starplaboratoriju validēšanas pētījumā, nav sagaidāma vielas fermentatīva metaboliskā aktivācija. Tādējādi šī viela būtu pareizi klasificējama par nesaistekli, kur to eksperimentālos apstākļos lieto *FW* un *CERI* testos.

***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**

Nepieciešamie testa komponenti

14. Šī testēšanas metode attiecas uz testiem, kuru galvenais elements ir estrogēnreceptors (ER) un atbilstoša stipruma ligands, ko testā var izmantot kā marķieri / iezīmēto elementu un kas, palielinoties testējamās ķimikālijas koncentrācijai, var tikt pārvietots. Saistīšanās testu divi galvenie komponenti ir šādi: 1) piesātinājuma–saistīšanās tests un 2) konkurējošā saistīšanās. Piesātinājuma–saistīšanās testu izmanto, lai apstiprinātu receptoru preparātu specifiskumu un aktivitāti, savukārt konkurējošās saistīšanās eksperimenta mērķis ir izvērtēt testējamās ķimikālijas spēju saistīties ar *hr*ER.

Kontroles

15. Apraksta ierosinātos paralēlos references estrogēnus un kontroles. Paralēlās kontroles — šķīdinātājs (nesējs), pozitīvā kontrole (saistīgs ar ER; stipra un vāja afinitāte), negatīvā kontrole (nesaistīgs) — vajadzības gadījumā kalpo kā indikators, ka tests pie konkrētajiem testēšanas nosacījumiem funkcionē un ļauj savstarpēji salīdzināt eksperimentus; parasti paralēlās kontroles ir daļa no konkrētā eksperimenta pieņemamības kritērijiem (1). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs jāiekļauj: 1) katra E2 un vāja saistekļa augstas koncentrācijas (aptuveni tāda, pie kuras radioaktīvi marķētais ligands tiek pilnībā pārvietots) un vidējas koncentrācijas (aptuveni IC_{50}) triplikāti; 2) šķīdinātāja kontroles un nespecifiskās saistīšanās triplikāti.

Standarta kvalitātes kontroles procedūras

16. Katram testam veic aprakstītās standarta kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu, ka aktīvie receptori, pareizas ķīmiskās koncentrācijas un tolerances intervāli saglabājas stabili vairākkārtējās replikācijās un nezaudē spēju laika gaitā nodrošināt gaidītās ER saistīšanās reakcijas.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

17. Visām laboratorijām pirms nezināmu ķimikāliju testēšanas ar jebkuru no šīs testēšanas metodes testiem jāpierāda sava kvalifikācija konkrētā testa izmantošanā, veicot piesātinājuma testus, lai apstiprinātu ER preparāta specifiskumu un aktivitāti, un konkurējošās saistīšanās testus ar references estrogēniem un kontrolēm (vājiem saistekļiem un nesaistekļiem). Laboratorijai jāizveido vēsturiska datubāze, kurā apkopti trīs līdz piecu neatkarīgu, dažādās dienās veiktu eksperimentu rezultāti, kas gūti ar references estrogēnu un kontrolēm. Šie eksperimenti būs pamats laboratorijas references estrogēnam un vēsturiskajām kontrolēm, un turpmākās testēšanas reizēs tos izmantos kā testu pieņemamības novērtējuma daļu.

18. Jāapstiprina arī testa sistēmas reaģētspēja, izdarot 2. tabulā iekļauto standartvielu testēšanu. Standartvielu saraksts ir ER saistīšanās testu veiktspējas standartos norādīto references vielu apakškopa (3). Šīs vielas ir komerciāli pieejamas un ir attiecībā uz tādu ķimikāliju klasēm, ko parasti asociē ar ER afinitāti, reprezentatīvas, kā arī tām ir pienācīgs ER afinitātes diapazons (no spēcīgas līdz vājai), kāds būtu sagaidāms ER saistekļiem un nesaistekļiem (t. i., attiecībā uz negatīvajiem rezultātiem). Attiecībā uz katru standartvielu testētajām koncentrācijām būtu jāaptver 2. tabulā norādītais diapazons. Ar katru vielu jāveic vismaz trīs eksperimenti, un rezultātiem jāatbilst sagaidāmajai ķīmiskajai aktivitātei. Katrs eksperimentu veic neatkarīgi (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentu), katrai koncentrācijai izmantojot trīs replikātus. Kompetence ir pierādīta, ja katra standartviela tiek pareizi klasificēta (pozitīva/negatīva reakcija). Kompetences testēšanu atkārto katrs laborants, kas apgūst testēšanas metodi.

2. tabula

Hr ER konkurējošās saistīšanās testu kontroļu un standartvielu saraksts ([87])

Nr.	Vielas nosaukums	CAS reģ. Nr. ([1])	Sagaidāmais rezultāts ([3]) ([4])	Testa koncentrācijas diapazons (M)	MeSH ķimikāliju klase ([5])	Produkta klase ([6])
Kontroles (references estrogēns, vājš saisteklis, nesaisteklis)						
1	17β–estradiols	50-28-2	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
2	Noretinodrels (vai) Noretindrons	68-23-5 (vai) 68-22-4	saisteklis	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
3	Oktiltrietoksisilāns	2943-75-1	nesaisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	silāns	virsmas modifikators
Standartvielas ([6])						
4	Dietilstilbestrols	56-53-1	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
5	17α-etinilestradiols	57-63-6	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
6	Mezo-heksestrols	84-16-2	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
7	Tamoksifēns	10540-29-1	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	ogļūdeņradis (ciklisks)	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
8	Genisteīns	446-72-0	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	heterociklisks savienojums, flavonoīds	dabisks produkts

Nr.	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr. (1)	Sagaidāmais rezultāts (3) (4)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	*MeSH* ķimikāliju klase (5)	Produkta klase (6)
9	Bisfenols A	80-05-7	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	fenols	ķimikāliju starpprodukts
10	Zearalonons	17924-92-4	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	heterociklisks savienojums, laktons	dabisks produkts
11	Butilparabēns	94-26-8	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karbonskābe, fenols	konservants
12	Atrazīns	1912-24-9	nesaisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	heterociklisks savienojums	herbicīds
13	Di-*n*-butilftalāts (DBP) (7)	84-74-2	nesaisteklis (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	ogļūdeņradis (ciklisks), esteris	plastifikators, ķimikāliju starpprodukts
14	Kortikosterons	50-22-6	nesaisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	steroīds	dabisks produkts

(1) Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs.
(3) *CERI* un *FW hr*ER saistīšanās testu validēšanas pētījumā klasificēts kā saistīgs ar ERαavai kā nesaisteklis (2).
(4) ER saistīšanās aktivitāte ir balstīta uz "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays" (9), kā arī uz empīriskiem datiem un citu informāciju, kas iegūta no publicētajiem un recenzētajiem atsauces pētījumiem (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).
(7) Alternatīvi, ja testu veic ar maksimālo koncentrāciju 10^{-4} M, par nesaistekļa kontroli var izmantot DBP.
(8) Šīs vielas šķīdības robeža ir 10^{-4} M. Di-*n*-butilftalāts (DBP) tiek lietots un klasificēts kā nesaisteklis, balstoties uz testēšanu koncentrācijā līdz 10^{-4} M, tāpēc ka pirmsvalidācijas pētījumos dažās laboratorijās pie 10^{-3}M koncentrācijas tika novērota vielas nešķīdība (t. i., tā kļuva duļķaina).

Testējamo ķimikāliju šķīdības un koncentrācijas diapazona noteikšana

19. Ir jāveic sagatavošanās tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testā. Sākotnēji katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes. Trešā un ceturtā eksperimenta koncentrācijas būtu jāpielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

Pieņemamības kritēriji katrai testēšanas reizei

20. Konkrēta eksperimenta pieņemšana vai noraidīšana notiek, izvērtējot rezultātus, kas iegūti ar references estrogēnu un kontroli. Pirmkārt, — attiecībā uz 1. plati — pilnām koncentrāciju līknēm, kas iegūtas ar katra eksperimenta references kontroli, jāatbilst līknei atbilstošajiem veiktspējas mērījumu parametriem (piem., IC_{50} un Hilla virziena koeficientam), balstoties uz rezultātiem, kas paziņoti attiecīgajos *CERI* un *FW* testu protokolos (2. un 3. papildinājums), un vēsturiskajiem kontroles datiem, ko apkopojusi testa veicēja laboratorija. Katrā eksperimentā jābūt pareizi klasificētām visām kontrolēm (references estrogēni, vāji saistekļi un nesaistekļi). Otrkārt, visās turpmākajās platēs ir jāvērtē kontroles konsekventums attiecībā pret 1. plati. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu. Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām testēšanas reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Laboratorija savu spēju konsekventi veikt testu pierāda, izveidojot un uzturot vēsturisku datubāzi, kurā apkopoti references estrogēnu un kontroļu rezultāti. Lai nodrošinātu reproducējamību laboratorijas ietvaros, var izmantot references estrogēna un vāja saistekļa kontroles līknēm atbilstošo parametru vidējo vērtību standartnovirzes (SN) vai variācijas koeficientus (VK), kas iegūti daudzos eksperimentos. Katrā testēšanas reizē iegūtos plates kontroļu rezultātus, kā arī ar katru testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus ir jāizvērtē speciālistam.

Bez tam attiecībā uz pieņemamības kritērijiem ir jāievēro šādi principi:

— datiem jābūt pietiekamiem, lai varētu kvantitatīvi novērtēt ER saistīšanos;

— testētajām koncentrācijām jāsaglabājas testējamās ķimikālijas šķīdības diapazonā.

Datu analīze

21. Definētajai datu analīzes procedūrai attiecībā uz piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās datiem jāatbilst pamatprincipiem, ko izmanto receptora–liganda mijiedarbības raksturošanai. Parasti piesātinājuma–saistīšanās datus analizē, izmantojot nelineāru regresijas modeli, kas atspoguļo gan kopējo, gan nespecifisko saistīšanos. Iespējams, ka, nosakot *Bmax* un *Kd*, vajadzēs izmantot liganda noplicināšanās korekciju (piem., *Swillens*, 1995 (19)). Datus no konkurējošās saistīšanās testiem parasti transformē (piem., procentuālā specifiskā saistīšanās un testējamās ķimikālijas koncentrācija (log M)). Katras testējamās ķimikālijas aplēstais log (IC_{50}) ir jānosaka, izmantojot piemērotu nelineāras līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem. Pēc sākotnējās analīzes jāpārbauda, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli jānosaka, cik precīzi saistīšanās dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Dažos gadījumos, lai panāktu precīzāko atbilstību līknei, var būt jāveic papildu analīze (piem., ierobežojot līknes augšējo un/vai apakšējo punktu, izmantojot 10 % kritēriju, sk. 4. papildinājumu un 2. atsauci (III.A.2. iedaļa).

22. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji (20. punkts), tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā testā tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pareizu pirmā izpildītā testa rezultātu replicēšana.

Vispārīgie datu interpretācijas kritēriji

23. Pašlaik nav vispārpieņemtas metodes, kā interpretēt ER saistīšanās datus. Tomēr visi *hr*ER-mediētas aktivitātes kvalitatīvie (piem., saisteklis/nesaisteklis) un/vai kvantitatīvie (piem., log IC_{50}, relatīvā afinitāte (*relative binding affinity — RBA*), utt.) novērtējumi jābalsta uz empīriskiem datiem un pamatotiem zinātniskiem spriedumiem.

Testēšanas pārskats

24. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Tests:

— izmantotais tests.

Kontroles/references/testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja zināma;

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un nogulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota.

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļošs raksturojums, norādot sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantās fizikālķīmiskās īpašības.

Šķīdinātājs/nesējs:

— raksturojums (veids, piegādātājs un sērija);

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināma.

Receptori:

— receptoru avots (piegādātājs, kataloga Nr., sērija, receptora suga, piegādātāja nodrošinātā aktīvo receptoru koncentrācija, piegādātāja sertifikāts);

— receptoru raksturojums (ieskaitot piesātinājuma–saistīšanās rezultātus): *Kd*, *Bmax*;

— receptoru uzglabāšana;

— radioaktīvi marķētais ligands:

— piegādātājs, kataloga Nr., sērija, specifiskā aktivitāte.

Testēšanas apstākļi:

— šķīdības ierobežojums konkrētā testa apstākļos;

— saistīšanās buferšķīduma sastāvs;

— receptora koncentrācija;

— iezīmētā elementa (t. i., radioaktīvi marķētā liganda) koncentrācija;

— testējamās ķimikālijas koncentrācijas;

— nesēja saturs (procentuāli) galīgajā testā;

— inkubācijas temperatūra un ilgums;

— metode ar kuru nosaka, vai saistīts/brīvs;

— pozitīvās un negatīvās kontroles/references vielas;

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Pieņemamības pārbaude

— faktiskās IC_{50} un Hilla virziena koeficienta vērtības paralēlajām pozitīvajām kontroles/references vielām.

Rezultāti:

— jēldati un saistītie/brīvie dati;

— denaturēta apstiprinoša pārbaude (attiecīgā gadījumā);

— zemākā iedarbīgā koncentrācija (*LEC*), ja tāda ir;

— RBA un/vai IC_{50} vērtība (attiecīgā gadījumā);

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība;

— statistiskās analīzes (attiecīgā gadījumā), kā arī kļūdas un ticamības mērs (piem., vidējās vērtības standartnovirze (*SEM*), standartnovirze (SN), variācijas koeficients (VK) vai 95 % ticamības intervāls (*CI*)) un apraksts, kā šīs vērtības iegūtas.

Rezultātu iztirzājums:

— 10 % kritērija piemērošana.

Secinājums

LITERATŪRA

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

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN SAĪSINĀJUMI

10 % kritērijs: izvēle no analīzes izslēgt tādus datu punktus, kuros ar replikātiem iegūtā [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās procentuālā vidējā vērtība par 10 % vai vairāk pārsniedz pie zemākas koncentrācijas iegūto vidējo vērtību (sk. 4. papildinājumu).

Pieņemamības kritēriji: minimālie standarti, kas attiecas uz eksperimenta kontrolēm un references standartiem. Lai eksperimentu uzskatītu par derīgu, visiem pieņemamības kritērijiem jābūt izpildītiem.

Pareizība (konkordantums): pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (1).

KS: ESAO konceptuālais satvars (KS) endokrīno disruptoru testēšanai un izvērtēšanai.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

VK: variācijas koeficients.

E2: 17β-estradiols.

ED: endokrīnā disrupcija.

***hERα*:** cilvēka estrogēnreceptors alfa.

ER: estrogēnreceptors.

Estrogēniskā aktivitāte: ķimikālijas spēja imitēt 17β-estradiolu, proti, saistīties ar estrogēnreceptoriem. Ar šo testēšanas metodi var konstatēt saistīšanos ar *hERα*.

IC50: testējamās inhibējošās ķimikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

***ICCVAM*:** Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpaģentūru komiteja.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par "interlaboratoriju reproducējamību") nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (1).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par "intralaboratoriju reproducējamību" (1).

***LEC*:** zemākā iedarbīgā koncentrācija ir zemākā koncentrācija, kurā testējamā ķīmikālija izraisa reakciju (t. i., testējamās ķimikālijas zemākā koncentrācija, pie kuras indukcijas reizinājums ir statistiski atšķirīgs no paralēlās nesēja kontroles).

Atdarinājuma tests: sadzīvisks apzīmējums testam, kas ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgs validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Brīvi aizstājams ar līdzīgu testēšanas metodi.

***PBTG*:** veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnijas.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testu salīdzināmību. Tie ietver: 1) nepieciešamos testa komponentus; 2) minimālo tādu references ķimikāliju sarakstu, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī 3) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmus pareizības un ticamības līmeņus, kādi būtu jāiegūst ar ierosināto testu, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (1).

Standartvielas: veiktspējas standartos iekļauto references vielu apakškopa, ko laboratorijas var izmantot, lai pierādītu savu tehnisko kompetenci ar standartizētu testu. Šādu vielu atlases kritēriji parasti ir, piemēram šādi: viela ir reprezentatīva dažādām reakcijām, ir komerciāli pieejama un par to pieejami ļoti kvalitatīvi references dati.

Kompetence: vēl pirms nezināmu vielu testēšanas pierādīta spēja pienācīgi veikt testu.

References estrogēns: 17ß-estradiols (E2, *CAS* 50-28-2).

References testēšanas metodes: testi, uz kuriem balstās *PBTG* Nr. 493.

***RBA*:** relatīvā afinitāte. Vielas *RBA* aprēķina kā procentuālu vērtību no vielas log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (1).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc vienu un tā paša protokola var ilgstoši reproducējami veikt konkrētu testu. To novērtē, aprēķinot reproducējamību vienā laboratorijā un vairākās laboratorijās.

SN: standartnovirze.

Testējamā ķimikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Validēta testēšanas metode: tests, kura relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (1).

Validācija: Process, kurā nosaka, kādā mērā konkrēta pieeja, metode, tests, process vai novērtējums ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

2. papildinājums

FREIBERGERA–VILSONA IN VITRO TESTI, KAS BALSTĀS UZ PIESĀTINĀJUMU UN KONKURĒJOŠO SAISTĪŠANOS AR ESTROGĒNRECEPTORU (ERA) UN KUROS IZMANTO PILNU REKOMBINANTO ERA

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šis *in vitro* piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās ar estrogēnreceptoriem (ERα) tests izmanto pilnu cilvēka receptoru — ERα*α*(*hr*ERα) —, iegūtu un izolētu no insektu šūnām, kuras inficētas ar bakulovīrusu. Freibergera un Vilsona izstrādātajam protokolam veikts starptautisks daudzlaboratoriju validēšanas pētījums (2), kas pierādīja testa relevanci un ticamību paredzētajam nolūkam.

2. Šis tests ir skrīninga procedūra, ar ko identificē vielas, kas spēj saistīties ar pilnu *hr*ERα. To izmanto, lai noteiktu testējamās ķimikālijas spēju konkurēt ar 17β-estradiolu attiecībā uz saistīšanos ar *hr*ERα. Kvantitatīvie testa rezultāti var ietvert IC_{50} (mērs, kas rāda testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas vajadzīga, lai no *hr*ERα pārvietotu pusi no [^{3}H]-17β-estradiola) un testējamo ķimikāliju relatīvo afinitāti attiecībā uz *hr*ERα salīdzinājumā ar 17β-estradiolu. Ķīmiskā skrīninga vajadzībām pieņemami kvalitatīvie testa rezultāti var ietvert testējamo ķimikāliju klasificēšanu saistīgās vai nesaistīgās ar *hr*ERα vai tādās, kuru saistīgums ir neskaidrs, uz to kritēriju pamata, kas aprakstīti attiecībā uz saistīšanās līknēm.

3. Testā izmanto radioaktīvi marķētu ligandu, tāpēc laboratorijai būs vajadzīga radioaktīvo materiālu licence. Visas procedūras ar radioaktīvajiem izotopiem un bīstamām ķimikālijām jāveic, ievērojot nacionālajos tiesību aktos paredzētos noteikumus un procedūras.

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem jāizlasa sadaļas "**VISPĀRĪGAIS IEVADS**" un "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**". Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. *Hr*ERα saistīšanās tests mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^{3}H]17β-estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t. i., konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti.

6. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

7. Piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta mērķis ir raksturot konkrētas receptoru partijas afinitāti un konkurējošās saistīšanās eksperimentā — to skaitu preparātā. Piesātinājuma–saistīšanās eksperiments līdzsvara apstākļos mēra fiksētas estrogēnreceptora koncentrācijas afinitāti tā dabīgajam ligandam (to izsaka disociācijas konstante, *Kd*), un aktīvo receptoru domēnu koncentrāciju (*Bmax*).

8. Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra tādas vielas afinitāti, kura attiecībā uz saistīšanos ar ER konkurē ar [^{3}H]17β-estradiolu. Afinitāti kvantitatīvi izsaka kā testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas līdzsvara apstākļos inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās (apzīmē kā "50 % inhibējošo koncentrāciju" vai IC_{50}). To var izvērtēt arī, izmantojot relatīvo afinitāti (*RBA*, relatīvā salīdzinājumā ar estradiola IC_{50}, ko atsevišķi mēra tajā pašā izpildes reizē). Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra fiksētas koncentrācijas [^{3}H]17β-estradiola spēju saistīties ar ER plaša testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazona (astoņas intensitātes pakāpes) klātbūtnē. Pēc tam, ja iespējams, datus pārveido Hilla vienādojuma (A. Hills, 1910) formā, kas apraksta radioaktīvi marķētā liganda pārvietošanu, ko izraisa viena domēna konkurējošais saisteklis. Radioaktīvi marķētā estradiola pārvietošanas pakāpe līdzsvara apstākļos tiek izmantota, lai testējamo ķimikāliju raksturotu kā saistīgu, nesaistīgu vai tādu, kam ir neskaidra reakcija.

PROCEDŪRA

Pieņemamas *hr*ERα proteīna veiktspējas pierādīšana

9. Pirms piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās testu ieviešanas laboratorijas ikdienas praksē attiecībā uz katru jaunu *hr*ERα partiju ir jāpierāda to veiktspējas pareizība laboratorijā, kurā to izmantos. Veiktspēju pierāda ar divu etapu procedūru. Proti,

   — veic [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās–piesātinājuma testu, lai pierādītu specifiskumu attiecībā uz *hr*ERα un piesātinājumu. Ar iegūto datu nelineāras regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995) un no tiem izveidotu Skačārda (*Scatchard*) diagrammu dokumentē *hr*ERα spēju saistīt [^{3}H]-17β-estradiolu (*Kd*) un katras partijas receptoru skaitu (*Bmax*);

   — veic konkurējošās saistīšanas testu, izmantojot kontroles vielas (references estrogēnu (17β-estradiolu)), vāju saistekli (piem., noretinodrelu vai noretindronu) un nesaistekli (oktiltrietoksisilānu (OTES)). Katra laboratorija izveido un uztur vēsturisku datubāzi, kurā dokumentē IC_{50} konsekventumu un citas būtiskas references estrogēna un vāja saistekļa vērtības, kas iegūtas dažādos eksperimentos un ar atšķirīgām *hr*ERα partijām. Ar kontroles vielām iegūto konkurējošās saistīšanās līkņu parametriem jābūt 95 % ticamības intervāla robežās (sk. 1. tabulu); tas izstrādāts, izmantojot to laboratoriju datus, kuras piedalījās šā testa validēšanas pētījumā (2).

1. tabula.

References estrogēna un vāja saistekļa veiktspējas kritēriji, kas izstrādāti *FW* hrER saistīšanās testam.

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība [a]	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli [b]	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
17β-estradiols	augstākais (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	zemākais (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hilla virziena koeficients	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrels	augstākais (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	zemākais (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hilla virziena koeficients	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindrons[c] [c]	augstākais (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	zemākais (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hilla virziena koeficients	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$(M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Vidējā vērtība (n) ± standartnovirze (SN) kontroles testu izpildes reizēm, ko validēšanas pētījuma gaitā veica četras laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem) (sk. 2. atsauces N pielikumu).

[b] 95 % ticamības intervāli sniegti kā paraugs pieņemamības kritērijiem.

[c] Validēšanas pētījuma 4. apakšuzdevumā noretindrona testēšana nebija obligāta (sk. 2. atsauci, sk. 4. apakšuzdevumu). Tādējādi vidējā vērtība ± SN (n) kontroles testu veikšanas reizēm, ko īstenoja divas laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem).
IC_{50}*diapazons būs atkarīgs no receptoru preparāta Kd un katrā konkrētajā laboratorijā izmantotās radioaktīvi marķētā liganda koncentrācijas. Ir pieņemama* IC_{50}*diapazona atbilstoša pielāgošana, ņemot vērā to, kādos apstākļos tests ir veikts.*

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

10. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**" 17. un 18. punktu un 2. tabulu. Katrā (piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās) testā īsteno trīs neatkarīgas testa izpildes reizes (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentiem), tās veic dažādās dienās un katrā izpildes reizē izmanto trīs replikātus.

Receptora (*hr*ERα) koncentrācijas noteikšana

11. Aktīvā receptora koncentrācija katrā atsevišķā partijā un atkarībā no uzglabāšanas apstākļiem var būt nedaudz atšķirīga. Tāpēc ir jānosaka no piegādātāja saņemtā aktīvā receptora koncentrācija. Tas ļaus panākt atbilstošu aktīvā receptora koncentrāciju testa veikšanas laikā.

12. Apstākļos, kas atbilst konkurējošās saistīšanās apstākļiem (proti, ar 1 nM [^{3}H]-estradiola), nominālas receptora koncentrācijas — 0,25, 0,5, 0,75 un 1 nM — inkubē bez estradiola (kopējā saistīšanās) un ar 1 μM nemarķēta estradiola (nespecifiskā saistīšanās). Grafiski attēlo sakarību starp specifisko saistīšanos (starpību starp kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos) un receptora nominālo koncentrāciju. Receptora koncentrācija, pie kuras iegūst tādas specifiskās saistīšanās vērtības, kas atbilst 40 % pievienotā radioaktīvā marķējuma, ļauj noteikt atbilstošo nominālo receptora koncentrāciju, kuru attiecīgi izmanto piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās eksperimentiem. Samērā bieži galīgā *hr*ER koncentrācija, kas atbilst šim nosacījumam, ir 0,5 nM.

13. Ja pēc atkārtotiem mēģinājumiem neizdodas sasniegt 20 % kritēriju, eksperimenta uzstādījumus pārbauda attiecībā uz iespējamām kļūdām. Nespēja sasniegt 20 % kritēriju var norādīt, ka rekombinantajā partijā ir ļoti maz aktīvā receptora; šādos gadījumos jāapsver iespēja izmantot citu receptora partiju.

Piesātinājuma tests

14. [^{3}H]17β-estradiola astoņu augoša stipruma koncentrāciju triplikātus vērtē, pie šādiem trim turpmāk uzskaitītajiem nosacījumiem (sk. 2. tabulu):

— testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un ER klātbūtnē. Šādi, mērot radioaktivitāti iedobēs, kurās ir tikai [^{3}H]17β-estradiols, nosaka kopējo saistīšanos;

— testu veic ar nemarķēta 17β-estradiola koncentrāciju, kas tūkstoškārt pārsniedz marķētā 17β-estradiola koncentrāciju, un ER klātbūtnē. Šāda nosacījuma mērķis ir piesātināt aktīvos saistīšanās domēnus ar nemarķētu 17β-estradiolu un, mērot radioaktivitāti iedobēs, noteikt nespecifisko saistīšanos. Visu pārējo karsto estradiolu, kas spēj saistīties ar receptoru, uzskata par nespecifiskā domēnā saistīgu, jo aukstajam estradiolam jābūt tik lielā koncentrācijā, ka tas saistās ar visiem uz receptora pieejamajiem specifiskajiem domēniem;

— testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un bez ER (kopējās radioaktivitātes noteikšana).

[^{3}H]-17β-estradiola un nemarķēta 17β-estradiola šķīdumu sagatavošana

15. Buferšķīdumam pievienojot 12 nM [^{3}H]-17β-estradiola izejšķīduma, sagatavo [^{3}H]-17β-estradiola atšķaidījumus, kuru sākotnējās koncentrācijas ir 0,12nM–12 nM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,03 līdz 3,0 nM iegūst, 40 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (beigu tilpums 160 μl). Testa buferšķīduma, [^{3}H]-17β-estradiola izejšķīduma un atšķaidījumu sagatavošana, kā arī koncentrāciju noteikšana ir sīki izskaidrota *FW* testa protokolā (2).

16. Atšķaidījumus no etanolu saturoša 17β-estradiola šķīduma sagatavo, pievienojot tam testa buferšķīdumu, lai iegūtu astoņas augoša stipruma koncentrācijas, kas sākotnēji ir diapazonā no 0,06 μM līdz 6 μM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,03 μM līdz 3 μM iegūst, 80 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (beigu tilpums 160 μl). Nemarķētā 17β-estradiola galīgajai koncentrācijai atsevišķās nespecifiskās saistīšanās testa iedobēs jābūt tūkstoškārt lielākai par marķētā [^{3}H]-17β- estradiola koncentrāciju. Nemarķēta 17β-estradiola atšķaidījumu sagatavošana ir sīki izskaidrota *FW* testa protokolā (2).

17. Izmanto receptora nominālo koncentrāciju, pie kuras specifiskā saistīšanās ir 20±5 % (sk. 12.-13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

18. 96 iedobju mikrotitrēšanas plates sagatavo saskaņā ar 2. tabulas norādījumiem, katrai koncentrācijai sagatavojot trīs replikātus. 2.2. papildinājumā sniegts piemērs [^{3}H]-17β-estradiola, nemarķēta 17β-estradiola, buferšķīduma un receptora koncentrācijām un tilpumiem testa platē.

2. tabula.

Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Kopējā saistīšanās (šķīdinātājs)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifiskā saistīšanās
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E2:: [^{3}H]-17β-estradiols
ER:: estrogēnreceptors
E2:: nemarķēts 17β-estradiols

19. Testa mikrotitrēšanas plates 16 līdz 20 stundas inkubē 2° līdz 8°C temperatūrā un inkubācijas periodā novieto rotatora.

Ar hrERα saistītā [^{3}H]-17β-estradiola mērīšana

20. [^{3}H]-17β-estradiolu, kas piesaistījies *hr*ERα, no brīvā [^{3}H]-17β-estradiola atdala, katrā iedobē pievienojot 80 μl aukstas DCC suspensijas, tad 10 minūtes kratot mikrotitrēšanas plates un 10 minūtes centrifugējot ar aptuveni 2 500 apgr./min. Lai procedūras gaitā nepieļautu [^{3}H]-17β-estradiola atdalīšanos no *hr*ERα, kam tas piesaistījies, ir ļoti svarīgi buferšķīdumus un testa iedobes turēt 2 līdz 8°C temperatūrā un katru testa soli veikt ātri. Lai plates varētu apstrādāt ātri un efektīvi, ir vajadzīgs mikrotitrēšanas plašu kratītājs.

21. Ņem 50 μl supernatanta, kas satur ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, un novieto uz otras mikrotitrēšanas plates; to dara ar īpašu piesardzību, lai nepieļautu iedobju kontaminmāciju, saskaroties DCC.

22. Pēc tam katrai iedobei (A1–B12 un D1–E12) pievieno 200 μl scintilācijas šķidruma, kas kodolemisiju kinētisko enerģiju spēj pārveidot gaismas enerģijā. Katrā no G1–H12 (kopējam *dpm* atbilstošajām) iedobēm iepilina 40 μl [^{3}H]-17β-estradiola sērijveida atšķaidījuma; tam jānokļūst tieši scintilācijas šķīdumā mērījumu plates iedobēs atbilstoši 3. tabulas norādījumiem, proti, šajās iedobēs jābūt tikai 200 μl scintilācijas šķidruma un atbilstošam [^{3}H]-17β-estradiola atšķaidījumam. Ar šiem mērījumiem pierāda, cik daudz [^{3}H]-17β-estradiola (izteikta *dpm*) pievienots katrā iedobju kopumā, kas demonstrē kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos.

3. tabula.

Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, radioaktivitātes mērījums

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Kopējā saistīšanās (šķīdinātājs)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E22			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifiskā saistīšanās
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2 (kopējais *dpm*)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			(kopējais *dpm* (-*))
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[^{3}H] E2:: [^{3}H]-17β-estradiols
ER:: estrogēnreceptors
E_2:: nemarķēts 17β-estradiols
dpm:: sabrukumu skaits minūtē
(*) Šeit karstie marķētā [^{3}H]-estradiola sērijveida atšķaidījumi tieši jāpievieno 200 μl scintilācijas šķīduma G1–H12 iedobēs.

23. Mērījumu sāk ne mazāk kāpēc divu stundu ilgas nogaidīšanas, un skaitīšanas laiks katrai iedobei ir 40 minūtes. Nosakot *dpm* uz iedobi un piemērojot slāpēšanas korekciju, izmanto mikrotitrēšanas plates scintilāciju skaitītāju. Ja mikrotitrēšanas plates scintilāciju skaitītājs nav pieejams, paraugu skaitīšanai var izmantot parasto skaitītāju. Šādā gadījumā var apsvērt skaitīšanas laika samazināšanu.

Konkurējošās saistīšanās tests

24. Konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^{3}H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Katrā testa veikšanas reizē izmanto trīs paralēlus katras koncentrācijas replikātus. Papildus tam attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu izpilda trīs reizes, un tas nenotiek paralēli, bet dažādos laikos. Testu veic vienā vai vairākās 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs.

Kontroles

25. Veicot testu, katrā eksperimentā jāiekļauj paralēlais šķīdinātājs un kontroles (t. i., references estrogēns, vājš saisteklis un nesaisteklis). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs ir jābūt: i) katra E2 un vāja saistekļa triplikātiem augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontroles un nespecifiskās saistīšanās triplikātiem. Testa buferšķīduma, kontroļu, [^{3}H]-17β-estradiola, *hr*ERα un testējamo ķimikāliju šķīdumu sagatavošanas procedūras ir aprakstītas 2. atsaucē (sk. *FW* testa protokolu K pielikumā).

Šķīdinātāja kontrole

26. Šķīdinātāja kontrole rāda, vai nenotiek šķīdinātāja mijiedarbība ar testa sistēmu, kā arī mēra kopējo saistīšanos (apzīmē ar "TB" — *total binding*). Ieteicamais šķīdinātājs ir etanols. Ja testējamās ķimikālijas visaugstākā koncentrācija etanolā nešķīst, kā alternatīvu var izmantot dimetilsulfoksīdu ("DMSO"). Galīgajā testā etanola vai attiecīgā gadījumā DMSO koncentrācijai iedobēs jābūt 1,5 % un ne vairāk kā 2 %.

Buferšķīduma kontrole

27. Buferšķīduma kontrole ("BC") nedrīkst saturēt ne šķīdinātāju, ne testējamo ķimikāliju, bet tā satur visus citus testa komponentus. Buferšķīduma kontroles rezultātus salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu.

Stiprs saisteklis (references estrogēns)

28. 17β-estradiols (*CAS* 50-28-2) ir endogēnisks ligands ar augstu afinitāti (alfa apakštipa) ER. Katram *hr*ERα konkurējošās saistīšanās testam sagatavo standarta līkni ar nemarķētu 17β-estradiolu, lai varētu novērtēt, kāda ir mainība laika gaitā, veicot testu tajā pašā laboratorijā. Sagatavo astoņus nemarķēta 17β-estradiola šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu no 100 nM–10 pM (-7[logM] līdz -11[logM]), ar šādiem intervāliem: (-7[logM], -8[logM], -8.5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Nemarķēta 17β-estradiola (1 μM) augstākā koncentrācija kalpo arī kā nespecifiskās saistīšanās (*NSB*) indikators. 4. tabulā šo koncentrāciju apzīmē ar kodu "NSB", lai gan tā ir arī standarta līknes daļa.

Vājš saisteklis

29. Lai demonstrētu katra eksperimenta jutīgumu un ļautu novērtēt, kāda ir rezultātu mainība, veicot testu laika gaitā, tajā iekļauj vāju saistekli (noretinodrelu (*CAS* 68-23-5) vai noretindronu (*CAS* 68-22-4). Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu 3 nM–30 pM (no -8,5[logM] līdz -4,5[logM]), ar šādiem intervāliem: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Nesaisteklis

30. Kā negatīvo kontroli (nesaistekli) izmanto oktiltrietoksisilānu (OTES, *CAS*2943-75-1). Tas apstiprinās, ka tests spēs noteikt ķimikālijas, kas nesaistās ar *hr*ERα. Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu 0,1 nM–1 000 μM (no -10[logM] līdz -3[logM]), ar logaritmisku palielinājumu. Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot di-*n*-butilftalātu (DBP). Ir pierādīts, ka tā maksimālā šķīdība testā ir -4[logM].

HrERα koncentrācija

31. Izmanto receptora daudzumu, pie kura specifiskā saistīšanās ir 20±5 % no 1 nM radioaktīvi marķētā liganda (sk. 2. papildinājuma 12.-13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

[^{3}H]-17β-estradiols

32. [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācija testa iedobēs ir 1,0 nM.

Testējamās ķimikālijas

33. Vispirms ir jāveic šķīdības tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testa protokolā. Sākotnēji katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes (sk. arī 35. punktu). Testējamo ķimikāliju testē, izmantojot līkni ar astoņām log koncentrācijām un diapazona noteikšanas testā identificētajiem intervāliem. Trešā un ceturtā eksperimenta koncentrācijas būtu jāpielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

34. Testējamās ķimikālijas atšķaidījumus sagatavo atbilstošā šķīdinātājā (sk. 2. papildinājuma 26. punktu). Ja testējamās ķimikālijas augstākā koncentrācija nešķīst ne etanolā, ne DMSO un lielāka šķīdinātāja daudzuma pievienošana galīgajā testa stobriņā novestu pie pieņemamās robežas pārsniegšanas, augstāko koncentrāciju var samazināt par vienu intervālu uz leju. Šādā gadījumā sērijveida koncentrācijas var papildināt ar vienu papildkoncentrāciju diapazona apakšā. Visas pārējas sērijveida koncentrācijas paliek nemainīgas.

35. Pievienojot testējamās ķimikālijas šķīdumus testa iedobēs, tos rūpīgi vēro, jo pievienošanas laikā var rasties nogulsnes. Datus par tām iedobēm, kurās konstatē nogulsnes, neņem vērā, pielāgojot datus līknei, un testa pārskatā norāda izslēgšanas iemeslu.

36. Ja no citiem avotiem jau ir pieejama informācija par testējamās ķimikālijas log (IC_{50}), atšķaidījumus var būt lietderīgi ģeometriski izkārtot (t. i., pa 0,5 log vienībām ap paredzamo log (IC_{50}). Galīgajam rezultātam būtu jāatspoguļo pietiekama koncentrāciju izkliede abās log (IC_{50}) pusēs, arī līknes augšējā un apakšējā punktā, un koncentrācijām jābūt pietiekami raksturojošām attiecībā uz saistīšanās līkni.

Testa plates izkārtojums

37. Sagatavo marķētas mikrotitrēšanas plates, kurās ir pa sešiem šādiem kodētiem inkubētiem replikātiem: šķīdinātāja kontrole un references estrogēns visaugstākajā koncentrācijā, kas kalpo arī par nespecifiskās saistīšanās (NSB) rādītāju; un pa trim šādiem kodētiem inkubētiem replikātiem: astoņas nesaistīgās kontroles (oktiltrietoksisilāna) koncentrācijas, septiņas references estrogēna zemākās koncentrācijas, astoņas vāja saistekļa devas līmeņa koncentrācijas un astoņas koncentrācijas no katras testējamās ķimikālijas (TC). Mikrotitrēšanas plates izkārtojuma diagrammas paraugs pilnām references estrogēna un kontroļu koncentrāciju līknēm ir sniegts 4. tabulā. Atsevišķas mikrotitrēšanas plates izmanto testējamām ķimikālijām, un tajās jāiekļauj testa plates kontroles, t. i., 1) E2 un vāja saistekļa triplikāti augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); 2) šķīdinātāja kontrole un nespecifiskā saistīšanās, no katra pa sešiem replikātiem (5. tabula). Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojuma darblapas paraugs ar trijām nezināmām testējamajām ķimikālijām ir dots 2.3. papildinājumā. 4. un 5. tabulā norādītās koncentrācijas ir galīgās testa koncentrācijas. Maksimālā E2 koncentrācija ir 1×10^{-7} M, un attiecībā uz vāju saistekli jāizmanto augstākā koncentrācija, kas 1. mikrotirēšanas platē izmantota vājam saisteklim. IC_{50} koncentrāciju nosaka laboratorija, balstoties uz savu vēsturisko kontroles datubāzi. Tiek sagaidīts, ka šī vērtība būs līdzīga validācijas pētījumos konstatētajai vērtībai (sk. 1. tabulu).

4. tabula.

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, pilnas atsauces estrogēnu un kontroļu koncentrāciju līknes (1. plate).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tikai šķīdinātājs)			TB (tikai šķīdinātājs)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10-7)			E2 (1×10-8)			E2 (1×10-8,5)			E2 (1×10-9)		
C	E2 (1×10-9,5)			E2 (1×10-10)			E2 (1×10-11)			Tukša iedobe (*)		
D	NE (1×10-4,5)			NE (1×10-5)			NE (1×10-5,5)			NE (1×10-6)		
E	NE (1×10-6,5)			NE (1×10-7)			NE (1×10-7,5)			NE (1×10-8,5)		
F	OTES (1×10-3)			OTES (1×10-4)			OTES (1×10-5)			OTES (1×10-6)		
G	OTES (1×10-7)			OTES (1×10-8)			OTES (1×10-9)			OTES (1×10-10)		
H	tukša iedobe (karsta) (**)			tukša iedobe (karsta) (**)			Buferšķīduma kontrole			Buferšķīduma kontrole		

Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").
(*) Reāli tukša iedobe, netiek izmantota.
(**) Tukša iedobe, netiek izmantota inkubācijas laikā, bet to izmanto, lai apstiprinātu kopējo pievienoto radioaktivitāti.

5. tabula.

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, pilnas testējamo ķimikāliju un plates kontroļu koncentrāciju līknes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tikai šķīdinātājs)			TB (tikai šķīdinātājs)			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 (1×10-4,5)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10-7)		

Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

Konkurējošās saistīšanās testa izpilde

38. Kā parādīts 6. tabulā, katrā testēšanas iedobē pievieno 80 µl šķīdinātāja kontroles, testa buferšķīduma kontroles, references estrogēna, vāja saistekļa, nesaistekļa un testa buferšķīdumā sagatavotas testējamās ķimikālijas. Pēc tam katrā iedobē pievieno 40 µl 4 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma. 10 līdz 15 minūtes viegli rotē 2–8°C temperatūrā, pēc tam pievieno 40 µl *hr*ERα šķīduma. Testa mikrotitrēšanas plates 16 līdz 20 stundas inkubē 2° līdz 8°C temperatūrā un inkubācijas periodā novieto rotatora.

6. tabula.

***Hr*ER konkurējošās saistīšanās testa komponentu tilpums mikrotitrēšanas platēs**

Tilpums (µl)	Komponents
80	Nemarķēts 17β-estradiols, noretinodrels, OTES, testējamās ķimikālijas, šķīdinātājs vai buferšķīdums
40	4 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma
40	*hr*ERα šķīdums ar noteiktu koncentrāciju
160	***Kopējais tilpums katrā testa plates iedobē***

39. Pēc tam (saskaņā ar piesātinājuma–saistīšanās testa apraksta 20.–23. punktu) kvantificē ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, taču pirms tam, katrā iedobē pievienojot 80 µl aukstas DCC suspensijas, no brīvā [^{3}H]-17β-estradiola atdala ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu/

40. Iedobes H1–6 (sk. aili "Tukša iedobe (karsta)" 4. tabulā) raksturo marķēta [^{3}H]-estradiola *dpm* 40 µl. 40 µl alikvotu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā iedobēs H1–H6.

Pieņemamības kritēriji

Piesātinājuma–saistīšanās tests

41. Ja tiek izmantotas pieaugošas [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas, specifiskās saistīšanās līknei ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar ligandu.

42. Pieņemamības diapazons attiecībā uz specifisko saistīšanos pie 1 nM [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas ir 15–25 % no kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējās vērtības, kas mērīta visās izpildes reizēs. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija un piesātinājuma tests jāatkārto.

43. Datiem jābūt attēlojamiem lineāras Skačārda diagrammas veidā.

44. Nespecifiskā saistīšanās nedrīkst būt pārmērīga. Nespecifiskās saistīšanās vērtība parasti ir <35 % no kopējās saistīšanās. Tomēr minētā procentuālā attiecība dažkārt šo limitu var pārsniegt, ja testā tiek mērīts ļoti zems *dpm* pie zemākās radioaktīvi marķētā 17β-estradiola koncentrācijas.

Konkurējošās saistīšanās tests

45. Pie pieaugošām nemarķēta 17β-estradiola koncentrācijām [^{3}H]-17β-estradiolu pakāpeniski pārvieto no receptora tādā veidā, kas līdzinās viena domēna konkurējošajai saistīšanai.

46. References estrogēna (t. i., 17β-estradiola) IC_{50} vērtībai jābūt aptuveni vienādai ar [^{3}H]-17β-estradiola molāro koncentrāciju, kam pieskaitīta piesātinājuma–saistīšanās testā noteiktā diasociācijas konstante (*Kd*).

47. Visās testa izpildes reizēs kopējās specifiskās saistīšanās vērtībai pastāvīgi jābūt pieņemamības diapazonā (20 ± 5 %), pie nosacījuma, ka kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējā mērītā koncentrācija katrā iedobē ir 1 nM. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija.

48. Šķīdinātājs nedrīkst mainīt testa jutīgumu vai reproducējamību. Šķīdinātāja kontroles rezultātus (TB iedobes) salīdzina ar buferšķīduma kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu. Ja šķīdinātājs neietekmē testa gaitu, TB un buferšķīduma kontrolēm jābūt salīdzināmām.

49. Testējot ar koncentrācijām, kas nepārsniedz 10^{-3} M (OTES) vai 10^{-4} M (DBP), nesaisteklim nevajadzētu no *hr*ERα pārvietot vairāk nekā 25 % [^{3}H]-17β-estradiola.

50. Izmantojot *FW hr*ER saistīšanās testa validēšanas pētījuma datus (2. atsauces N pielikums), tika izstrādāti references estrogēna un divu vāju saistekļu (piem., noretinodrels, noretindrons) veiktspējas kritēriji. Ir sniegti 95 % ticamības intervāli vidējām vērtībām (n) +/- SN; tās tika iegūtas no visiem kontroles testiem, ko izpildīja laboratorijas, kuras piedalījās validēšanas pētījumā. 95 % ticamības intervālus aprēķināja references estrogēna un vāju saistekļu līknes pielāgošanas parametriem (t. i., augšējam un apakšējam punktam, Hilla virziena koeficientam un log IC_{50}) un vāju saistekļu $\log_{10}RBA$ attiecībā pret references estrogēnu; tos izmanto par pozitīvās kontroles veiktspējas kritērijiem. 1. tabulā sniegti līknes pielāgošanas parametru paredzamie diapazoni, kurus var izmantot kā veiktspējas kritērijus. Praksē IC_{50} diapazons var būt nedaudz atšķirīgs atkarībā no receptora preparāta *Kd* un liganda koncentrācijas.

51. Testējamo ķimikāliju līknes pielāgošanas parametriem veiktspējas kritēriji izstrādāti netika, jo pastāv pārāk plašs esošu potenciāli testējamu ķimikāliju spektrs un potenciālās afinitātes un rezultātu mainīgums (piem., pilna līkne, daļēja līkne, neatbilstība līknei). Tomēr katrā testēšanas reizē un ar katru testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus būtu jāizvērtē speciālistam. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu (t. i., 90–100 % saistīšanās). Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām izpildes reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Izpildot kontroles testus attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju, mērījumiem būtu jātuvojas veiktspējas parametriem, kas paziņoti attiecībā uz šo *FW* testu, un tiem jābūt saskanīgiem ar attiecīgās laboratorijas vēsturiskajiem kontroldatiem.

DATU ANALĪZE

Piesātinājuma–saistīšanās tests

52. Tiek mērīta gan kopējā, gan nespecifiskā saistīšanās. No šim vērtībām, nespecifisko saistīšanos atņemot no kopējās saistīšanās, tiek aprēķināta pieaugošu [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju specifiskā saistīšanās līdzsvara apstākļos. Grafikā, kurā specifisko saistīšanos attēlo attiecībā pret [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju, attiecībā uz maksimālo specifisko saistīšanos ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar [^{3}H]-17β-estradiolu. Turklāt datu analīzē būtu jākonstatē [^{3}H]-17β- estradiola saistīšanās ar vienu augstas afinitātes saistīšanās domēnu. Piesātinājuma–saistīšanās līknē attēlo nespecifisko, kopējo un specifisko saistīšanos. Šo datu turpmākai analīzei izmanto nelineārās regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995), un galīgos datus attēlo ar Skačārda diagrammu.

53. Analizējot datus, *Bmax* un *Kd* nosaka no kopējās saistīšanās datiem vien, izmantojot pieņēmumu, ka nespecifiskā saistīšanās ir lineāra, ja vien nav pamatota iemesla izmantot citu metodi. Turklāt, meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. Nosakot *Bmax* un *Kd* no piesātinājuma–saistīšanās datiem, vienmēr jāizmanto liganda noplicināšanās korekcija (piem., *Swillens* (1995) metode).

Konkurējošās saistīšanās tests

54. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

55. Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) parasti neierobežo. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Liganda noplicināšanās korekciju neizmanto. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) aprēķina kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistekļu kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, sekojot testa veikšanas norādēm 2. papildinājuma 45.–50. punktā.

56. Datus par visam testējamajām ķimikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa veikšanas reizes testējamās ķimikālijas datus sākotnēji analizē standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles (sk. 55. punktu iepriekš tekstā). Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi.

Datu interpretācija

57. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par saistīgu ar *hr*ERα, ja saistīšanās līkne ir pielāgojama un zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 % (1. attēls).

58. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par nesaistīgu ar *hr*ERα, ja:

— saistīšanās līkne ir pielāgojama un pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir lielāks par 75 % vai

— saistīšanās līkni pielāgot nevar un visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.

59. Testējamās ķimikālijas klasifikāciju uzskata par neskaidru, ja nav izpildīts neviens no iepriekšminētajiem nosacījumiem (t. i., zemākais pielāgotās atbildreakcijas līknes punkts ir robežās no 76 – 51 %).

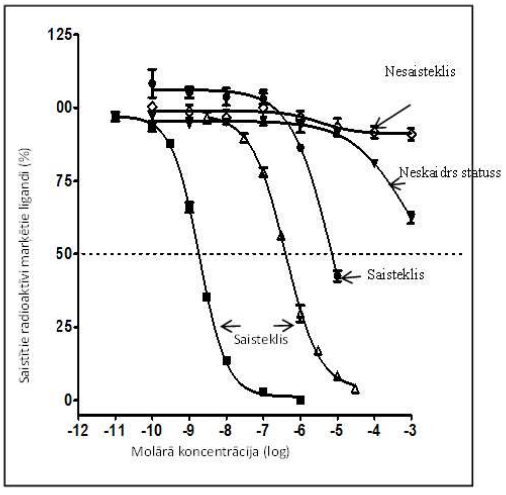
7. tabula.

Kritēriji, pēc kuriem klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.

Klasifikācija	Kritēriji
Saisteklis[a]	Saistīšanās līkni var pielāgot. **Zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 %.**
Nesaisteklis[b]	Ja saistīšanās līkni var pielāgot, **pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir virs 75 %.** Ja saistīšanās līkni nevar pielāgot, **visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.**
Neskaidra[c]	Jebkura testa izpildes reize, kas neuzrāda testējamās ķimikālijas saistīgumu vai nesaistīgumu (piem., pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts ir robežās no 76–51 %).

1. attēls.

Piemēri, kā klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.



60. Laboratorijā attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu veic vairākas izpildes reizes, un katrai izpildes reizei atkarībā no rezultāta piešķir ciparisku vērtību, no kuras pēc tam aprēķina vidējo vērtību atbilstoši 8. tabulā sniegtajam paraugam. Vidējos rezultātus, kas apkopoti konkrētajā laboratorijā, salīdzina ar gaidīto katras testējamās ķimikālijas klasifikāciju.

8. tabula.

Metode, pēc kuras klasificē testējamo ķimikāliju, izmantojot vairākas testēšanas reizes vienā laboratorijā.

Katrai izpildes reizei piešķir ciparisku vērtību:	
Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	2
Neskaidrs	1
Nesaisteklis	0
Izpildes reizēs iegūto ciparisko vērtību vidējās vērtības klasificēšana:	
Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	Vidēji ≥ 1,5
Neskaidrs	0,5 ≤ Vidējā vērtība < 1,5
Nesaisteklis	Vidēji < 0,5

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**" 24. punktu.

2.1. papildinājums

TERMINU SARAKSTS

[^{3}H]E2: 17β-estradiols, radioaktīvi marķēts ar tritiju.

DCC: ar dekstrānu pārklāta ogle.

E2: nemarķēts 17β-estradiols (inerts).

Testa buferšķīdums:: 10 mM tris, 10 mg liellopu seruma albumīna/ml, 2 mM DTT, 10 % glicerīna, 0,2 mM leupeptīna (pH 7,5).

hrERα: cilvēka rekombinantais estrogēnreceptors alfa.

Replikāts: viena no vairākām vienāda satura un vienādas koncentrācijas iedobēm, kuras paralēli testē vienā testēšanas reizē. Pēc šī protokola katru testējamās ķimikālijas koncentrāciju testē ar trim replikātiem (triplikātiem); proti, pie katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir trīs replikāti, kurus testē vienlaicīgi.

Izpildes reize: viss paralēli testēto miktotitrēšanas plates testa iedobju kopums, kas nodrošina visu informāciju, kura vajadzīga, lai raksturotu testējamās ķimikālijas saistīšanos ar *hr*ERα, (t. i., kopējais testa iedobei pievienotais [^{3}H]-17β-estradiols, maksimālā [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās ar *hr*ERα, nespecifiskā saistīšanās un kopējā saistīšanās pie dažādām testējamās ķimikālijas koncentrācijām). Izpildes reize var nozīmēt pat tikai vienas testēšanas iedobes (t. i., replikāta) testēšanu pie katras koncentrācijas, tomēr šajā konkrētajā gadījumā protokols pieprasa testēt ar triplikātiem, un viena izpildes reize nozīmē trīs testēšanas iedobes pie katras koncentrācijas. Papildus minētajam šis protokols prasa ar katru ķimikāliju veikt trīs neatkarīgas (proti, neveicot paralēli) izpildes reizes.

2.2. papildinājums

TIPISKS [^{3}H]-17B-ESTRADIOLA PIESĀTINĀJUMA TESTS AR TRIJĀM REPLIKĀTA IEDOBĒM

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm											
Pozīcija	**Replikāts**	**Iedobes tipa kods**	**Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)**	**Karsta E2 tilpums (µl)**	**Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)**	**Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)**	**Auksta E2 tilpums (µl)**	**Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)**	**Buferšķīduma tilpums (µl)**	**Receptora tilpums (µl)**	**Kopējais tilpums iedobēs**
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

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm											
Pozīcija	**Replikāts**	**Iedobes tipa kods**	**Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)**	**Karsta E2 tilpums (µl)**	**Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)**	**Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)**	**Auksta E2 tilpums (µl)**	**Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)**	**Buferšķīduma tilpums (µl)**	**Receptora tilpums (µl)**	**Kopējais tilpums iedobēs**
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

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm											
Pozīcija	**Replikāts**	**Iedobes tipa kods**	**Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)**	**Karsta E2 tilpums (µl)**	**Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)**	**Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)**	**Auksta E2 tilpums (µl)**	**Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)**	**Buferšķīduma tilpums (µl)**	**Receptora tilpums (µl)**	**Kopējais tilpums iedobēs**
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	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm

Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (µl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)	Auksta E2 tilpums (µl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Receptora tilpums (µl)	Kopējais tilpums iedobēs
H5	2	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Piezīme: "karstās" iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 40 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

2.3. papildinājums

KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA IEDOBJU IZKĀRTOJUMS

Plate	**Pozīcija**	**Replikāts**	**Iedobes tips**	**Iedobes kods**	**Koncentrācijas kods**	**Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)**	**hrER izejšķīdums (µl)**	**Buferšķīduma tilpums (µl)**	**Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)**	**Tilpums atšķaidījuma platē (µL)**	**Beigu tilpums (µl)**	**Konkurenta beigu koncentrācija (M)**
S	A1	1	kopējā saistīšanās	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	B10	1	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tukša	tukša	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	tukša	tukša	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	tukša	tukša	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	D7	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	E11	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrels	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

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (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	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Piezīme: "karstās" iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 40 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER* izejšķīdums (µL)	Buferšķīduma tilpums (µL)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	A1	1	kopējā saistīšanās	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*h*ER izejšķīdums (µL)	Buferšķīduma tilpums (µL)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	C1	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hER* izejšķīdums (µL)	Buferšķīduma tilpums (µL)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	E1	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*h*ER izejšķīdums (µL)	Buferšķīduma tilpums (µL)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	G1	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrels	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrels	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrels	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	auksts E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	auksts E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	auksts E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

3. papildinājums

ĶĪMISKĀS IZVĒRTĒŠANAS UN PĒTNIECĪBAS INSTITŪTA (*CERI*) ESTROGĒNRECEPTORU SAISTĪŠANĀS *IN VITRO* TESTS, KURĀ IZMANTO CILVĒKA REKOMBINANTO ERα LIGANDA SAISTĪŠANĀS DOMĒNA PROTEĪNU

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šis estrogēnreceptora (ERα) piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās *in vitro* tests izmanto cilvēka ERα liganda saistīšanās domēnu (*LBD*). Šo proteīnu modeli izstrādājis Ķīmiskās izvērtēšanas un pētniecības institūts (*CERI*) Japānā, un tas eksistē kā glutationa-S-transferāzes (GST) jauktais proteīns, kuru ekspresē *E. coli*. *CERI* protokolam veikts starptautisks daudzlaboratoriju validēšanas pētījums (2), kas pierādīja testa relevanci un ticamību paredzētajam nolūkam.

2. Šis tests ir skrīninga procedūra, ar ko identificē vielas, kas spēj saistīties ar *hr*ERα. To izmanto, lai noteiktu testējamās ķimikālijas spēju konkurēt ar 17β-estradiolu attiecībā uz saistīšanos ar *hr*ERα-*LBD*. Kvantitatīvie testa rezultāti var ietvert IC_{50} (mērs, kas rāda testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas vajadzīga, lai no *hr*ERα pārvietotu pusi no [^{3}H]-17β-estradiola) un testējamo ķimikāliju relatīvo afinitāti attiecībā uz *hr*ERα salīdzinājumā ar 17β-estradiolu. Ķīmiskā skrīninga vajadzībām pieņemami kvalitatīvie testa rezultāti var ietvert testējamo ķimikāliju klasificēšanu saistīgās vai nesaistīgās ar *hr*ERα vai tādās, kuru saistīgums ir neskaidrs, uz to kritēriju pamata, kas aprakstīti attiecībā uz saistīšanās līknēm.

3. Testā izmanto radioaktīvi marķētu ligandu, tāpēc laboratorijai būs vajadzīga radioaktīvo materiālu licence. Visas procedūras ar radioaktīvajiem izotopiem un bīstamām ķimikālijām jāveic, ievērojot nacionālajos tiesību aktos paredzētos noteikumus un procedūras.

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem jāizlasa sadaļas "**VISPĀRĪGAIS IEVADS**" un "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**". Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. *HrERα* saistīšanās tests mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^{3}H]17β-estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t.i. konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti.

6. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

7. Piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta mērķis ir raksturot konkrētas receptoru partijas afinitāti un konkurējošās saistīšanās eksperimentā — to skaitu preparātā. Piesātinājuma–saistīšanās eksperiments līdzsvara apstākļos mēra fiksētas estrogēnreceptora koncentrācijas afinitāti tā dabīgajam ligandam (to izsaka disociācijas konstante, *Kd*) un aktīvo receptoru domēnu koncentrāciju (*Bmax*).

8. Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra tādas vielas afinitāti, kura attiecībā uz saistīšanos ar ER konkurē ar [^{3}H]17β-estradiolu. Afinitāti kvantitatīvi izsaka kā testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas līdzsvara apstākļos inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās (apzīmē kā "50 % inhibējošo koncentrāciju" vai IC_{50}). To var izvērtēt arī, izmantojot relatīvo afinitāti (*RBA*, relatīvā salīdzinājumā ar estradiola IC_{50}, ko atsevišķi mēra tajā pašā izpildes reizē). Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra fiksētas koncentrācijas [^{3}H]17β-estradiola spēju saistīties ar ER plaša testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazona (astoņas intensitātes pakāpes) klātbūtnē. Pēc tam, ja iespējams, datus pārveido Hilla vienādojuma (A. Hills, 1910) formā, kas apraksta radioaktīvi marķētā liganda pārvietošanu, ko izraisa viena domēna konkurējošais saisteklis. Radioaktīvi marķētā estradiola pārvietošanas pakāpe līdzsvara apstākļos tiek izmantota, lai testējamo ķimikāliju raksturotu kā saistīgu, nesaistīgu vai tādu, kam ir neskaidra reakcija.

PROCEDŪRA

Pieņemamas *hr*ERα proteīna veiktspējas pierādīšana

9. Pirms piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās testu ieviešanas laboratorijas ikdienas praksē attiecībā uz katru jaunu *hr*ERα partiju ir jāpierāda to veiktspējas pareizība laboratorijā, kurā to izmantos. Veiktspēju pierāda ar divu etapu procedūru. Proti,
   — veic [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās piesātinājuma testu, lai pierādītu *hr*ERα specifiskumu un piesātinājumu. Ar iegūto datu nelineāras regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995) un no tiem izveidotu Skačārda diagrammu dokumentē *hr*ERα spēju saistīt [^{3}H]-17β-estradiolu (*Kd*) un katras partijas receptoru skaitu (*Bmax*);
   — veic konkurējošās saistīšanas testu, izmantojot kontroles vielas (references estrogēnu (17β-estradiolu), vāji saistīgu vielu (piem., noretinodrelu vai noretindronu) un nesaistīgu vielu (oktiltrietoksisilānu, apzīmē ar "OTES"). Katra laboratorija izveido un uztur vēsturisku datubāzi, kurā dokumentē IC_{50} konsekventumu un citas būtiskas references estrogēna un vāja saistekļa vērtības, kas iegūtas dažādos eksperimentos un ar atšķirīgām *hr*ERα partijām. Turklāt ar kontroles vielām iegūto konkurējošās saistīšanās līkņu parametriem jābūt 95 % ticamības intervāla robežās (sk. 1. tabulu); tas izstrādāts, izmantojot to laboratoriju datus, kuras piedalījās šā testa validēšanas pētījumā (2).

1. tabula

References estrogēna un vāja saistekļa veiktspējas kritēriji, kas izstrādāti *CERI hr*ER saistīšanās testam.

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība [a]	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli [b]	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
17β-estradiols	Augšējais	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Apakšējais	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hilla virziena koeficients	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretinodrels	Augšējais	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Apakšējais	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hilla virziena koeficients	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindrons [c]	Augšējais	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Apakšējais	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hilla virziena koeficients	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Vidējā vērtība ± standartnovirze (SN) (n) lieluma paraugam kontroles testu izpildes reizēm, ko validēšanas pētījuma gaitā veica četras laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem) (sk. 2. atsauces N pielikumu).

[b] 95 % ticamības intervāli sniegti kā paraugs pieņemamības kritērijiem.

[c] Validēšanas pētījuma 4. apakšuzdevumā noretindrona testēšana nebija obligāta (sk. 2. atsauci, sk. 4. apakšuzdevumu). Tādējādi vidējā vērtība ± SN (n) kontroles testu izpildes reizēm, ko īstenoja divas laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem).
IC_{50} diapazons būs atkarīgs no receptoru preparāta *Kd* un katrā konkrētajā laboratorijā izmantotās radioaktīvi marķētā liganda koncentrācijas. Ir pieņemama IC_{50} diapazona atbilstoša pielāgošana, ņemot vērā to, kādos apstākļos tests ir veikts.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

10. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**" 17. un 18. punktu un 2. tabulu. Katrā (piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās) testā īsteno trīs neatkarīgas testa izpildes reizes (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentiem), tās veic dažādās dienās un katrā izpildes reizē izmanto trīs replikātus.

Receptora (*hr*ERα) koncentrācijas noteikšana

11. Aktīvā receptora koncentrācija katrā atsevišķā partijā un atkarībā no uzglabāšanas apstākļiem var būt nedaudz atšķirīga. Tāpēc ir jānosaka no piegādātāja saņemtā aktīvā receptora koncentrācija. Tas ļaus panākt atbilstošu aktīvā receptora koncentrāciju testa veikšanas laikā.

12. Apstākļos, kas atbilst konkurējošās saistīšanās apstākļiem (proti, ar 0,5 nM [^{3}H]-estradiola), nominālas receptora koncentrācijas — 0,1, 0,2, 0,4 un 0,6 nM — inkubē bez estradiola (kopējā saistīšanās) un ar 1 μM nemarķēta estradiola (nespecifiskā saistīšanās). Grafiski attēlo sakarību starp specifisko saistīšanos (starpību starp kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos) un receptora nominālo koncentrāciju. Receptora koncentrācija, pie kuras iegūst tādas specifiskās saistīšanās vērtības, kas atbilst 40 % pievienotā radioaktīvā marķējuma, ļauj noteikt atbilstošo receptora koncentrāciju, kuru attiecīgi izmanto piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās eksperimentiem. Samērā bieži galīgā *hr*ER koncentrācija, kas atbilst šim nosacījumam, ir 0,2 nM.

13. Ja pēc atkārtotiem mēģinājumiem neizdodas sasniegt 40 % kritēriju, eksperimenta uzstādījumus pārbauda attiecībā uz iespējamām kļūdām. Nespēja sasniegt 40 % kritēriju var norādīt, ka rekombinantajā partijā ir ļoti maz aktīvā receptora; šādos gadījumos jāapsver iespēja izmantot citu receptora partiju.

Piesātinājuma tests

14. [^{3}H]17β-estradiola astoņu augoša stipruma koncentrāciju triplikātus vērtē, pie šādiem trim turpmāk uzskaitītajiem nosacījumiem (sk. 2. tabulu):

    a. testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un ER klātbūtnē. Šādi, mērot radioaktivitāti iedobēs, kurās ir tikai [^{3}H]17β-estradiols, nosaka kopējo saistīšanos;

    b. testu veic ar nemarķēta 17β-estradiola koncentrāciju, kas 2000 reižu pārsniedz marķētā 17β-estradiola koncentrāciju, un ER klātbūtnē. Šāda nosacījuma mērķis ir piesātināt aktīvos saistīšanās domēnus ar nemarķētu 17β-estradiolu un, mērot radioaktivitāti iedobēs, noteikt nespecifisko saistīšanos. Visu pārējo karsto estradiolu, kas spēj saistīties ar receptoru, uzskata par nespecifiskā domēnā saistīgu, jo aukstajam estradiolam jābūt tik lielā koncentrācijā, ka tas saistās ar visiem uz receptora pieejamajiem specifiskajiem domēniem;

    c. testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un bez ER (kopējās radioaktivitātes noteikšana).

[^{3}H]-17β-estradiola un nemarķēta 17β-estradiola šķīdumu un hrERα sagatavošana

15. Lai sagatavotu 40 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma, ņem 1 μM izejšķīduma — [^{3}H]-17β-estradiola šķīdums dimetilsulfoksīdā (DMSO) —, kam pievieno DMSO (iegūstot 200 nM) un pēc tam testa buferšķīdumu istabas temperatūrā (iegūstot 40 nM). No šiem 40 nM šķīduma, izmantojot testa buferšķīdumu istabas temperatūrā, sagatavo virkni [^{3}H]-17β-estradiola atšķaidījumu koncentrācijās no 0,313 nM līdz 40 nM (sk. paraugu 2. tabulas 12. ailē). Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,0313 līdz 4,0 nM iegūst, 10 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (sk. 2. un 3. tabulu). Testa buferšķīduma sagatavošana un [^{3}H]-17β-estradiola oriģinālā izejšķīduma aprēķināšanas metode, balstoties uz specifisko aktivitāti, kā arī atšķaidījumu sagatavošana un koncentrāciju noteikšana ir sīki izskaidrota *CERI* testa protokolā (2).

16. Atšķaidījumus no nemarķēta 17β-estradiola šķīduma sagatavo, 1 nM 17β-estradiola izejšķīduma pievienojot testa buferšķīdumu, lai iegūtu astoņas augoša stipruma koncentrācijas, kas sākotnēji ir diapazonā no 0,625 µM līdz 80 µM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā 0,0625–8 µM iegūst, 10 µl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs, kurās paredzēts mērīt nespecifisko saistīšanos (sk. 2. un 3. tabulu). Nemarķēta 17β-estradiola atšķaidījumu sagatavošana ir sīki izskaidrota *CERI* testa protokolā (2).

17. Izmanto receptora koncentrāciju, pie kuras specifiskā saistīšanās ir 40±10 % (sk. 12.–13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu sagatavo ar ledusaukstu testa buferšķīdumu un tieši pirms izmantošanas, t. i., pēc tam, kad ir jau sagatavotas visas pārējās iedobes, kas paredzētas kopējās saistīšanās un nespecifiskās saistīšanās noteikšanai un tikai karstajam ligandam paredzētās iedobes.

18. 96 iedobju mikrotitrēšanas plates sagatavo saskaņā ar 2. tabulas norādījumiem, katrai [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijai sagatavojot trīs replikātus. 3. tabulā sniegti testa protokolā paredzētie [^{3}H]-17β-estradiola, nemarķēta 17β-estradiola, buferšķīduma un receptora tilpumi.

2. tabula

Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)*	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	TB mērīšanai			NSB mērīšanai			Tikai karstā liganda noteikšanai				Nemarķēta E2 atšķaidījumi plates 4.–6. kolonnai	[^{3}H]E2 atšķaidījumi plates 1.–9. kolonnai
A	0,0313 nM [^{3}H] E2 + ER			0,0313 nM [^{3}H] E2 + 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: kopējā saistīšanās
NSB: nespecifiskā saistīšanās
[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-estradiols
E2: nemarķēts 17β-estradiols
(*) Šeit norādītās koncentrācijas ir galīgās koncentrācijas attiecīgajā mikrotitrēšanas plates iedobē.
(**) Nemarķēta E2 un [^{3}H]E2 atšķaidījumus var sagatavot atsevišķā mikrotirēšanas platē.

3. tabula

Reaģenta tilpumi piesātinājuma testa mikrotitrēšanas platē

Ailes numurs		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Sagatavošanas soļi		TB iedobes			NSB iedobes			Tikai karstais ligands		
Komponentu tilpums minētajām reakcijas iedobēm un pievienošanas kārtība	Buferšķīdums	60 µl			50 µl			90 µl		
	nemarķēts E2 (2. tabulas 11. aile)	–			10 µl			—		
	[^{3}H]E2 (2. tabulas 12. josla)	10 µl			10 µl			10 µl		
	*hr*ERα	30 µl			30 µl			—		
Kopējais reaģenta tilpums		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubācija		**REAKCIJA PĒC 2 STUNDU INKUBĀCIJAS**						Radioaktivitātes kvantificēšana uzreiz pēc sagatavošanas. Neinkubē		
Apstrāde ar 0,4 % DCC		Jā			Jā			**Nē**		
0,4 % DCC tilpums		100 µl			100 µl			—		
Filtrēšana		Jā			Jā			Nē		
DPM MĒRĪŠANA										
Scintilācijas kokteilim pievienotais kvantificēšanas tilpums		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Ja *dpm* noteikšanai mikrotitrēšanas platēs izmanto šķidruma scintilāciju skaitīšanu (*LSC*), nav ieteicams tajā pašā testa platē, kurā mēra TB un NSB, sagatavot iedobes ar karsto ligandu vienu pašu. Iedobes tikai ar karsto ligandu sagatavo citā testa platē.
(**) Ja DCC tiek atdalīts ar centrifugēšanu, tad, lai nepieļautu kontaminēšanos ar DCC, ar *LSC* metodi mērījumus veic 50 µl supernatanta.

19. Kopējas saistīšanās un nespecifiskās saistīšanās noteikšanai paredzētās mikrotitrēšanas testa plates divas stundas inkubē istabas temperatūrā (22–28°C).

Ar hrERα saistītā [^{3}H]-17β-estradiola mērīšana

20. Pēc divu stundu inkubācijas perioda ar *hr*ERα saistītais [^{3}H]-17β-estradiols ir jāatdala no [^{3}H]-17β-estradiola, iedobēm pievienojot 100 µl ledusaukstas 0,4 % DCC suspensijas. Pēc tam testa plates uz 10 minūtēm novieto uz ledus, un reakcijas maisījumu un DCC suspensiju filtrē, pārnesot uz mikrotitrēšanas plates filtra, kā rezultātā tiek atdalīts DCC. Pēc tam *LSC* mēģenēs esošajam scintilācijas šķīdumam pievieno 100 µl filtrāta, lai ar šķidruma scintilāciju skaitīšanas metodi noteiktu sabrukumu skaitu minūtē (*dpm*) uz mēģeni.

21. Ja mikrotitrēšanas plates filtrs nav pieejams, alternatīvs veids DCC atdalīšanai ir centrifugēšana. Ņem 50 µl supernatanta, kas satur ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, un izmanto to scintilāciju skaitīšanai; to dara ar īpašu piesardzību, lai nepieļautu iedobju kontamināciju, saskaroties DCC.

22. Iedobes ar karsto ligandu vienu pašu izmanto, lai noteiktu testa iedobēm pievienotā [^{3}H]-17β-estradiola sabrukumu skaitu minūtē (*dpm*). Radioaktivitāti kvantificē uzreiz pēc sagatavošanas. Šīs iedobes neinkubē un neapstrādā ar DCC suspensiju, bet to saturu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā. Ar šiem mērījumi pierāda, cik daudz [^{3}H]-17β-estradiola (izteikta *dpm*) pievienots katrā iedobju kopumā, kas demonstrē kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos.

Konkurējošās saistīšanās tests

23. Konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^{3}H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Katrā testa veikšanas reizē izmanto trīs paralēlus katras koncentrācijas replikātus. Papildus tam attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu izpilda trīs reizes, un tas nenotiek paralēli, bet dažādos laikos. Testu veic vienā vai vairākās 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs.

Kontroles

24. Veicot testu, katrā eksperimentā jāiekļauj paralēlais šķīdinātājs un kontroles (t. i., references estrogēns, vājš saisteklis un nesaisteklis). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs ir jābūt: i) E2 un vāja saistekļa triplikātiem augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana, t. i., gandrīz pilnīga radioaktīvi marķētā liganda pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontroļu un nespecifiskās saistīšanās triplikātiem. Testa buferšķīduma, kontroļu, [^{3}H]-17β-estradiola, *hr*ERα un testējamo ķimikāliju šķīdumu sagatavošanas procedūras ir sīki aprakstītas *CERI* testa protokolā (2).

Šķīdinātāja kontrole

25. Šķīdinātāja kontrole rāda, vai nenotiek šķīdinātāja mijiedarbība ar testa sistēmu, kā arī mēra kopējo saistīšanos (apzīmē ar "TB" — *total binding*). Ieteicamais šķīdinātājs ir DMSO. Ja testējamās ķimikālijas visaugstākā koncentrācija dimetilsulfoksīdā nešķīst, kā alternatīvu var izmantot etanolu. Galīgajā testā DMSO koncentrācija iedobēs ir 2,05 %, un to var palielināt līdz 2,5 % gadījumos, kad testējamā ķimikālija slikti šķīst. Nevajadzētu izmantot DMSO koncentrācijās, kas pārsniedz 2,5 %, jo augstākas koncentrācijas šķīdinātājs var izraisīt interferenci uz testu. Testējamajām ķimikālijām, kas nešķīst DMSO, bet ir šķīstošas etanolā, bez interferences uz testu var izmantot ne vairāk kā 2 % etanola šķīdumu.

Buferšķīduma kontrole

26. Buferšķīduma kontrole ("BC") nedrīkst saturēt ne šķīdinātāju, ne testējamo ķimikāliju, bet tā satur visus citus testa komponentus. Buferšķīduma kontroles rezultātus salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu.

Stiprs saisteklis (references estrogēns)

27. 17β-estradiols (*CAS* 50-28-2) ir endogēnisks ligands ar augstu afinitāti (alfa apakštipa) ER. Katram *hr*ERα konkurējošās saistīšanās testam sagatavo standarta līkni ar nemarķētu 17β-estradiolu, lai varētu novērtēt, kāda ir mainība laika gaitā, veicot testu tajā pašā laboratorijā. Sagatavo astoņus nemarķēta 17β-estradiola šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) tā, lai testa iedobēs, kuras izmantos standarta līknei, šķīdumu galīgā koncentrācija būtu ar šādiem intervāliem: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Nemarķēta 17β-estradiola (1 μM) augstākā koncentrācija kalpo kā nespecifiskās saistīšanās indikators. 4. tabulā šo koncentrāciju apzīmē ar kodu "NSB", lai gan tā ir arī standarta līknes daļa.

Vājš saisteklis

28. Lai demonstrētu katra eksperimenta jutīgumu un ļautu novērtēt, kāda ir rezultātu mainība, veicot testu laika gaitā, tajā iekļauj vāju saistekli (noretinodrelu (*CAS* 68-23-5) vai — alternatīvi — noretindronu (*CAS* 68-22-4). Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) un testa buferšķīdumā ar šādām galīgajām koncentrācijām testa iedobēs: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} un 10^{-9} M.

Nesaisteklis

29. Kā negatīvo kontroli (nesaistekli) izmanto oktiltrietoksisilānu (OTES, *CAS* 2943-75-1). Tas apstiprinās, ka tests spēs noteikt ķimikālijas, kas nesaistās ar *hr*ERα. Sagatavo astoņus nesaistekļa šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) un testa buferšķīdumā ar šādām galīgajām koncentrācijām testa iedobēs: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot di-*n*-butilftalātu (DBP, *CAS* 84-72-2), bet to testē tikai līdz koncentrācijai 10^{-4}M. Ir pierādīts, ka DBP maksimālā šķīdība testā ir 10^{-4}M.

HrERα koncentrācija

30. Izmanto receptora daudzumu, pie kura specifiskā saistīšanās ir 40±10 % (sk. 3. papildinājuma 12.-13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu sagatavo, tieši pirms izmantošanas funkcionālo *hr*ERα atšķaidot ar ledusaukstu testa buferšķīdumu.

[^{3}H]17β-estradiols

31. [^{3}H]-17β-estradiola galīgā koncentrācija testa iedobēs ir 0,5 nM.

Testējamās ķimikālijas

32. Vispirms ir jāveic šķīdības tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testa protokolā. Sākotnēji katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē vismaz astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes (sk. arī 3.papildinājuma 35. punktu). Kad testa koncentrāciju diapazons ir noteikts, testējamo ķimikāliju testē, izmantojot astoņas diapazona noteikšanas testā identificētās log koncentrācijas ar attiecīgajiem intervāliem. Otrajā un trešajā eksperimentā izmantotās koncentrācijas pielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

33. Testējamās ķimikālijas atšķaidījumus sagatavo atbilstošā šķīdinātājā (sk. 3.papildinājuma 25. punktu). Ja testējamās ķimikālijas augstākā koncentrācija nešķīst ne DMSO, ne etanolā un lielāka šķīdinātāja daudzuma pievienošana galīgajā testa stobriņā novestu pie pieņemamās robežas pārsniegšanas, augstāko koncentrāciju var samazināt par vienu intervālu uz leju. Šādā gadījumā sērijveida koncentrācijas var papildināt ar vienu papildkoncentrāciju amplitūdas apakšā. Visas pārējas sērijveida koncentrācijas paliek nemainīgas.

34. Pievienojot testējamās ķimikālijas šķīdumus testa iedobēs, tos rūpīgi vēro, jo pievienošanas laikā var rasties nogulsnes. Datus par tām iedobēm, kurās konstatē nogulsnes, neņem vērā, pielāgojot datus līknei, un testa pārskatā norāda izslēgšanas iemeslu.

35. Ja no citiem avotiem jau ir pieejama informācija par testējamās ķimikālijas log(IC_{50}), atšķaidījumus var būt lietderīgi ģeometriski izkārtot ciešāk ap paredzamo log(IC_{50}) (t. i., pa 0,5 log vienībām). Galīgajiem rezultātiem būtu jāatspoguļo pietiekama koncentrāciju izkliede abās log (IC_{50}) pusēs, arī līknes augšējā un apakšējā punktā, un koncentrācijām jābūt pietiekami raksturojošām attiecībā uz saistīšanās līkni.

Testa plates izkārtojums

36. Sagatavo marķētas mikrotitrēšanas plates, kurās ir pa sešiem šādiem inkubētiem replikātiem: šķīdinātāja kontrole, references estrogēns (E2) visaugstākajā koncentrācijā, kas kalpo arī par nespecifiskās saistīšanās (NSB) rādītāju, buferšķīduma kontrole, trīs inkubēti replikāti katram no šiem: astoņas nesaistīgās kontroles (oktiltrietoksisilāna) koncentrācijas, septiņas zemākās references estrogēna (E2) koncentrācijas, astoņas vāja saistekļa (noretinodrela vai noretindrona) koncentrācijas un astoņas koncentrācijas no katras testējamās ķimikālijas (TC). Mikrotitrēšanas plates izkārtojuma diagrammas paraugs pilnām references estrogēna un kontroļu koncentrāciju līknēm ir sniegts 4. tabulā. Atsevišķas mikrotitrēšanas plates izmanto testējamai ķimikālijai, un ir vajadzīgas testa plates kontroles, t. i., i) E2 un vāja saistekļa triplikāti augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontrole (kopējā saistīšanās) un nespecifiskā saistīšanās, no katra pa sešiem replikātiem (5. tabula). Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojuma paraugs ar trijām nezināmām testējamajām ķimikālijām ir dots 3.3. papildinājumā. Darblapā, kā arī 4. un 5. tabulā norādītās koncentrācijas attiecas uz galīgajām koncentrācijām, ko izmanto katrā testēšanas iedobē. Maksimālā E2 koncentrācija ir 1×10^{-7} M, un attiecībā uz vāju saistekli jāizmanto augstākā koncentrācija, kas 1. mikrotirēšanas platē izmantota vājam saisteklim. IC_{50} koncentrāciju nosaka laboratorija, balstoties uz savu vēsturisko kontroles datubāzi. Tiek sagaidīts, ka šī vērtība būs līdzīga validācijas pētījumos konstatētajai vērtībai (sk. 1. tabulu).

4. tabula

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums [1] [2], pilnas atsauces estrogēnu un kontroļu koncentrāciju līknes (1. plate).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buferšķīduma kontrole un pozitīvā kontrole (E2)			Vāji pozitīva kontrole (noretinodrels)			Negatīvā kontrole (OTES)			TB un NSB		
A	Tukša iedobe (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (šķīdinātāja kontrole) (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			Buferšķīduma kontrole		
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			Tukša iedobe (karsta) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

[1] zkārtojuma paraugs standarta mikrotirēšanas platei, ko izmanto katrā testa izpildes reizē.

[2] Ņemiet vērā, ka šajā mikrotirēšanas platē izmantoti atšķaidījumi, kas attiecībā uz standarta mikrotitrēšanas plati aprakstīti iepriekšējās nodaļās.
Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

(*) Reāli tukša iedobe, netiek izmantota.

(**) Tukša iedobe, netiek izmantota inkubācijas laikā, bet to izmanto, lai apstiprinātu kopējo pievienoto radioaktivitāti.

5. tabula

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, papildu plates testējamajām ķimikālijām (TC) un plates kontrolēm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testējamā ķimikālija Nr. 1 (TC-1)			Testējamā ķimikālija Nr. 2 (TC-2)			Testējamā ķimikālija Nr. 3 (TC-3)			Kontroles		
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 (šķīdinātāja kontrole)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

Konkurējošās saistīšanās testa izpilde

37. Katrā testēšanas plates iedobē (izņemot iedobes, kas attiecas uz kopējo saistīšanos, un tukšās, karstās iedobes, kā parādīts 6. tabulā) iepilina 50 µl testa buferšķīduma, tad samaisa ar 10 µl attiecīgi šķīdinātāja kontroles, references estrogēna (E2), vāja saistekļa, nesaistekļa un testējamās ķimikālijas un 10 µl 5 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma. Pēc tam katrā platē pievieno 30 µl ledusauksta receptora šķīduma, un uzmanīgi samaisa. Kā pēdējo reaģentu pievieno *hr*ERα šķīdumu. Testa mikrotitrēšanas plates divas stundas inkubē istabas temperatūrā (22–28°C).

6. tabula

***Hr*ER konkurējošās saistīšanās testa komponentu tilpums mikrotitrēšanas platēs**

Sagatavošanas soļi		Visas iedobes, izņemot TB	TB iedobes	Tukšās iedobes (karstas)
Komponentu tilpums minētajām reakcijas iedobēm un pievienošanas kārtība	Testa buferšķīdums istabas temperatūrā	50 µl	60 µl	90 µl
	Nemarķēts E2, vājš saisteklis, nesaisteklis, šķīdinātājs un testējamās ķimikālijas (*)	10 µl	—	—
	[^{3}H]-17β-estradiols pietiekamā daudzumā, lai panāktu galīgo koncentrāciju 0,5 nM (t. i., 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Noteiktā *hr*ERα koncentrācija (sk. 12.–13. punktu)	30 µl	30 µl	—
Kopējais tilpums katrā testa plates iedobē		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Sagatavoti tā, lai galīgā koncentrācijā netiktu pārsniegta pieņemamā šķīdinātāja koncentrācija.

38. Saskaņā ar aprakstu 3. papildinājuma 21.–23. punktā (attiecas uz piesātinājuma–saistīšanās testu) kvantificē ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, taču pirms tam, katrā iedobē pievienojot 100 µl ledusaukstas DCC suspensijas, no brīvā [^{3}H]-17β-estradiola jābūt atdalītam ar *hr*ERα saistītajam [^{3}H]-17β-estradiolam.

39. Iedobes G10–12 un H10–12 (sk. 4. tabulas aili "Tukša iedobe (karsta)") raksturo marķēta [^{3}H]-estradiola *dpm* 10 µl. 10 µl alikvotu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā.

Pieņemamības kritēriji

Piesātinājuma–saistīšanās tests

40. Ja tiek izmantotas pieaugošas [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas, specifiskās saistīšanās līknei ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar ligandu.

41. Pieņemamības diapazons attiecībā uz specifisko saistīšanos pie 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas ir 30–50 % no kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējās vērtības, kas mērīta visās izpildes reizēs. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija un piesātinājuma tests jāatkārto.

42. Datiem jābūt attēlojamiem lineāras Skačārda diagrammas veidā.

43. Nespecifiskā saistīšanās nedrīkst būt pārmērīga. Nespecifiskās saistīšanās vērtība parasti ir <35 % no kopējās saistīšanās. Tomēr minētā procentuālā attiecība dažkārt šo limitu var pārsniegt, ja testā tiek mērīts ļoti zems *dpm* pie zemākās radioaktīvi marķētā 17β-estradiola koncentrācijas.

Konkurējošās saistīšanās tests

44. Pie pieaugošām nemarķēta 17β-estradiola koncentrācijām [^{3}H]-17β-estradiolu pakāpeniski pārvieto no receptora tādā veidā, kas līdzinās viena domēna konkurējošajai saistīšanai.

45. References estrogēna (t. i., 17β-estradiola) IC_{50} vērtībai jābūt aptuveni vienādai ar [^{3}H]-17β-estradiola molāro koncentrāciju, kam pieskaitīta piesātinājuma–saistīšanās testā noteiktā diasociācijas konstante (*Kd*).

46. Visās testa izpildes reizēs kopējās specifiskās saistīšanās vērtībai pastāvīgi jābūt pieņemamības diapazonā (40 ± 10 %), pie nosacījuma, ka kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējā mērītā koncentrācija katrā iedobē ir 0,5 nM. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija.

47. Šķīdinātājs nedrīkst mainīt testa jutīgumu vai reproducējamību. Šķīdinātāja kontroles rezultātus (TB iedobes) salīdzina ar buferšķīduma kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu. Ja šķīdinātājs neietekmē testa gaitu, TB un buferšķīduma kontrolēm jābūt salīdzināmām.

48. Testējot ar koncentrācijām, kas nepārsniedz 10^{-3} M (OTES) vai 10^{-4} M (DBP), nesaisteklim nevajadzētu no *hr*ERα pārvietot vairāk nekā 25 % [^{3}H]-17β-estradiola.

49. Izmantojot *CERI hr*ER saistīšanās testa validēšanas pētījuma datus (2. atsauces N pielikums), tika izstrādāti veiktspējas kritēriji attiecībā uz references estrogēnu un diviem vājiem saistekļiem (piem., noretinodrels, noretindrons). Ir sniegti 95 % ticamības intervāli vidējām vērtībām ± SN (n), kas tika iegūtas no visiem kontroles testiem, ko izpildīja četras laboratorijas, kuras piedalījās validēšanas pētījumā. 95 % ticamības intervālus aprēķināja references estrogēna un vāju saistekļu līknes pielāgošanas parametriem (t. i., augšējam un apakšējam punktam, Hilla virziena koeficientam un log IC_{50}) un vāju saistekļu $\log_{10}$*RBA* attiecībā pret references estrogēnu. 1. tabulā sniegti līknes pielāgošanas parametru paredzamie diapazoni, kurus var izmantot kā veiktspējas kritērijus. Praksē IC_{50} diapazons var būt nedaudz atšķirīgs atkarībā no eksperimentāli iegūtā receptora preparāta *Kd* un testā izmantotās liganda koncentrācijas.

50. Testējamo ķimikāliju līknes pielāgošanas parametriem veiktspējas kritēriji izstrādāti netika, jo pastāv pārāk plašs esošu potenciāli testējamu ķimikāliju spektrs un potenciālās afinitātes un rezultātu mainīgums (piem., pilna līkne, daļēja līkne, neatbilstība līknei). Tomēr katrā testēšanas reizē un ar katru testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus būtu jāizvērtē speciālistam. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu (t. i., 90–100 % saistīšanās). Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām izpildes reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Izpildot kontroles testus attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju, mērījumiem būtu jātuvojas veiktspējas parametriem, kas paziņoti attiecībā uz šo *CERI* testu, un tiem jābūt saskanīgiem ar attiecīgās laboratorijas vēsturiskajiem kontroldatiem.

DATU ANALĪZE

Piesātinājuma–saistīšanās tests

51. Tiek mērīta gan kopējā, gan nespecifiskā saistīšanās. No šim vērtībām, nespecifisko saistīšanos atņemot no kopējās saistīšanās, tiek aprēķināta pieaugošu [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju specifiskā saistīšanās līdzsvara apstākļos. Grafikā, kurā specifisko saistīšanos attēlo attiecībā pret [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju, attiecībā uz maksimālo specifisko saistīšanos ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar [^{3}H]-17β-estradiolu. Turklāt datu analīzē būtu jākonstatē [^{3}H]-17β- estradiola saistīšanās ar vienu augstas afinitātes saistīšanās domēnu. Piesātinājuma–saistīšanās līknē attēlo nespecifisko, kopējo un specifisko saistīšanos. Šo datu turpmākai analīzei izmanto nelineārās regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995), un galīgos datus attēlo ar Skačārda diagrammu.

52. Analizējot datus, *Bmax* un *Kd* nosaka no kopējās saistīšanās datiem vien, izmantojot pieņēmumu, ka nespecifiskā saistīšanās ir lineāra, ja vien nav pamatota iemesla izmantot citu metodi. Turklāt, meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. Nosakot *Bmax* un *Kd* no piesātinājuma–saistīšanās datiem, vienmēr jāizmanto liganda noplicināšanās korekcija (piem., *Swillens* (1995) metode).

Konkurējošās saistīšanās tests

53. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

54. Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) parasti neierobežo. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Liganda noplicināšanās korekciju neizmanto. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) aprēķina kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistekļu kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, sekojot testa veikšanas norādēm 23. papildinājuma 44.–49. punktā.

55. Datus par visam testējamajām ķimikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa izpildes reizes testējamās ķimikālijas ieteicams sākotnēji analizēt standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles (sk. 3. papildinājuma 54.punktu). Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras testējamās ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi.

Datu interpretācija

56. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par saistīgu ar *hr*ERα, ja saistīšanās līkne ir pielāgojama un zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 % (1. attēls).

57. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par nesaistīgu ar *hr*ERα, ja:

— saistīšanās līkne ir pielāgojama un pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir lielāks par 75 % vai

— saistīšanās līkni pielāgot nevar un visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.

58. Testējamās ķimikālijas klasifikāciju uzskata par neskaidru, ja nav izpildīts neviens no iepriekšminētajiem nosacījumiem (t. i., zemākais pielāgotās atbildreakcijas līknes punkts ir robežās no 76 – 51 %).

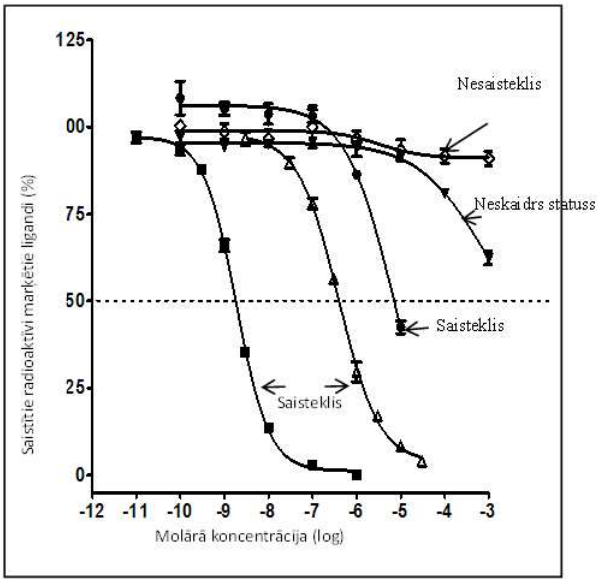
7. tabula

Kritēriji, pēc kuriem klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.

Klasifikācija	Kritēriji
Saisteklis[a]	Saistīšanās līkni var pielāgot. **Zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 %.**
Nesaisteklis[b]	Ja saistīšanās līkni var pielāgot, **pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir virs 75 %.** Ja saistīšanās līkni nevar pielāgot, **visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.**
Neskaidra[c]	Jebkura testa izpildes reize, kas neuzrāda testējamās ķimikālijas saistīgumu vai nesaistīgumu (piem., pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts ir robežās no 76–51 %).

1. attēls

Piemēri, kā klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.



59. Laboratorijā attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu veic vairākas izpildes reizes, un katrai izpildes reizei atkarībā no rezultāta piešķir ciparisku vērtību, no kuras pēc tam aprēķina vidējo vērtību atbilstoši 8. tabulā sniegtajam paraugam. Vidējos rezultātus, kas apkopoti konkrētajā laboratorijā, salīdzina ar gaidīto katras testējamās ķimikālijas klasifikāciju.

8. tabula

Metode, pēc kuras klasificē testējamo ķimikāliju, izmantojot vairākas testēšanas reizes vienā laboratorijā.

Katrai izpildes reizei piešķir ciparisku vērtību:

Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	2
Neskaidrs	1
Nesaisteklis	0

Izpildes reizēs iegūto ciparisko vērtību vidējās vērtības klasificēšana:

Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	Vidēji ≥ 1,5
Neskaidrs	0,5 ≤ Vidējā vērtība < 1,5
Nesaisteklis	Vidēji < 0,5

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

60. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "*Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI" 24. punktu.

3.1. papildinājums

TERMINU SARAKSTS

[^{3}H]E2: 17β-estradiols, kas radioaktīvi marķēts ar tritiju.

DCC: ar dekstrānu pārklāta ogle.

E2: nemarķēts 17β-estradiols (inerts).

Testa buferšķīdums: 10 mM tris-HCl (pH 7,4), kas satur 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % glicerīna, 0,2 mM leupeptīna, 1 mM ditiotreitola un 10 mg/ml liellopu seruma albumīna.

hrERα: cilvēka rekombinantais estrogēnreceptors alfa (liganda saistīšanās domēns).

Replikāts: viena no vairākām vienāda satura un vienādas koncentrācijas iedobēm, kuras paralēli testē vienā testēšanas reizē. Pēc šī protokola katru testējamās ķimikālijas koncentrāciju testē ar trim replikātiem (triplikātiem); proti, pie katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir trīs replikāti, kurus testē vienlaicīgi.

Izpildes reize: viss paralēli testēto miktotitrēšanas plates testa iedobju kopums, kas nodrošina visu informāciju, kura vajadzīga, lai raksturotu testējamās ķimikālijas saistīšanos ar *hr*ERα, (t. i., kopējais testa iedobei pievienotais [^{3}H]-17β-estradiols, maksimālā [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās ar *hr*ERα, nespecifiskā saistīšanās un kopējā saistīšanās pie dažādām testējamās ķimikālijas koncentrācijām). Izpildes reize var nozīmēt pat tikai vienas testēšanas iedobes (t. i., replikāta) testēšanu pie katras koncentrācijas, tomēr šajā konkrētajā gadījumā protokols pieprasa testēt ar triplikātiem, un viena izpildes reize nozīmē trīs testēšanas iedobes pie katras koncentrācijas. Papildus minētajam šis protokols prasa veikt trīs neatkarīgas (proti, neveicot paralēli) izpildes reizes ar katru ķimikāliju.

3.2. papildinājums

KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA IEDOBJU IZKĀRTOJUMS

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķiduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	A1	1	tukša	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	tukša	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	tukša	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	D3	3	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	A4	1	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	E5	2	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrels	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrels	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrels	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

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (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

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (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	kopējā saistīšanās	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	B11	5	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	buferšķīduma kontrole	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	buferšķīduma kontrole	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	buferšķīduma kontrole	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	buferšķīduma kontrole	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	buferšķīduma kontrole	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 - (*)	1	tukša iedobe (karsta)	karsta	H1	—	90	—	10	—	100	-

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	G11 - (*)	2	tukša iedobe (karsta)	karsta	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 - (*)	3	tukša iedobe (karsta)	karsta	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 - (*)	4	tukša iedobe (karsta)	karsta	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 - (*)	5	tukša iedobe (karsta)	karsta	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	tukša iedobe (karsta)	karsta	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	D1	1	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	H3	3	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	E5	2	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	B7	1	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	F9	3	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	E2 kontrole (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	E2 kontrole (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	E2 kontrole (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	E2 kontrole (IC_{50})	S	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}x1-0$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B11	2	E2 kontrole (IC_{50})	S	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}x1-0$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	E2 kontrole (IC_{50})	S	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}x1-0$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	C10	1	NE kontrole (max)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	NE kontrole (max)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	NE kontrole (max)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	NE kontrole (IC_{50})	S	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	NE kontrole (IC_{50})	S	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	NE kontrole (IC_{50})	S	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	G10	1	kopējā saistīšanās	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	-

(*) Piezīme: "karstās" iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 10 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

4. papildinājums

APSVĒRUMI, KAS JĀŅEM VĒRĀ, ANALIZĒJOT *hr*ER KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA DATUS

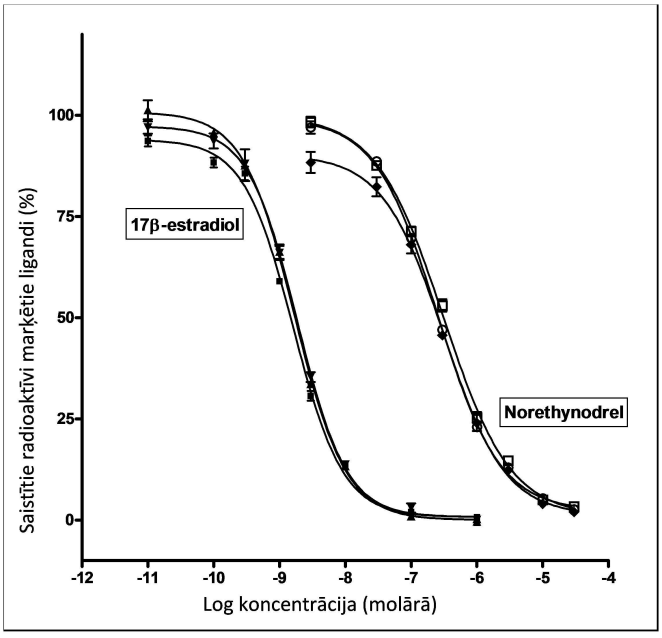
1. *Hr*ERα konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^{3}H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

References estrogēna un vāja saistekļa ģenerēto datu analīze (1)

2. Kontroles testēšanas reizēs iegūtos datus transformē turpmākai analizēšanai (t. i., procentuālā [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās un kontroles ķimikālijas log koncentrācija). Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem, piem., *BioSoft*; *GraphPad Prism*) (2). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) ierobežot parasti nav vajadzīgs. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. *FW* vai *CERI hr*ER testiem liganda noplicināšanās korekcija nav vajadzīga, bet attiecīgā gadījumā var apsvērt tās lietošanu. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) var aprēķināt kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistīgām kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, izmantojot testa veiktspējas un pieņemamības kritērijus, kas aprakstīti šajā testa metodē (20. punkts), 2.papildinājumā (*FW* testa 41.–51. punkts) un 3. papildinājumā (*CERI* tests, 41.–51. punkts). 1. attēlā sniegti references estrogēna un vāja saistekļa piemēri, testu veicot trīs reizes.

1. attēls.

Konkurējošās saistīšanās līknes piemēri ar references estrogēnu un vāja saistekļa kontroli.



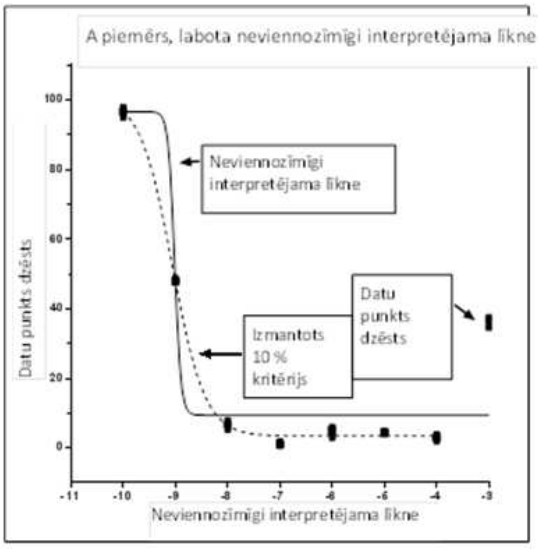
Testējamo ķimikāliju ģenerēto datu analīze

3. Datus par visam testējamajām ķimikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa veikšanas reizes testējamās ķimikālijas datus sākotnēji analizē standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles. Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi. Katrā testēšanas reizē attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus ir jāizvērtē speciālistam, un datiem, pēc kuriem katru testējamo ķimikāliju klasificē kā saistīgu vai nesaistīgu, jābūt zinātniski pamatojamiem.

4. Dažkārt var būt situācijas, kad *hr*ER saistīšanās datu pienācīgas analizēšanas un interpretēšanas vajadzībām datiem ir jāveic zināmas korekcijas. Agrākos pētījumos ir novēroti gadījumi, kad receptora konkurējošās saistīšanās datu analīzi un interpretāciju apgrūtina procentuālās specifiskās saistīšanās pieaugums, ja ķimikālijas testē augstākā koncentrācijā (2. attēls). Šī problēma ir plaši zināma dažādu receptora konkurējošās saistīšanās testu protokolu lietotājiem (3). Šādos gadījumos no koncentrācijas atkarīgā atbildreakcija tiek novērota pie zemākām koncentrācijām, bet, kad testējamās ķimikālijas koncentrācija tuvojas šķīdības robežai, [^{3}H]17β-estradiola pārvietošana vairs nesamazinās. Šādos gadījumos pie augstākajām koncentrācijām iegūtie dati norāda uz to, ka ir sasniegta testa bioloģiskā robeža. Piemēram, šis fenomens daudzkārt tiek saistīts ar ķīmisko nešķīdību un izgulsnēšanos pie augstākām koncentrācijām vai arī var atspoguļot to, ka pie visaugstākajām ķīmiskajām koncentrācijām ir pārsniegta ar dekstrānu pārklātas ogles spēja atdalīšanās procedūras laikā uztvert nesaistītu radioaktīvi marķētu ligandu. Ja, veicot konkurējošās saistīšanās datu pielāgošanu divvirzienu līknei, šādus datu punktus saglabā, tas dažkārt var novest pie nepareizas ER saistīšanās potenciāla klasificēšanas attiecībā uz testējamo ķimikāliju (2. attēls). Lai no tā izvairītos, *FW* un *CERI hr*ER saistīšanās testu protokoli ietver izvēli no analīzes izslēgt tādus datu punktus, kuros ar replikātiem iegūtā [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās procentuālā vidējā vērtība par 10 % vai vairāk pārsniedz ar kādu zemāku koncentrāciju novēroto vidējo vērtību (to dēvē par 10 % kritēriju). Šo kritēriju attiecībā uz konkrēto līkni var izmantot tikai vienreiz, un, lai līkni varētu pareizi klasificēt, jāpaliek vēl datiem vismaz par sešām koncentrācijām.

2. attēls.

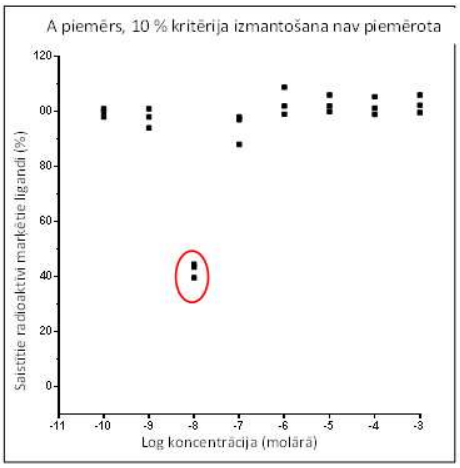
Piemēri: konkurējošās saistīšanās līknes, izmantojot 10 % kritēriju un bez tā.

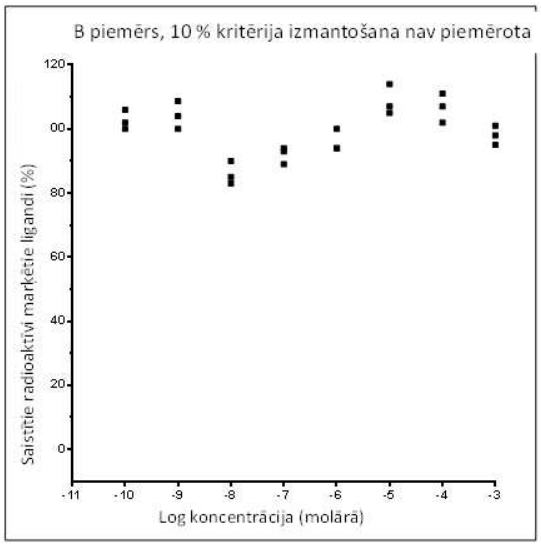


5. To, vai ir atbilstoši izmantot 10 % kritēriju, lai labotu šīs līknes, ir rūpīgi jāizsver, un to izmanto vien gadījumos, kad dati stipri liecina par *hr*ER saistekli. Kad *FW hr*ER saistīšanās testa validācijas pētījuma laikā veica eksperimentus, tika novērots, ka dažkārt 10 % kritērija piemērošana izraisa neplānotas un neparedzamas sekas. Attiecībā uz ķimikālijām, kas nemijiedarbojās ar receptoru r (t. i., faktiskie nesaistekļi), pie aptuveni 100 % radioaktīvi marķēto ligandu saistīšanās bieži bija vērojama mainība, kas visā testēto koncentrāciju diapazonā pārsniedz 10 %. Ja viszemākā vērtība tika konstatēta pie zemas koncentrācijas, datus par visām augstākajām koncentrācijām potenciāli varētu izņemt no analizējamiem datiem, izmantojot 10 % kritēriju, lai gan šīs koncentrācijas var izrādīties noderīgas, nosakot, vai attiecīgā ķimikālija ir nesaisteklis. 3. attēlā sniegtie piemēri ilustrē gadījumus, kad 10 % kritērija izmantošana nav piemērota.

3. attēls.

Piemēri: konkurējošās saistīšanās dati gadījumos, kad nepiemēro 10 % kritēriju.





ATSAUCES

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71. ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJAS TESTI, KUROS APSKATĪTS ĀDAS SENSIBILIZĀCIJAS NELABVĒLĪGĀ IZNĀKUMA CEĻA (*AOP*) ATSLĒGNOTIKUMS "DENDRĪTISKO ŠŪNU AKTIVĀCIJA"

VISPĀRĪGS IEVADS

Testēšanas metode, kuras pamatā ir atslēgnotikums "dendrītisko šūnu aktivācija"

1. Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Par to, kādi bioloģiskie atslēgnotikumi ir ādas sensibilizācijas pamatā, valda vispārēja vienprātība. Pašreizējās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, ESAO [*OECD*] *AOP* programmas ietvaros izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (*Adverse Outcome Pathway*, *AOP*) (2) no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgajai ietekmei, proti, alerģiskam kontaktdermatītam. Šajā gadījumā molekulārais iniciācijas notikums (proti, pirmais atslēgnotikums) ir elektrofilu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofilajiem centriem ādas proteīnos. Otrais atslēgnotikums šajā *AOP* notiek keratinocītos un ietver iekaisuma atbildreakcijas, kā arī izmaiņas gēnu ekspresijā, kas asociētas ar konkrētiem šūnu signālceļiem, piem., no antioksidanta/elektrofila atbildreakcijas elementa (*ARE*) atkarīgiem ceļiem. Trešais atslēgnotikums ir dendrītisko šūnu (DŠ) aktivācija, ko parasti novērtē pēc ekspresētajiem specifiskajiem šūnu virsmas marķieriem, hemokīniem un citokīniem. Ceturtais atslēgnotikums ir T šūnu aktivācija un savairošanās, ko netieši novērtē apakšdzimtas *Murinae* grauzēju limfmezglu lokālās stimulācijas testā (*LLNA*) (3).

2. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 442E (2017). Tā apraksta *in vitro* testus, kuros apskatīti mehānismi, kas aprakstīti pie ādas sensibilizācijas *AOP* dendrītisko šūnu aktivācijas atslēgnotikuma (2). Šī TM ietver testus, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem saskaņā ar ANO GHS un *CLP* regulu.

   Šajā TM aprakstīti šādi testi:

   — cilvēka šūnu līnijas aktivācijas tests (*h-CLAT*);

   — šūnu līnijas U937 aktivācijas tests (*U-SENS™*);

   — interleikīna-8 reportiergēna tests (tests *IL-8 Luc*).

3. Šajā testēšanas metodē iekļautie testi no attiecīgās ESAO *TG* testiem var atšķirties ar datu ieguves procedūru un mērītajiem rādījumiem, tomēr tam, lai izpildītu valstu prasības pēc ādas sensibilizācijas *AOP* dendrītisko šūnu aktivācijas atslēgnotikuma testa rezultātiem, vienlaikus izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, šos testus var izmantot bez izšķirības.

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

Atslēgnotikumā balstītajā testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

4. Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana [*Magnusson–Kligman*] maksimalizācijas testu ar jūrascūciņām (*Guinea Pig Maximisation Test, GPMT*) un Bīlera [*Buehler*] testu (TM B.6) (4) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas inducēšanas fāze, gan tās izsaukšanas fāze. Piekrišanu ir guvuši arī apakšdzimtas *Murinae* grauzēju testi, *LLNA* (TM B.42) (3) un tā divas bezradiācijas modifikācijas, *LLNA: DA* (TM B.50) (5) un *LLNA: BrdU-ELISA* (TM B.51) (6), kuros visos tiek novērtēta vienīgi indukcijas atbildreakcija, jo šie testi dzīvnieku labklājības un objektīva ādas sensibilizācijas inducēšanas fāzes mērījuma ziņā ir pārāki par testiem ar jūrascūciņām.

5. Pēdējā laikā ķimikāliju ādas sensibilizācijas briesmu potenciāla izvērtēšanas vajadzībām pieņemtas mehānistiskas *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes, kurās apskatīts ādas sensibilizācijas *AOP* pirmais atslēgnotikums (TM B.59; tiešais peptīdreaģētspējas tests — *Direct Peptide Reactivity Assay* (7)) un otrais atslēgnotikums (TM B.60; ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode (8)).

6. Šajā testēšanas metodē aprakstītie testi kvantificē vai nu izmaiņas tādu šūnu virsmas marķieru ekspresijā, kas asociēti ar monocītu un DŠ aktivāciju pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (piem., CD54, CD86), vai izmaiņas IL-8 (ar DŠ aktivāciju asociēta citokīna) ekspresijā. Ir ziņas, ka ādas sensibilizatori inducē šūnu membrānu marķieru (piem., CD40, CD54, CD80, CD83 un CD86) ekspresiju, līdztekus inducējot arī proinflamatoros citokīnus (piem., IL-1β un TNF-α) un vairākus hemokīnus, tostarp IL-8 (CXCL8) un CCL3 (9) (10) (11) (12), kas asociēti ar DŠ aktivāciju (2).

7. Tomēr, tā kā DŠ aktivācija ir tikai viens no ādas sensibilizācijas *AOP* (2) (13) atslēgnotikumiem, informācija, kas iegūta testos, kuros tiek mērīti tikai DŠ aktivācijas marķieri vien, var nebūt pietiekama, lai varētu izdarīt secinājumus par ķimikāliju ādas sensibilizācijas potenciāla esību vai neesību. Tāpēc tiek ierosināts šajā testēšanas metodē aprakstīto testu datus izmantot par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru (piem., UN GHS / *CLP* 1. kategorijas sensibilizatoru) nošķiršanā no nesensibilizatoriem integrētā testēšanas un novērtēšanas pieejā (*IATA*) kopā ar citu relevantu papildinformāciju, piem., informāciju, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi ādas sensibilizācijas *AOP* atslēgnotikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analoģijas principa ("aplūkot līdzīgu") tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem (13). Ir publicēti (13) piemēri, kā šajos testos iegūtos datus var izmantot definētās pieejās, t. i., pieejās, kurās standartizēta gan izmantoto informācijas avotu kopa, gan procedūra, kādā no datiem iegūst prognozes, un tos var izmantot kā lietderīgus *IATA* elementus.

8. Šajā testēšanas metodē aprakstītos testus vienus pašus nevar izmantot ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai ANO GHS / *CLP* apakškategorijās 1.A un 1.B (iestādēm, kuras izmanto šīs divas neobligātās apakškategorijas), ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumu vajadzībām. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvus rezultātus, kas iegūti ar šīm metodēm, var izmantot ķimikālijas klasificēšanai ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā arī vienus pašus.

9. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts ([1]), un tas nav saistīts ar testu izmantojamību vienkomponenta vielu, daudzkomponentu vielu un/vai maisījumu testēšanā. Informācija par testu izmantojamību daudzkomponentu vielu / maisījumu testēšanai pašlaik ir ierobežota (14) (15). Tomēr šie testi ir tehniski izmantojami daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Taču, pirms šo testēšanas metodi izmantot maisījuma testēšanai nolūkā iegūt datus kādam normatīvam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus ([2]). Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Turklāt, testējot daudzkomponentu vielas vai maisījumus, jāapsver iespējamā ietekme, ko uz novērotajām atbildreakcijām varētu atstāt citotoksiskie komponenti.

([1]) 2013. gada jūnijā ESAO kopīgajā sanāksmē vienojās jaunajās un atjauninātajās ESAO testēšanas vadlīnijās, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai konsekventāk lietot apzīmējumu "testējamā ķimikālija".

([2]) Šis teikums tika ierosināts un par to tika panākta vienošanās *WNT* 2014. gada aprīļa sanāksmē.

LITERATŪRA

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: 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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Šā pielikuma B.42. nodaļa. Limfmezglu lokālās stimulācijas tests.

(4) Šā pielikuma B.6. nodaļa. Ādas sensibilizācija.

(5) Šā pielikuma B.50. nodaļa. Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: DA.

(6) Šā pielikuma B.51. nodaļa. Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: BrdU-ELISA.

(7) Šā pielikuma B.59. nodaļa. *In chemico* ādas sensibilizācija: tiešais peptīdreaģētspējas tests (*DPRA*).

(8) Šā pielikuma B.60. nodaļa. Ādas *in vitro* sensibilizācija: ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode.

(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. Available at: 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.

1. papildinājums

ĀDAS IN VITRO SENSIBILIZĀCIJA: CILVĒKA ŠŪNU LĪNIJAS AKTIVĀCIJAS TESTS (H-CLAT)

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. *h-CLAT* kvantificē izmaiņas tādu šūnu virsmas marķieru ekspresijā, kas asociēti ar monocītu un dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju (konkrētāk, CD86 un CD54), cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līnijā THP-1 pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1) (2). Izmērītos CD86 un CD54 šūnu virsmas marķieru ekspresijas līmeņus pēc tam izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.

2. *h-CLAT* ir izvērtēts validācijas pētījumā, ko koordinēja Eiropas Savienības References laboratorija dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā (*EURL ECVAM*), un pēc tam to neatkarīgi profesionālizvērtējusi *EURL ECVAM* Zinātniskā konsultatīvā komiteja (*ESAC*). Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, *EURL ECVAM* ir ieteikusi (3) *h-CLAT* izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Piemēri, kā *h-CLAT* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, ir pieejami literatūrā (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Ir pierādīts, ka *h-CLAT* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar paņēmieniem, kuros izmanto šūnu kultūras, un ar plūsmcitometrisko analīzi. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šā testa, ir aptuveni 80 % gan tajā pašā laboratorijā, gan citās laboratorijās (3) (12). Validācijas pētījuma rezultāti (13) un citi publicētie pētījumi (14) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem šā testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no nesensibilizatoriem ir 85 % (N=142) ar jutību 93 % (94/101) un specifiskumu 66 % (27/41) (balstoties uz *EURL ECVAM* veikto atkārtoto analīzi (12), kurā ņemti vērā visi līdzšinējie dati un neņemot vērā negatīvos rezultātus ar ķimikālijām, kuru Log K_{ow} ir lielāks par 3,5, kā aprakstīts 4. punktā). Testā *h-CLAT* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķimikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.B apakškategorija), nevis ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.A apakškategorija) (4) (13) (15). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka metode *h-CLAT* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *h-CLAT* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka metodi *h-CLAT* var izmantot testējamām ķimikālijām, kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, reakcijas mehānismi, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (3) (14) (15). Metode *h-CLAT* ir izmantojama testējamajām ķimikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķimikālija nenosēžas vai no šķīdinātāja/nesēja neatdalās atsevišķās fāzēs) piemērotā šķīdinātājā/nesējā (sk. 14. punktu). Testējamajām ķimikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5, ir tendence dot pseidonegatīvus rezultātus (14). Tāpēc nevajadzētu ņemt vērā negatīvus rezultātus testos ar testējamajām ķimikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5. Tomēr pozitīvus rezultātus, kas iegūti testos ar testējamajām ķimikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5, tik un tā var izmantot par palīglīdzekli testējamās ķimikālijas atzīšanai par ādas sensibilizatoru. Turklāt izmantotās šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās spējas (16) un eksperimenta apstākļu dēļ negatīvus rezultātus testā *h-CLAT* var dot arī prohaptēni (t. i., vielas, kurām nepieciešama fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) un prehaptēni (t. i., vielas, kuras aktivizējas oksidējoties), jo īpaši tad, ja oksidācija norit lēni (15). Ar *h-CLAT* var vērtēt fluorescējošas testējamās ķimikālijas (17), tomēr ļoti fluorescējošas testējamās ķimikālijas, kuru starojuma viļņa garums ir tāds pats kā fluoresceīna izotiocianātam (FITC) vai propīdija jodīdam (PI), traucē detektēšanu ar plūsmas citometriju, tāpēc ar FITC konjugētām antivielām vai PI tās nevar izvērtēt pareizi. Tādā gadījumā var izmantot ar citiem fluorohromiem marķētas antivielas vai citus citotoksicitātes marķierus, ja vien, testējot 1.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tie dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC marķētās antivielas (sk. 24. punktu) vai PI (sk. 18. punktu). Ņemot vērā iepriekš minēto, negatīvie rezultāti jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem *IATA* satvarā. Gadījumos, kad ir liecības, ka metode *h-CLAT* nav izmantojama vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

5. Kā norādīts iepriekš, metode *h-CLAT* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Izmantojot integrētu pieeju, piem., *IATA*, tā var palīdzēt arī novērtēt sensibilizācijas potenci (4) (5) (9). Tomēr, lai noteiktu, kā *h-CLAT* rezultāti varētu palīdzēt novērtēt potenci, jāiegulda papildu darbs, kura pamatā vēlams būt datiem par cilvēku.

6. Definīcijas ir sniegtas 1.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

7. Metode *h-CLAT* ir *in vitro* tests, kas kvantificē izmaiņas šūnu virsmas marķieru (piem., CD86 un CD54) ekspresijā cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līnijā THP-124 stundas pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Šīs virsmas molekulas ir tipiski THP-1 monocītu aktivācijas marķieri un var imitēt DŠ aktivāciju, kam ir izšķirīga funkcija T šūnu praimingā (aktivācijā). Izmaiņas virsmas marķieru ekspresijā mēra ar plūsmas citometriju pēc šūnu iekrāsošanas ar antivielām, kas marķētas ar fluorohromiem. Paralēli izdara arī citotoksiskuma mērījumu, lai noteiktu, vai virsmas marķieru ekspresijas aktivācija ir novērojama arī pie subcitotoksiskām koncentrācijām. Lai būtu vieglāk sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem, aprēķina un prognozes modelī (sk. 26. punktu) izmanto virsmas marķieru relatīvo fluorescences intensitāti salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesēja kontroles fluorescences intensitāti.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

8. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 1.2. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 11. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 20.–22. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliecinās, ka testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā laika gaitā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

9. Šis tests ir balstīts uz *h-CLAT* dzīvniekeksperimentiem alternatīvu metožu datubāzes pakalpojuma (*DB-ALM*) protokolu Nr. 158 (18), kas ir *EURL ECVAM* koordinētajā validācijas pētījumā izmantotais protokols. Metodi *h-CLAT* ieviešot un izmantojot laboratorijā, ieteicams lietot šo protokolu. Tālāk sniegts galveno *h-CLAT* metodes komponentu un procedūru apraksts; metodei *h-CLAT* ir divas daļas: *devas noteikšanas tests* un *CD86/CD54 ekspresijas mērījums*.

Šūnu sagatavošana

10. Metodei *h-CLAT* izmanto cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līniju THP-1. Šūnas (TIB-202™) ir ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas.

11. THP-1 šūnas kultivē 37°C pie 5 % CO_2, mitrinātā atmosfērā, RPMI-1640 barotnē, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FBS*), 0,05 mM 2-merkaptoetanola, 100 vien./ml penicilīna un 100 μg/ml streptomicīna. No penicilīna un streptomicīna izmantošanas kultūras barotnē ir iespējams izvairīties. Tomēr tādā gadījumā lietotājiem jāpārliecinās, ka antibiotiku neesība kultūras barotnē neietekmē rezultātus, piem., veicot testu ar 1.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām. Jebkurā gadījumā, lai minimalizētu kontaminācijas risku, neatkarīgi no tā, vai šūnu kultūras barotnē ir antibiotikas vai to nav, jāievēro laba šūnu kultivēšanas prakse. THP-1 šūnas parasti uzsēj reizi 2–3 dienās blīvumā 0,1 līdz 0,2 × 10^6 šūnas/ml. To blīvums jāuztur diapazonā no 0,1 līdz 1,0 × 10^6 šūnas/ml. Pirms šūnu izmantošanas testēšanai tās jākvalificē, pārbaudot to reaģētspēju. Šūnu reaģētspēja jāpārbauda, izmantojot pozitīvās kontroles, 2,4-dinitrohlorbenzolu (DNHB) (*CAS* Nr. 97-00-7, ≥ 99 % tīrība) un niķeļa sulfātu ($NiSO_4$) (*CAS* Nr. 10101-97-0, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība), divas nedēļas pēc atkausēšanas. Gan DNHB, gan $NiSO_4$ būtu jāizraisa pozitīva atbildreakcija attiecībā uz abiem šūnu virsmas marķieriem — CD86 un CD54 —, un PS būtu attiecībā uz tiem abiem jāizraisa negatīva atbildreakcija. Testam izmanto tikai šūnas, kas reaģētspējas pārbaudi izturējušas. Šūnas var pavairot līdz diviem mēnešiem pēc atkausēšanas. Pasāžu skaitam nevajadzētu pārsniegt 30. Reaģētspējas pārbaude veicama saskaņā ar 20.–24. punktā aprakstītajām procedūrām.

12. Testēšanas vajadzībām THP-1 šūnas uzsēj vai nu blīvumā 0,1 × 10^6 šūnas/ml, vai 0,2 × 10^6 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 72 vai 48 stundas. Ir svarīgi, lai šūnu blīvums kultivēšanas kolbā tieši pēc priekškultivēšanas perioda visos eksperimentos būtu iespējami līdzīgs (izmantojot vienu vai abus iepriekš minētos priekškultivēšanas nosacījumus), jo šūnu blīvums kultivēšanas kolbā tieši pēc priekškultivēšanas var ietekmēt alergēnu inducēto CD86/CD54 ekspresiju (19). No kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas testēšanas dienā resuspendē svaigā kultūras barotnē blīvumā 2 × 10^6 šūnas/ml. Tad šūnas sadala vai nu 24 plakandibena iedobju platē (500 µl, 1 × 10^6 šūnas uz iedobi), vai 96 plakandibena iedobju platē (80 µl, 1,6 × 10^5 šūnas uz iedobi).

Devas noteikšanas tests

13. Lai noteiktu CV_{75}, kas ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja salīdzinājumā ar to dzīvotspēju šķīdinātāja/nesēja kontrolē ir 75 %, veic *devas noteikšanas testu*. CV_{75} izmanto tam, lai noteiktu testējamo ķimikāliju koncentrāciju CD86/CD54 ekspresijas mērījumam (sk. 20.–24. punktu).

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu sagatavošana

14. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Izmantojot metodi *h-CLAT*, testējamās ķimikālijas izšķīdina vai stabili disperģē (sk. arī 4. punktu) fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē, kas ir pirmais šķīdinātāja/nesēja variants, vai dimetilsulfoksīdā (DMSO, ≥ 99 % tīrība), kas ir otrais šķīdinātāja/nesēja variants, ja testējamā ķimikālija pirmajos divos šķīdinātājos/nesējos nešķīst vai neveido stabilu dispersiju, līdz galīgajai koncentrācijai 100 mg/ml (fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē) vai 500 mg/ml (DMSO). Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums, var izmantot citus šķīdinātājus/nesējus. Jāņem vērā testējamās ķimikālijas stabilitāte galīgajā šķīdinātāja/nesējā.

15. Testējamo ķimikāliju izejšķīdumus, kas ir 100 mg/ml (fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē) vai 500 mg/ml (DMSO), atšķaida šādi:

— ja šķīdinātājs/nesējs ir fizioloģiskais šķīdums vai barotne: sagatavo astoņus izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās), ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju izdarot sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu 2. Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 50 (tā iegūstot darba šķīdumus). Ja plates augstākā galīgā koncentrācija 1 000 µg/ml nav toksiska, maksimālā koncentrācija ar jaunu citotoksiskuma testu jānosaka vēlreiz. Ja testējamā ķimikālija fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē izšķīdusi vai stabili disperģēta, galīgajai koncentrācijai platē nevajadzētu pārsniegt 5 000 µg/ml;

— ja šķīdinātājs/nesējs ir DMSO: sagatavo astoņus izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās), ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju izdarot sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu 2. Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 250 (tā iegūstot darba šķīdumus). Galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 1 000 µg/ml, pat ja šī koncentrācija nav toksiska.

Visbeidzot darba šķīdumus izmanto ekspozīcijai, THP-1 šūnu suspensijai platē pievienojot tādu pašu tilpumdaudzumu darba šķīduma (sk. 17. punktu), tā iegūstot vēl vienu atšķaidījumu ar atšķaidījuma koeficientu 2 (galīgais koncentrāciju diapazons platē parasti ir 7,81–1 000 µg/ml).

16. *h-CLAT* par šķīdinātāja/nesēja kontroli izmanto kultūras barotni (testējamajām ķimikālijām, kas izšķīdinātas vai stabili disperģētas (sk. 4. punktu) barotnē vai fizioloģiskajā šķīdumā) vai DMSO (testējamajām ķimikālijām, kas izšķīdinātas vai stabili disperģētas DMSO), ko platē testē vienā galīgajā koncentrācijā — 0,2 %. To atšķaida tāpat, kā saskaņā ar 15. punktu atšķaida darba šķīdumus.

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

17. 15. un 16. punktā aprakstīto kultūras barotni vai darba šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar 24 plakandibena iedobju vai 96 plakandibena iedobju platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 12. punktu). Tad apstrādātās plates 24±0,5 stundas inkubē 37°C temperatūrā pie 5 % CO_2. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un testējamo ķimikāliju krusteniskās starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķimikālijām plati noslēdzot (20).

Iekrāsošana ar propīdija jodīdu (PI)

18. Pēc 24±0,5 ekspozīcijas stundām šūnas pārliek paraugu stobriņos un ievāc centrifugējot. Supernatantus nolej un atlikušās šūnas resuspendē 200 µl (96 iedobju plates gadījumā) vai 600 µl (24 iedobju plates gadījumā) fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma, kas satur 0,1 % liellopu seruma albumīna (iekrāsošanas buferšķīdums). 200 µl šūnu suspensijas pārnes uz 96 apaļdibena iedobju plati (ja paraugi ir no 96 iedobju plates) vai mikrostobriņu (ja paraugi ir no 24 iedobju plates) un divreiz noskalo ar 200 µl (96 iedobju plates gadījumā) vai 600 µl (24 iedobju plates gadījumā) iekrāsošanas buferšķīduma. Visbeidzot šūnas resuspendē iekrāsošanas buferšķīdumā (piem., 400 µl), kam pievieno PI šķīdumu (piem., 20 µl; galīgā PI koncentrācija var būt, piem., 0,625 µg/ml). Citus citotoksicitātes marķierus, piem., 7-aminoaktinomicīnu D (7-AAD), tripānzilo v. tml., var izmantot tad, ja iespējams pierādīt, ka alternatīvie iekrāsotāji dod līdzīgus rezultātus kā PI, piem., veicot testus ar 1.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām.

Citotoksiskuma mērīšana ar plūsmas citometriju un CV_{75} vērtības aplēšana

19. PI uzņemšanu analizē ar plūsmas citometriju, izmantojot ieguves kanālu FL-3. Kopā iegūst (izmēra) 10 000 dzīvu (PI-negatīvu) šūnu. Šūnu dzīvotspēju var aprēķināt ar citometra analīzes programmu, izmantojot nākamo vienādojumu. Ja šūnu dzīvotspēja ir maza, iegūst (izmēra) līdz 30 000 šūnu, ieskaitot nedzīvas šūnas. Alternatīva ir datus iegūt vienas minūtes laikā pēc analīzes sākšanas.

$$\textit{Šūnu dzīvotspēja} = \frac{\textit{Dzīvo šūnu skaits}}{\textit{Iegūto (izmērīto) šūnu kopskaits}} \times 100$$

CV_{75} vērtību (sk. 13. punktu), t. i., koncentrāciju, pie kuras izdzīvo 75 % THP-1 šūnu (25 % citotokscitāte), aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

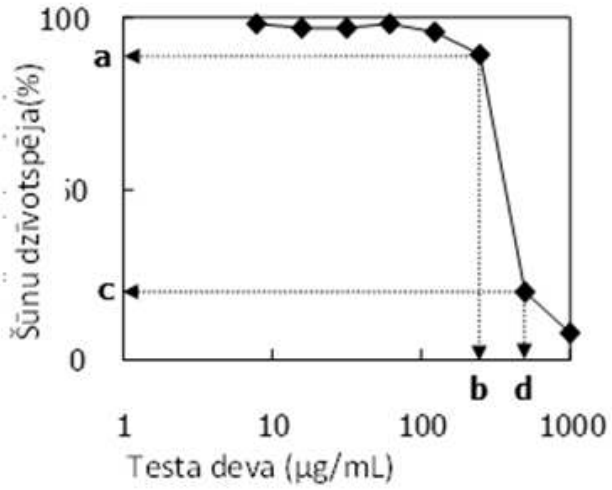
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

kur:

a ir minimālā vērtība šūnu dzīvotspējai virs 75 %;

c ir maksimālā vērtība šūnu dzīvotspējai zem 75 %;

b un d ir koncentrācijas, pie kurām šūnu dzīvotspēja ir attiecīgi a un c.



CV_{75} var noteikt arī citādi, ja vien pierāda (piem., testējot standartvielas), ka tas neietekmē rezultātus.

CD86/CD54 ekspresijas mērījums

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu sagatavošana

20. Testējamās ķimikālijas izšķīdina vai stabili disperģē piemērotā šķīdinātājā/nesējā (fizioloģiskajā šķīdumā, barotnē vai DMSO; sk. 14. punktu). Vispirms testējamās ķimikālijas atšķaida līdz koncentrācijai, kas atbilst simtkārtējai (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai piecsimtkārtējai (DMSO gadījumā) *devas noteikšanas testā* noteiktajai CV_{75} × 1,2 (sk. 19. punktu). Ja CV_{75} noteikt nav bijis iespējams (t. i., *devas noteikšanas testā* nav novērota pietiekama citotoksicitāte), par sākuma koncentrāciju izmanto augstāko koncentrāciju, kurā testējamā ķimikālija katrā šķīdinātājā/nesējā vēl šķīst vai stabili disperģējas. Jāņem vērā, ka galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 5 000 µg/ml (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 1 000 µg/ml (DMSO gadījumā). Tad sērijveida atšķaidījumos ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju (atšķaidījuma koeficients 1,2) iegūst izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās diapazonā no 100 × 1,2 × CV_{75} līdz 100 × 0,335 × CV_{75} (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai no 500 × 1,2 × CV_{75} līdz 500 × 0,335 × CV_{75} (DMSO gadījumā)), ko testēt ar metodi *h-CLAT* (dozēšanas shēmas piemēru sk. DB-ALM protokolā Nr. 158). Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 50 (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 250 (DMSO gadījumā), un tā iegūst darba šķīdumus. Iegūtos darba šķīdumus izmanto ekspozīcijai, platē vēl veicot pēdējo atšķaidījumu ar koeficientu 2. Ja rezultāti neatbilst 29. un 30. punktā aprakstītajiem pieņemamības kritērijiem, *devas noteikšanas testu* var atkārtot, lai CV_{75} noteiktu precīzāk. Jāņem vērā, ka CD86/CD54 ekspresijas mērījumam var izmantot tikai 24 iedobju plates.

21. Šķīdinātāja/nesēja kontroli sagatavo tā, kā aprakstīts 16. punktā. Metodē *h-CLAT* par pozitīvo kontroli izmanto DNHB (sk. 11. punktu), kura izejšķīdumus sagatavo DMSO un atšķaida tā, kā izejšķīdumu sagatavošana aprakstīta 20. punktā. Par pozitīvo kontroli *CD86/CD54 ekspresijas mērījumam* platē izmanto DNHB vienā galīgajā koncentrācijā (parasti 4,0 µg/ml). Lai platē DNHB būtu koncentrācijā 4,0 µg/ml, sagatavo 2 mg/ml DNHB izejšķīdumu DMSO un tad kultūras barotnē ar koeficientu 250 atšķaida līdz 8 µg/ml darba šķīdumam. Par pozitīvās kontroles koncentrāciju var izmantot arī DNHB CV_{75}, ko nosaka katrā testējošajā iestādē. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles. Pozitīvajām kontrolēm galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 5 000 µg/ml (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 1 000 µg/ml (DMSO gadījumā). Izpildes reižu pieņemamības kritēriji ir tādi paši kā testējamajai ķimikālijai (sk. 29. punktu), izņemot pēdējo pieņemamības kritēriju, jo pozitīvo kontroli testē tikai vienā koncentrācijā.

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

22. Lai iegūtu prognozi, katrai testējamajai ķimikālijai un kontroles vielai ir nepieciešams viens eksperiments. Katrs eksperiments sastāv no vismaz divām neatkarīgām *CD86/CD54 ekspresijas mērījuma* izpildes reizēm (sk. 26.–28. punktu). Katru neatkarīgo izpildes reizi izdara citā dienā vai tajā pašā dienā, ja attiecībā uz katru izpildes reizi izpildīti šādi nosacījumi: a) tiek neatkarīgi sagatavoti svaigi testējamās ķimikālijas un antivielu šķīdumu izejšķīdumi un darba šķīdumi un b) tiek izmantotas neatkarīgi ievāktas šūnas (t. i., šūnas ir ievāktas no dažādām kultivēšanas kolbām); tomēr šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas, kas sagatavotas kā darba šķīdumi (500 µl), samaisa ar 500 µl suspendētu šūnu (1 x 10^6 šūnas) attiecībā 1:1 un šūnas 24±0,5 stundas inkubē, kā aprakstīts 20. un 21. punktā. Katrā izpildes reizē pietiek ar vienu katras testējamās ķimikālijas un kontroles vielas koncentrācijas replikātu, jo prognozi iegūst vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs.

Šūnu iekrāsošana un analīze

23. Pēc 24±0,5 ekspozīcijas stundām šūnas no 24 iedobju plates pārvieto uz paraugu stobriņiem, ievāc centrifugējot un tad divreiz noskalo ar 1 ml iekrāsošanas buferšķīduma (ja nepieciešams, skalošanu var vēl atkārtot). Pēc skalošanas šūnas nobloķē ar 600 µl bloķēšanas šķīduma (iekrāsošanas buferšķīdums, kas satur 0,01 % (masa/tilp.) globulīna (Kona frakcija II, III, cilvēka; SIGMA, #G2388-10G vai līdzvērtīga)) un inkubē 15 min 4°C. Pēc bloķēšanas šūnas sadala trīs 180 µl alikvotās 96 apaļdibena iedobju platē vai mikrostobriņā.

24. Pēc centrifugēšanas šūnas 30 min iekrāso 4°C, izmantojot 50 µl ar FITC marķētu anti-CD86, anti-CD54 vai peļu IgG1 (izotips) antivielu. *h-CLAT* DB-ALM protokolā Nr. 158 (18) aprakstītās antivielas izmanto, tās attiecībā 3:25 (tilp./tilp.) (CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)) vai 3:50 (tilp./tilp.) (CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) un IgG1 (DAKO, #X0927)) atšķaidot ar iekrāsošanas buferšķīdumu. Pēc testa izstrādātāju atzinuma šie antivielu atšķaidījuma koeficienti nodrošina vislabāko signāla un trokšņa attiecību. Testa izstrādātāju pieredzē dažādu partiju antivielu

fluorescences intensitāte parasti ir līdzīga. Tomēr, lai noteiktu vispiemērotākās koncentrācijas, lietotāji var apsvērt iespēju antivielas titrēt konkrētās laboratorijas apstākļos. Ar citiem fluorohromiem marķētas anti-CD86 un/vai anti-CD-54 antivielas var izmantot, ja, piem., testējot 1.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tās dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC konjugētās antivielas. Jāpiezīmē, ka, mainot *h-CLAT* DB-ALM protokolā Nr. 158 (18) aprakstīto antivielu klonu vai piegādātāju, rezultāti var mainīties. Pēc vismaz divkārtējas noskalošanas ar 150 µl iekrāsošanas buferšķīduma šūnas resuspendē iekrāsošanas buferšķīdumā (piem., 400 µl) un tam pievieno PI šķīdumu (piem., 20 µl tā, lai galīgā koncentrācija būtu 0,625 µl/ml) vai cita citotoksicitātes marķiera šķīdumu (sk. 18. punktu). CD86 un CD54 ekspresijas līmeņus un šūnu dzīvotspēju analizē ar plūsmas citometriju.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

25. CD86 un CD54 ekspresiju analizē ar plūsmas citometriju, izmantojot ieguves kanālu FL-1. Balstoties uz ģeometrisko vidējo fluorescences intensitāti (VFI), CD86 un CD54 relatīvo fluorescences intensitāti (RFI) pozitīvās kontroles (ctrl) šūnām un ar ķimikāliju apstrādātajām šūnām aprēķina ar šādu vienādojumu:

$$RFI = \frac{ar\ ķimikālijām\ apstrādāto\ šūnu\ VFI - ar\ ķimikālijām\ apstrādāto\ izotopu\ kontrolšūnu\ VFI}{ar\ šķīdin./nesēju\ apstr.\ kontrolš.\ VFI - ar\ šķīdin./nesēju\ apstr.\ izotopu\ kontrolšūnu\ VFI} \times 100$$

Ar 19. punktā norādīto vienādojumu aprēķina arī izotipa kontroles (ctrl) šūnu (šūnas, kas iekrāsotas ar peļu IgG1 (izotips) antivielām) dzīvotspēju.

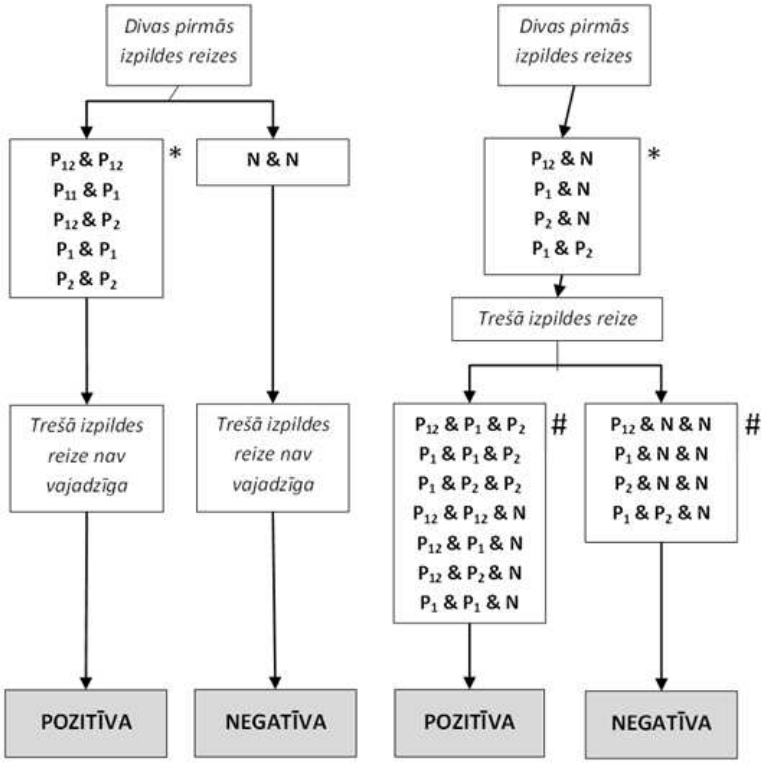
Prognozes modelis

26. Lai iegūtu vienu prognozi (POZITĪVU vai NEGATĪVU), *CD86/CD54* ekspresijas mērījumam katru testējamo ķimikāliju testē vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs. Uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA, ja vismaz 2 no 2 vai vismaz 2 no 3 neatkarīgām izpildes reizēm ir izpildīti šādi nosacījumi; pretējā gadījumā *h-CLAT* prognozi uzskata par NEGATĪVU (1. attēls):

— CD86 RFI jebkurā testētajā koncentrācijā ir vismaz 150 % (ar šūnu dzīvotspēju ≥ 50 %);

— CD54 RFI jebkurā testētajā koncentrācijā ir vismaz 200 % (ar šūnu dzīvotspēju ≥ 50 %).

27. Tātad, ja pirmās divas izpildes reizes abas dod pozitīvu rezultātu attiecībā uz CD86 un/vai abas dod pozitīvu rezultātu attiecībā uz CD54, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA un trešā izpildes reize nav vajadzīga. Līdzīgā kārtā, ja pirmās divas izpildes reizes attiecībā uz abiem marķieriem ir negatīvas, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir NEGATĪVA (pienācīgi ņemot vērā 30. punktā noteikto) un trešā izpildes reize nav vajadzīga. Savukārt, ja pirmās divas izpildes reizes attiecībā uz vismaz vienu no marķieriem (CD54 vai CD86) nesakrīt, ir vajadzīga trešā izpildes reize, un tad galīgo prognozi nosaka pēc tā, kuru rezultātu pārsvars novērojams trīs atsevišķajās izpildes reizēs (proti, 2 no 3). Šajā aspektā jāņem vērā, ka, ja ir divas neatkarīgas izpildes reizes un viena ir pozitīva tikai attiecībā uz CD86 (turpmāk "P_1") un otra ir pozitīva tikai attiecībā uz CD54 (turpmāk "P_2"), ir vajadzīga trešā izpildes reize. Ja trešā izpildes reize ir negatīva attiecībā uz abiem marķieriem (turpmāk "N"), uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir NEGATĪVA. Savukārt, ja trešā izpildes reize attiecībā uz vienu no marķieriem (P_1 vai P_2) vai tiem abiem (turpmāk "P_{12}") ir pozitīva, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA.



1. attēls. Metodē *h-CLAT* izmantotais prognozes modelis. *h-CLAT* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem.

P_1: izpildes reize, kas ir pozitīva tikai attiecībā uz CD86; P_2; izpildes reize, kas ir pozitīva tikai attiecībā uz CD54; P_{12}: izpildes reize, kas ir pozitīva gan attiecībā uz CD86, gan CD54; N: izpildes reize, kas nav pozitīva ne attiecībā uz CD86, ne CD54.

* Lodziņos redzamas relevantās pirmo divu izpildes reižu rezultātu kombinācijas neatkarīgi no tā, kādā kārtībā šie rezultāti iegūti.

Lodziņos redzamas relevantās trīs izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo divu izpildes reižu rezultāti; ir vienalga, kādā kārtībā šie rezultāti iegūti.

28. Testējamajām ķimikālijām, attiecībā uz kurām ar *h-CLAT* iegūtā prognoze ir POZITĪVA, var izvēlēties noteikt divas efektīvās koncentrācijas vērtības, EC_{150} marķierim CD86 un EC_{200} marķierim CD54, t. i., koncentrācijas, kurās testējamo ķimikāliju inducētā RFI ir 150 vai 200. Izmantotas integrētā pieejā, piem., *IATA* (4) (5) (6) (7) (8), šīs efektīvās koncentrācijas vērtības var palīdzēt novērtēt sensibilizācijas potenci (9). Tās var aprēķināt ar šādiem vienādojumiem:

$$EC150\ (CD86) = B_{konc.} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

$$EC200\ (CD86) = B_{konc.} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

kur

$A_{konc.}$ ir zemākā koncentrācija, izteikta µg/ml, kurā RFI > 150 (CD86) vai 200 (CD54);

$B_{konc.}$ ir augstākā koncentrācija, izteikta µg/ml, kurā RFI < 150 (CD86) vai 200 (CD54);

A_{RFI} ir RFI zemākajā koncentrācijā, kurā RFI > 150 (CD86) vai 200 (CD54);

B_{RFI} ir RFI augstākajā koncentrācijā, kurā RFI < 150 (CD86) vai 200 (CD54).

Lai EC_{150} un EC_{200} vērtības noteiktu precīzāk, var būt vajadzīgas trīs neatkarīgas *CD86/CD54 ekspresijas mērījuma* izpildes reizes. Galīgās EC_{150} un EC_{200} nosaka kā trīs neatkarīgo izpildes reižu efektīvo koncentrāciju medianālo vērtību. Ja pozitivitātes kritērijiem (sk. 26.–27. punktu) atbilst tikai divas no trim neatkarīgajām izpildes reizēm, no divām aprēķinātajām vērtībām pieņem augstāko EC_{150} vai EC_{200}.

Pieņemamības kritēriji

29. Izmantojot metodi *h-CLAT*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem (22) (27).

— Šūnu dzīvotspējai barotnē un šķīdinātāja/nesēja kontrolē jābūt lielākai nekā 90 %.

— Šķīdinātāja/nesēja kontrolē ne CD86, ne CD54 RFI vērtības nedrīkst pārsniegt pozitivitātes kritērijus (CD86 RFI ≥ 150 % un CD54 RFI ≥ 200 %). Šķīdinātāja/nesēja kontroles RFI vērtības aprēķina ar 25. punktā norādīto formulu ("ķimikālijas VFI" aizstājot ar "šķīdinātāja/nesēja VFI" un "šķīdinātāja/nesēja VFI" aizstājot ar "(barotnes) kontroles VFI").

— Gan barotnes, gan šķīdinātāja/nesēja kontroles CD86 un CD54 (abu divu) VFI attiecībai pret izotipa kontroles VFI jābūt > 105 %.

— Pozitīvās kontroles (DNHB) CD86 un CD54 VFI vērtībām jāatbilst pozitivitātes kritērijiem (CD86 RFI ≥ 150 un CD54 RFI ≥ 200), un šūnu dzīvotspējai jāpārsniedz 50 %.

— Testējamās ķimikālijas gadījumā šūnu dzīvotspējai katrā izpildes reizē jāpārsniedz 50 % vismaz četrās testētajās koncentrācijās.

30. Negatīvi rezultāti ir pieņemami tikai attiecībā uz testējamajām ķimikālijām, kuru gadījumā šūnu dzīvotspēja augstākajā testētajā koncentrācijā (piem., 1,2 × CV_{75} saskaņā ar 20. punktā aprakstīto sērijveida atšķaidīšanas shēmu) nesasniedz 90 %. Ja šūnu dzīvotspēja koncentrācijā 1,2 × CV_{75} ir vienāda ar vai lielāka par 90 %, negatīvo rezultātu atmet. Tādā gadījumā ir ieteicams mēģināt devu izvēli vēl precizēt, CV_{75} noteikšanu atkārtojot. Jāņem vērā, ka gadījumos, kad testējamās ķimikālijas maksimālā testējamā koncentrācija ir 5 000 µg/ml fizioloģiskajā šķīdumā (vai barotnē, vai citos šķīdinātājos/nesējos), 1 000 µg/ml DMSO vai augstākā koncentrācija, kurā tā vēl šķīst, negatīvs rezultāts ir pieņemams pat tad, ja šūnu dzīvotspēja pārsniedz 90 %.

Testēšanas pārskats

31. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta vielas

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, Log K_{ow}, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, Log K_{ow}, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā un šķīdinātāja/nesēja kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā un ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Ja tiek izmantoti citi (testēšanas vadlīnijā neminēti) šķīdinātāji/nesēji: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotā testa apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)

— Izmantotais plūsmas citometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotais globulīns, antivielas un citotoksicitātes marķieris

— Procedūra, ar kādu, testējot standartvielas, pierādīta laboratorijas kompetence šā testa izpildē, un procedūra, ar kādu pierādīta šā testa rezultātu reproducējamība laika griezumā, piem., vēsturiskie kontroļu dati un/vai vēsturiskie reaģētspējas pārbaužu dati

Testa pieņemamības kritēriji

— Ar šķīdinātāja/nesēja kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas, VFI un RFI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Ar pozitīvo kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un RFI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Šūnu dzīvotspēja visās testētajās testētās ķimikālijas koncentrācijās

Testa procedūra

— Izmantotais izpildes reižu skaits

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšana un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētā)

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

— Tabulā apkopoti dati, tostarp CV_{75} (attiecīgā gadījumā), individuālās ģeometriskās VFI, RFI, šūnu dzīvotspējas vērtības, EC_{150}/EC_{200} (attiecīgā gadījumā), kas katrā izpildes reizē iegūtas attiecībā uz testējamo ķimikāliju un pozitīvo kontroli, un norāde uz testējamās ķimikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli

— Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

— Ar metodi *h-CLAT* iegūto rezultātu iztirzājums

— Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājumi

LITERATŪRA

(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. Accessible at: 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). Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: 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. Available at: 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. Available at: 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.

1.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (21).

***AOP* (nelabvēlīga iznākuma ceļš)**: no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (22).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV_{75}: aplēstā koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja ir 75 %.

EC_{150}: koncentrācijas, pie kurām RFI vērtības CD86 ekspresijā ir 150.

EC_{200}: koncentrācijas, pie kurām RFI vērtības CD54 ekspresijā ir 200.

Plūsmas citometrija: citometrijas paņēmiens, kurā fluīdā suspendētas šūnas pa vienai laiž caur fokusētu ierosinošu gaismu, kura izkliedējas šūnām un to sastāvdaļām specifiskos rakstos; šūnas nereti tiek marķētas ar fluorescējošiem marķieriem tā, ka tās gaismu vispirms absorbē un tad emitē mainītā frekvencē.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja)**: strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku selektīvu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Barotnes kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relatīvā fluorescences intensitāte (RFI): ģeometriskās vidējās fluorescences intensitātes (VFI) relatīvās vērtības ar ķimikāliju apstrādātās šūnās salīdzinājumā ar VFI ar šķīdinātāju/nesēju apstrādātās šūnās.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (21).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reprodu cējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reprodu cējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (21).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (21).

Iekrāsošanas buferšķīdums: fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas satur 0,1 % liellopu seruma albumīna.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (21).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo metodi.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar ko tiek sniegta informācija par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, tā aizsargājot cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (23).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīgs tests: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam (21).

1.2. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot paredzamo *h-CLAT* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot CV_{75}, EC_{150} un EC_{200} vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar metodi *h-CLAT* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar metodi *h-CLAT* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par metodi *h-CLAT* ir pieejami arī publicēti references dati (3) (14).

1. tabula.

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot metodi *h-CLAT*

Standartvielas	CAS Nr.	Agregātstāvoklis	*In vivo* prognoze (1)	CV_{75} references diapazons µg/ml (2)	*h-CLAT* rezultāts attiecībā uz CD86 (EC_{150} references diapazons µg/ml) (2)	*h-CLAT* rezultāts attiecībā uz CD54 (EC_{200} references diapazons µg/ml) (2)
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	ciets	sensibilizators (ļoti spēcīgs)	2–12	pozitīvs (0,5–10)	pozitīvs (0,5–15)
4-fenilēndiamīns	106-50-3	ciets	sensibilizators (spēcīgs)	5–95	pozitīvs (< 40)	negatīvs (> 1,5) (3)
niķeļa sulfāts	10101-97-0	ciets	sensibilizators (vidējs)	30–500	pozitīvs (< 100)	pozitīvs (10–100)
2-merkaptobenztiazols	149-30-4	ciets	sensibilizators (vidējs)	30–400	negatīvs (> 10) (3)	pozitīvs (10–140)
R(+)-limonēns	5989-27-5	šķidrs	sensibilizators (vājš)	> 20	negatīvs (> 5) (3)	pozitīvs (< 250)
urīnvielas imidazolidinils	39236-46-9	ciets	sensibilizators (vājš)	25–100	pozitīvs (20–90)	pozitīvs (20–75)
izopropanols	67-63-0	šķidrs	nav sensibilizators	> 5 000	negatīvs (> 5 000)	negatīvs (> 5 000)
glicerīns	56-81-5	šķidrs	nav sensibilizators	> 5 000	negatīvs (> 5 000)	negatīvs (> 5 000)
pienskābe	50-21-5	šķidrs	nav sensibilizators	1 500—5 - 000	negatīvs (> 5 000)	negatīvs (> 5 000)
4-aminobenzoskābe	150-13-0	ciets	nav sensibilizators	> 1 000	negatīvs (> 1 000)	negatīvs (> 1 000)

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

(1) *In vivo* bīstamības (un potences) prognoze ir balstīta uz *LLNA* datiem (3) (14). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (24).

(2) Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (13) (25).

(3) Vēsturiski attiecībā uz šo marķieri gūti galvenokārt negatīvi rezultāti, tāpēc principā gaidāms negatīvs rezultāts. Sniegtā diapazona pamatā ir daži vēsturiski novērotie pozitīvie rezultāti. Ja tiek iegūts pozitīvs rezultāts, efektīvās koncentrācijas vērtībai jābūt ziņotajā references diapazonā.

2. papildinājums

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: ŠŪNU LĪNIJAS U937 AKTIVĀCIJAS TESTS (*U-SENS™*)

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. Tests *U-SENS™* kvantificē izmaiņas tāda šūnu virsmas marķiera ekspresijā, kas asociēts ar monocītu un dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju (konkrētāk, CD86), cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līnijā U937 pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1). Pēc tam izmērītos CD86 šūnu virsmas marķieru ekspresijas līmeņus šūnu līnijā U937 izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.

2. Tests *U-SENS™* ir izvērtēts validācijas pētījumā (2), ko koordinēja uzņēmums *L'Oreal*, un pēc tam to neatkarīgi profesionālizvērtējusi Eiropas Savienības References laboratorijas dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā (*EURL ECVAM*) Zinātniskā konsultatīvā komiteja (*ESAC*) (3). Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, *EURL ECVAM* ir ieteikusi (4) *U-SENS™* izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Savā norādījumu dokumentā par ziņošanu par strukturētām pieejām datu integrācijai un individuāliem informācijas avotiem, ko izmanto ādas sensibilizācijas *IATA* ietvaros, ESAO aplūko vairākas gadījumu analīzes, kurās aprakstītas dažādas testēšanas stratēģijas un prognožu modeļi. Vienai no dažādajām definētajām pieejām pamatā ir *U-SENS* tests (5). Piemēri, kā *U-SENS™* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, arī vēsturiskajiem datiem un esošiem derīgiem datiem par cilvēku (6), ir pieejami arī citur literatūrā (4) (5) (7).

3. Ir pierādīts, ka tests *U-SENS™* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar paņēmieniem, kuros izmanto šūnu kultūras, un ar plūsmcitometrisko analīzi. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šā testa, ir aptuveni 90 % tajā pašā laboratorijā un 84 % citās laboratorijās (8). Validācijas pētījuma rezultāti (8) un citi publicētie pētījumi (1) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem šā testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem ir 86 % (N=166) ar jutību 91 % (118/129) un specifiskumu 65 % (24/37). Salīdzinājumā ar rezultātiem, kas iegūti testos ar cilvēkiem, testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem ir 77 % (N=101) ar jutību 100 % (58/58) un specifiskumu 47 % (20/43). Salīdzinājumā ar *LLNA* testā *U-SENS™* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķimikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.B apakškategorija), nevis ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.A apakškategorija) (1) (8) (9). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka tests *U-SENS™* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas var izraisīt ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *U-SENS™* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka testu *U-SENS™* var izmantot testējamām ķimikālijām (arī kosmētikas līdzekļu sastāvdaļām, piem., konservantiem, virsmaktīvajiem aģentiem, aktīvajiem aģentiem, krāsām), kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, fizikālķīmiskās īpašības, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un plašs tādu reakcijas mehānismu spektrs, par kuriem zināms, ka tie asociēti ar ādas sensibilizāciju (t. i., Maikla akceptora mehānisms, Šifa bāzu veidošanās, acilgrupas pārneses aģenta (acilpārneses aģenta) mehānisms, bimolekulārā nukleofilā aizvietošana [SN2] vai aromātiskā nukleofilā aizvietošana[SNAr]) (1) (8) (9) (10). Tests *U-SENS™* ir izmantojams testējamajām ķimikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķimikālija nenosēžas vai neatdalās no šķīdinātāja/nesēja dažādās fāzēs) piemērotā šķīdinātājā/nesējā (sk. 13. punktu). Ar *U-SENS™* izdevies iegūt pareizas prognozes attiecībā uz ķimikālijām, kas ziņotajā datu kopā norādītas kā prehaptēni (t. i., ar oksidāciju aktivētas vielas) vai prohaptēni (t. i., vielas, kam vajadzīga fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) (1) (10). Sakarā ar nespecifisku CD86 ekspresijas

palielinājumu pseidopozitīvus rezultātus var uzrādīt vielas, kas izraisa membrānu bojājumus, jo 3 no 7 pseidopozitīvajiem rezultātiem (salīdzinājumā ar *in vivo* references klasifikāciju) deva virsmaktīvi aģenti (1). Tātad pozitīvi rezultāti, kas iegūti, testējot virsmaktīvus aģentus, jāvērtē piesardzīgi, savukārt attiecīgus negatīvus rezultātus tomēr var izmantot par palīglīdzekli testējamās ķimikālijas atzīšanā par nesensibilizatoru. Ar *U-SENS™* var vērtēt fluorescējošas testējamās ķimikālijas (1), tomēr ļoti fluorescējošas testējamās ķimikālijas, kuru starojuma viļņa garums ir tāds pats kā fluoresceīna izotiocianātam (FITC) vai propīdija jodīdam (PI), traucē detektēšanu ar plūsmas citometriju, tāpēc ar FITC konjugētām antivielām (potenciāli pseidonegatīvi rezultāti) vai PI (nav izmērāma dzīvotspēja) tās nevar izvērtēt pareizi. Tādā gadījumā var izmantot ar citiem fluorohromiem marķētas antivielas vai citus citotoksicitātes marķierus, ja vien, testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tie dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC marķētās antivielas vai PI (sk. 18. punktu). Ņemot vērā iepriekš minēto, pozitīvi rezultāti, kas iegūti ar virsmaktīviem aģentiem, un negatīvi rezultāti, kas iegūti ar ļoti fluorescējošām testējamajām ķimikālijām, jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem *IATA* satvarā. Gadījumos, kad ir liecības, ka tests *U-SENS™* nav izmantojams vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

5. Kā norādīts iepriekš, tests *U-SENS™* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Integrētā pieejā, piem., *IATA*, tas var palīdzēt novērtēt arī sensibilizācijas potenci. Tomēr, lai noteiktu, kā *U-SENS™* rezultāti varētu palīdzēt novērtēt potenci, jāiegulda papildu darbs, kura pamatā vēlams būt datiem par cilvēku.

6. Definīcijas ir sniegtas 2.1. papildinājumā.

Testa Princips

7. Tests *U-SENS™* ir *in vitro* tests, kas kvantificē izmaiņas šūnu virsmas marķiera CD86 ekspresijā cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līnijā U937 45±3 stundas pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Virsmas marķieris CD86 ir tipisks U937 aktivācijas marķieris. Ir zināms, ka CD86 ir līdzstimulējoša molekula, kura var atdarināt monocītisko aktivāciju, kam ir svarīga nozīme T šūnu praimingā. Izmaiņas CD86 šūnu virsmas marķiera ekspresijā mēra ar plūsmas citometriju pēc šūnu iekrāsošanas, parasti ar antivielām, kas marķētas ar fluoresceīna izotiocianātu (FITC). Paralēli izdara arī citotoksiskuma mērījumu (piem., ar PI), lai noteiktu, vai CD86 šūnu virsmas marķiera ekspresijas aktivācija ir novērojama arī pie subcitotoksiskām koncentrācijām. Lai palīdzētu nošķirt sensibilizatorus no nesensibilizatoriem, aprēķina un prognozes modelī (sk. 19. punktu) izmanto CD86 šūnu virsmas marķiera stimulācijas indeksu (SI) salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesēja kontroles stimulācijas indeksu.

Kompetences Pierādīšana

8. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām, ievērojot labu *in vitro* metožu praksi (11), jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 2.2. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 11. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 15.–16. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliecinās, ka laika gaitā testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

9. Šis tests ir balstīts uz *U-SENS™* dzīvniekeksperimentiem alternatīvu metožu datubāzes pakalpojuma (*DB-ALM*) protokolu Nr. 183 (12). Testu *U-SENS™* ieviešot un izmantojot laboratorijā, jāizmanto darba standartprocedūras (*SOP*). Automatizētu *U-SENS™* izpildes sistēmu var izmantot tad, ja, piem., testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tā dod līdzīgus rezultātus. Tālāk sniegts galveno testa *U-SENS™* komponentu un procedūru apraksts.

Šūnu sagatavošana

10. Testam *U-SENS™* izmanto cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līniju U937 (13). Šūnas (klons CRL1593.2) ir ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas.

11. U937 šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO_2, mitrinātā atmosfērā, RPMI-1 640 barotnē, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FCS*), 2 mM L-glutamīna, 100 vienībām/ml penicilīna un 100 µg/ml streptomicīna (pilnīga barotne). U937 šūnas parasti pārsēj reizi 2–3 dienās blīvumā 1,5 vai 3 × 10^5 šūnas/ml. Šūnu blīvumam nevajadzētu pārsniegt 2 × 10^6 šūnas/ml, un šūnu dzīvotspējai, kas izmērīta ar tripānzilo uzņēmušo šūnu izslēgšanu, vajadzētu būt ≥ 90 % (neizmantot pirmajai pasāžai pēc atkausēšanas). Pirms izmantošanas testēšanai katra šūnu, *FCS* vai antivielu partija jākvalificē, pārbaudot tās reaģētspēju. Šūnu reaģētspēja jāpārbauda, izmantojot pozitīvo kontroli, pikrilsulfonskābi (2,4,6-trinitrobenzolsulfonskābe: TNBS) (*CAS* Nr.: 2508-19-2, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība), vismaz nedēļu pēc atkausēšanas. Pārbaudot šūnu reaģētspēju, katrai no abām kontrolēm jātestē sešas galīgās koncentrācijas (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml un PS: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). Pilnīgā barotnē izšķīdinātai TNBS jāizsauc pozitīva koncentrācijatkarīga CD86 atbildreakcija (kurā, piem., nākamā lielākā koncentrācija aiz koncentrācijas, kas izsauc pozitīvu atbildreakciju, CD86 SI ≥ 150, dod lielāku CD86 SI), bet pilnīgā barotnē izšķīdinātai PS jāizsauc negatīva CD86 atbildreakcija (sk. 21. punktu). Testam izmanto tikai tās šūnu partijas, kas divas reizes izturējušas reaģētspējas pārbaudi. Šūnas var pavairot līdz septiņām nedēļām pēc atkausēšanas. Pasāžu skaitam nevajadzētu pārsniegt 21. Reaģētspējas pārbaude veicama saskaņā ar 18.–22. punktā aprakstītajām procedūrām.

12. Testēšanas vajadzībām U937 šūnas uzsēj vai nu blīvumā 3 × 10^5 šūnas/ml, vai 6 × 10^5 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 2 vai 1 dienu. Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums un var pierādīt (piem., testējot 2.2. papildinājuma standartvielas), ka tas dod līdzīgus rezultātus, nupat aprakstīto priekškultivēšanas apstākļu vietā var izmantot citus. No kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas testēšanas dienā resuspendē svaigā kultūras barotnē blīvumā 5 × 10^5 šūnas/ml. Tad šūnas sadala 96 plakandibena iedobju platē, izmantojot 100 µl (galīgais šūnu blīvums: 0,5 × 10^5 šūnas uz iedobi).

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu sagatavošana

13. Pirms testēšanas novērtē šķīdību. Šajā nolūkā testējamās ķimikālijas koncentrācijā 50 mg/ml izšķīdina vai stabili disperģē pilnīgā barotnē, kas ir pirmais šķīdinātāja variants, vai, ja testējamā ķimikālijā pilnīgās barotnes šķīdinātājā/nesējā nešķīst, dimetilsulfoksīdā (DMSO, ≥ 99 % tīrība), kas ir otrais šķīdinātāja/nesēja variants. Ja ķimikālija šķīdinātājā/nesējā šķīst, tad, lai veiktu testēšanu, testējamo ķimikāliju pilnīgā barotnē izšķīdina līdz galīgajai koncentrācijai 0,4 mg/ml. Ja ķimikālija šķīst tikai DMSO, to izšķīdina līdz koncentrācijai 50 mg/ml. Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums, var izmantot citus šķīdinātājus/nesējus. Jāņem vērā testējamās ķimikālijas stabilitāte galīgajā šķīdinātājā/nesējā.

14. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Tā kā netiek veikts devas noteikšanas tests, pirmajā izpildes reizē jātestē ķimikālijas šķīdums attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā (vai nu pilnīgā barotnē, vai 0,4 % DMSO šķīduma barotnē) 6 galīgajās koncentrācijās (1, 10, 20, 50, 100 un 200 µg/ml). Nākamajās izpildes reizēs ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju sagatavo vismaz 4 testējamās ķimikālijas darba šķīdumus (t. i., vismaz 4 koncentrācijas) — sākot ar 0,4 mg/ml pilnīgā barotnē vai 50 mg/ml DMSO. Beigās darba šķīdumus izmanto apstrādei, platē esošajam darba šķīdumam pievienojot tādu pašu tilpumdaudzumu U937 šūnu suspensijas (sk. 11. punktu) un tādējādi panākot vēl vienu atšķaidījumu ar atšķaidījuma koeficientu 2 (12). Koncentrācijas (vismaz 4 koncentrācijas) nākamajām izpildes reizēm izvēlas atkarībā no katras iepriekšējās izpildes reizes rezultātiem (8). Izmantojamās galīgās koncentrācijas ir 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 un 200 µg/ml. Maksimālā galīgā koncentrācija ir 200 µg/ml. Ja pie 1 µg/ml konstatē pozitīvu CD86 vērtību, tad izvērtē 0,1 µg/ml, lai noskaidrotu, kādā koncentrācijā testējamā ķimikālija neinducē CD86 atbildreakciju virs pozitīvās atbildreakcijas sliekšņa. Katrā izpildes reizē, kurā tiek novērota pozitīva CD86 atbildreakcija uz attiecīgo koncentrāciju, aprēķina EC_{150} (koncentrāciju, pie kuras ķimikālija sasniedz pozitīvās CD86 atbildreakcijas slieksni

150 %; sk. 19. punktu). Ja testējamā ķimikālija inducē pozitīvu CD86 atbildreakciju neatkarīgi no koncentrācijas, aprēķināt EC_{150} var nebūt relevanti, kā aprakstīts *U-SENS™* DB-ALM protokolā Nr. 183 (12). Katrā izpildes reizē, ja iespējams, aprēķina CV_{70} (koncentrāciju, pie kuras ķimikālija sasniedz citotoksiskuma slieksni 70 %, sk. 19. punktu) (12). Lai noskaidrotu, kā koncentrācija ietekmē CD86 atbildreakcijas palielinājumu, visas koncentrācijas no izmantojamo koncentrāciju vidus jāizvēlas regulāros atstatumos diapazonā no EC_{150} (vai lielākā necitotoksiskā koncentrācija, pie kuras CD86 atbildreakcija ir negatīva) un CV_{70} (vai lielākā atļautā koncentrācija, t. i., 200 µg/ml). Vienā izpildes reizē jātestē vismaz 4 koncentrācijas, no kurām vismaz 2 jābūt tādām pašām kā iepriekšējā reizē vai reizēs, lai būtu iespējams rezultātus salīdzināt.

15. Par šķīdinātāja/nesēja kontroli testā *U-SENS™* izmanto pilnīgu barotni (pilnīgā barotnē izšķīdinātām vai stabili disperģētām testējamajām ķimikālijām) (sk. 4. punktu) vai 0,4 % DMSO šķīdumu pilnīgā barotnē (DMSO izšķīdinātām vai stabili disperģētām testējamajām ķimikālijām).

16. Par pozitīvo kontroli testā *U-SENS™* izmanto TNBS (sk. 11. punktu), kas sagatavota pilnīgā barotnē. TNBS izmantojama par pozitīvo kontroli CD86 ekspresijas mērījumam tādā vienā galīgajā koncentrācijā platē (50 µg/ml), pie kuras šūnu dzīvotspēja ir > 70 %. Lai platē TNBS būtu koncentrācijā 50 µg/ml, sagatavo 1 M (t. i., 293 mg/ml) TNBS izejšķīdumu pilnīgā barotnē un tad, izmantojot pilnīgu barotni ar koeficientu 2 930 atšķaida līdz 100 µg/ml darba šķīdumam. Par negatīvo kontroli izmanto pienskābi (PS, *CAS* Nr. 50-21-5), kas koncentrācijā 200 µg/ml izšķīdināta pilnīgā barotnē (no 0,4 mg/ml izejšķīduma). Katrā izpildes reizē katrā platē sagatavo trīs replikātus ar neapstrādātu pilnīgas barotnes kontroli, šķīdinātāja/nesēja kontroli, negatīvo un pozitīvo kontroli (12). Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles. Izpildes reižu pieņemamības kritēriji ir tādi paši kā testējamajai ķimikālijai (sk. 12. punktu).

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

17. 14.–16. punktā aprakstīto šķīdinātāja/nesēja kontroli vai darba šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar 96 plakandibena iedobju platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 12. punktu). Tad apstrādātās plates 45±3 stundas inkubē 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2. Lai izvairītos no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un ar testējamajām ķimikālijām apstrādāto šūnu starpiedobju kontaminācijas, plates pirms inkubēšanas noslēdz ar puscaurlaidīgu membrānu (12).

Šūnu iekrāsošana

18. Pēc 45±3 ekspozīcijas stundām šūnas pārliek mikrotitrēšanas platē ar V veida iedobēm un ievāc centrifugējot. Uzskata, ka novērojama ar šķīdību saistīta interference, ja 45 ± 3 stundas pēc apstrādes (pirms šūnu iekrāsošanas) zem mikroskopa novērojami kristāli vai pilieni. Supernatantus nolej un atlikušās šūnas vienreiz noskalo ar 100 µl ledusauksta fosfātu buferšķīduma (FBS), kas satur 5 % liellopu embriju seruma (iekrāsošanas buferšķīdums). Pēc centrifugēšanas šūnas resuspendē, izmantojot 100 µl iekrāsošanas buferšķīduma, un 4 °C 30 min iekrāso ar 5 µl (piem., 0,25 µl) ar FITC marķētu anti-CD86 antivielu vai peļu IgG1 (izotips) antivielu, sargājot no gaismas. Izmanto *U-SENS™* DB-ALM protokolā Nr. 183 (12) aprakstītās antivielas (CD86: BD-PharMingen #555657, klons: Fun-1, vai Caltag/Invitrogen #MHCD8601, klons: BU63; IgG1: BD-PharMingen #555748 vai Caltag/Invitrogen #GM4992). Testa izstrādātāju pieredzē dažādu partiju antivielu fluorescences intensitāte parasti ir līdzīga. Ja tie izturējuši reaģētspējas pārbaudi, testā var izmantot citus klonus vai antivielu piegādātājus (sk. 11. punktu). Tomēr, lai noteiktu vispiemērotāko koncentrāciju, lietotāji var apsvērt iespēju antivielas titrēt konkrētās laboratorijas apstākļos. Citas detektēšanas sistēmas, piem., ar fluorohromiem marķētas anti-CD86 antivielas, var izmantot, ja, piem., testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tās dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC konjugētās

antivielas. Šūnas divreiz noskalo ar 100 µl iekrāsošanas buferšķīduma un vienreiz ar 100 µl ledusauksta FBS un tad resuspendē ledusaukstā FBS (piem., 125 µl paraugiem, ko analizē manuāli pa stobriņam, vai 50 µl autosamplera plates gadījumā), kam pievieno PI šķīdumu (galīgā koncentrācija: 3 µl/ml). Citus citotoksicitātes marķierus, piem., 7-aminoaktinomicīnu D (7-AAD) vai tripānzilo, var izmantot tad, ja iespējams pierādīt, ka alternatīvie iekrāsotāji dod līdzīgus rezultātus kā PI, piem., veicot testus ar 2.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām.

Analīze ar plūsmas citometriju jeb plūsmcitometriskā analīze

19. CD86 ekspresijas līmeni un šūnu dzīvotspēju analizē ar plūsmas citometriju. Šūnas pēc lieluma (*FSC*) un granularitātes (*SSC*) attēlo logaritmiskā punktdiagrammā, lai skaidri noteiktu pirmā vārtojuma [*gate*] R1 populāciju un izslēgtu šūnu atliekas. Mērķis ir katrai iedobei vārtojumā R1 iegūt 10 000 šūnu. Šūnas no tā paša vārtojuma R1 attēlo FL3 vai FL4/SSC punktdiagrammā. Dzīvotspējīgas šūnas nošķir ar vēl vieniem vārtiem — R2 —, ar ko atlasa to šūnu populāciju, kuru reakcija uz propīdija jodīdu ir negatīva (kanāls FL3 vai FL4). Šūnu dzīvotspēju var aprēķināt ar citometra analīzes programmu, izmantojot nākamo vienādojumu. Ja šūnu dzīvotspēja ir maza, iegūst līdz 20 000 šūnu, ieskaitot nedzīvas šūnas. Alternatīva ir datus iegūt vienas minūtes laikā pēc analīzes sākšanas.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Pēc tam izmēra, kāda procentuālā daļa šo pēc R2 vārtoto dzīvotspējīgo šūnu (vārtojuma R1 ietvaros) ir FL1-pozitīvas šūnas. CD86 ekspresiju uz šūnu virsmas analizē FL1/*SSC* punktdiagrammā, kas vārtota pēc dzīvotspējīgām šūnām (vārtojums R2).

Iedobēm ar pilnīgu barotni / IgG1 analīzes marķieri nosaka tuvu pamatpopulācijai, lai pilnīgās barotnes kontrolēs IgG1 būtu mērķzonā 0,6 līdz 0,9 %.

Krāsas interference ir ar FITC marķētā IgG1 nobīde punktdiagrammā (IgG1 FL1 ģeometriski vidējais SI ≥ 150 %).

Kontroļu šūnu (neapstrādāto šūnu vai 0,4 % DMSO šķīduma šūnu) un ar ķimikāliju apstrādāto šūnu CD86 stimulācijas indeksu (SI) aprēķina ar šādu vienādojumu:.

$$S.I. = \frac{\%\ of\ CD86^{+} treated\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} treated\ cells}{\%\ of\ CD86^{+} control\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} control\ cells} \times 100$$

% neapstrādāto kontroles šūnu $IgG1^{+}$: FL1-pozitīvo IgG1 šūnu procentuālā daļa, kas atlasīta ar analīzes marķieri (pieņemamais diapazons: ≥ 0,6 % un < 1,5 %, sk. 22. punktu), no dzīvotspējīgajām neapstrādātajām šūnām;

% kontroles/apstrādāto šūnu $IgG1^{+}/CD86^{+}$: FL1-pozitīvo IgG1/CD86 šūnu procentuālā daļa, kas izmērīta, nepārvietojot analīzes marķieri, no dzīvotspējīgajām kontroles/apstrādātajām šūnām.

Dati Un Pārskata Sagatavošana

Datu izvērtēšana

20. Testā *U-SENS™* aprēķina šādus parametrus: CV_{70} vērtība, t. i., koncentrācija, pie kuras U937 šūnu dzīvotspēja ir 70 % (tātad citotoksicitāte ir 30 %), un EC_{150} vērtība, t. i., koncentrācija, pie kuras testējamās ķimikālijas inducē CD86 stimulācijas indeksu (SI) 150 % apmērā.

CV_{70} aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

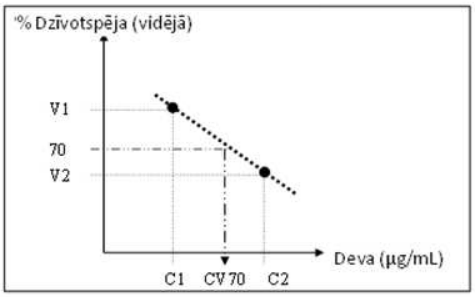
$CV_{70} = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$

kur:

V1 ir minimālā vērtība šūnu dzīvotspējai virs 70 %;

V2 ir maksimālā vērtība šūnu dzīvotspējai zem 70 %;

C1 un C2 ir koncentrācijas, pie kurām šūnu dzīvotspēja ir attiecīgi V1 un V2.



CV_{70} var noteikt arī citādi, ja vien pierāda (piem., testējot standartvielas), ka tas neietekmē rezultātus.

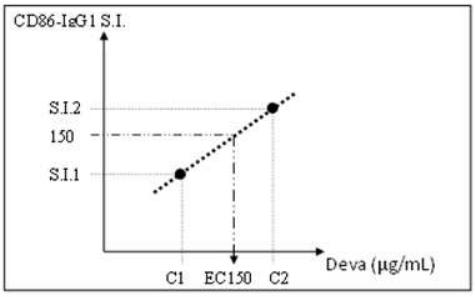
EC_{150} aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

$EC_{150} = C1 + [(150 - SI1) / (SI2 - SI1) * (C2 - C1)]$

kur:

C1 ir augstākā koncentrācija µg/ml, pie kuras CD86 SI < 150 % (SI1);

C2 ir zemākā koncentrācija µg/ml, pie kuras CD86 SI ≥ 150 % (SI2).



EC_{150} un CV_{70} vērtības aprēķina šādi:

— katrā izpildes reizē EC_{150} un CV_{70} izmanto, lai noskaidrotu, kā koncentrācija ietekmē CD86 atbildreakcijas palielinājumu (sk. 14. punktu);

— balstoties uz vidējo dzīvotspēju, nosaka kopējo CV_{70} (12);

— ja ir prognozēts, ka testā *U-SENS™* testējamās ķimikālijas rezultāts būs POZITĪVS, tad, balstoties uz CD86 vērtību vidējo SI, nosaka ķimikālijas kopējo EC_{150} (sk. 21. punktu) (12).

Prognozes modelis

21. Lai iegūtu vienu prognozi (POZITĪVU vai NEGATĪVU), *CD86* ekspresijas mērījumam katru testējamo ķimikāliju testē vismaz četrās koncentrācijās un vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs (dažādās dienās).

— Uzskata, ka *U-SENS™* izpildes reizes individuālais iznākums ir negatīvs ("N"), ja CD86 SI pie visām necitotoksiskajām koncentrācijām (šūnu dzīvotspēja ≥ 70 %) ir mazāks par 150 % un nav novērojama nekāda interference (citotoksicitāte, šķīdība (sk. 18. punktu) vai krāsa (sk. 19. punktu), lai kādas būtu necitotoksiskās koncentrācijas, pie kurām novērota interference). Visos citos gadījumos: ja CD86 SI ir lielāks par vai vienāds ar 150 % un/vai novērota interference, uzskata, ka *U-SENS™* izpildes reizes individuālais iznākums ir pozitīvs ("P").

— Uzskata, ka *U-SENS™* prognoze ir NEGATĪVA, ja negatīvas (N) ir vismaz divas neatkarīgas izpildes reizes (1. attēls). Ja pirmās divas izpildes reizes abas ir negatīvas (N), uzskata, ka *U-SENS™* prognoze ir NEGATĪVA un ka trešā izpildes reize nav vajadzīga.

— Uzskata, ka *U-SENS™* prognoze ir POZITĪVA, ja pozitīvas (P) ir vismaz divas neatkarīgas izpildes reizes (1. attēls). Ja pirmās divas izpildes reizes abas ir pozitīvas (P), uzskata, ka *U-SENS™* prognoze ir POZITĪVA un ka trešā izpildes reize nav vajadzīga.

— Tā kā netiek veikts devas noteikšanas tests, izņēmums ir gadījums, kad pirmajā izpildes reizē CD86 SI tikai pie augstākās necitotoksiskās koncentrācijas ir lielāks par vai vienāds ar 150 %. Tad izpildes reizi uzskata par NEVIENNOZĪMĪGU (NV) un jaunās izpildes reizēs jātestē papildu koncentrācijas (diapazonā starp augstāko necitotoksisko koncentrāciju un zemāko citotoksisko koncentrāciju; sk. 20. punktu). Ja izpildes reize ir NV, vajadzīgas vismaz 2 papildu izpildes reizes, un, ja 2. un 3. izpildes reize nedod vienādu rezultātu (neatkarīgi N un/vai P), vajadzīga vēl ceturtā izpildes reize (1. attēls). Tā kā koncentrācijas ir pielāgotas konkrētajai testējamajai ķimikālijai, papildu izpildes reizes uzskata par pozitīvām pat tad, ja CD86 sasniedz vai pārsniedz 150 % tikai vienas necitotoksiskas koncentrācijas gadījumā. Galīgā prognoze būs atkarīga no trīs vai četru atsevišķo izpildes reižu rezultātu pārsvara (t. i., 2 no 3 vai 2 no 4) (1. attēls).



1. attēls. Testā *U-SENS™* izmantojamais prognozes modelis. *U-SENS™* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un saskaņā ar 4. punkta un vispārīgā ievada 7., 8. un 9. punkta noteikumiem.

N: izpildes reize, kurā nav novērots ne pozitīvs CD86 rezultāts, ne interference.

P: izpildes reize, kurā novērots pozitīvs CD86 rezultāts un/vai interference.

NV: neviennozīmīgs. Pirmā izpildes reize ir neviennozīmīga vienīgi tad, ja CD86 rezultāts ir pozitīvs tikai augstākās necitotoksiskās koncentrācijas gadījumā.

#: neviennozīmīgs (NV) individuālais iznākums, kas konstatēts tikai pirmajā reizē, automātiski nozīmē, ka, lai panāktu pārsvarā pozitīvu (P) vai pārsvarā negatīvu (N) iznākumu vismaz 2 no 3 neatkarīgām izpildes reizēm, vajadzīga trešā izpildes reize.

$: lodziņos redzamas relevantās trīs izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo divu izpildes reižu rezultāti.

°: lodziņos redzamas relevantās četru izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo trīs izpildes reižu rezultāti.

Pieņemamības kritēriji

22. Izmantojot testu *U-SENS™*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem (12).

— 45±3 h ilgā ekspozīcijas perioda beigās neapstrādāto U937 šūnu triplikāta vidējai dzīvotspējai jābūt > 90 % un nedrīkst būt novērots CD86 ekspresijas dreifs. Neapstrādāto U937 šūnu CD86 bāzlīnijas ekspresijai jābūt diapazonā no ≥ 2 % līdz ≤ 25 %.

— Ja par šķīdinātāju izmanto DMSO, novērtē DMSO nesēja kontroles derīgumu, aprēķinot DMSO SI salīdzinājumā ar neapstrādāto šūnu SI, un triplikāta šūnu vidējai dzīvotspējai jābūt > 90 %. DMSO nesēja kontrole ir derīga, ja tās triplikāta CD86 SI vidējā vērtība ir mazāka nekā 250 % neapstrādāto U937 šūnu triplikāta CD86 SI vidējās vērtības.

— Izpildes reizes uzskata par derīgām, ja vismaz divas no trim neapstrādāto U937 šūnu IgG1 vērtībām ir diapazonā no ≥ 0,6 % līdz < 1,5 %.

— Paralēli testēto negatīvo kontroli (pienskābe) uzskata par derīgu, ja vismaz divi no trim replikātiem dod negatīvu rezultātu (CD86 SI < 150 %) un nav citotoksiski (šūnu dzīvotspēja ≥ 70 %).

— Pozitīvo kontroli (TNBS) uzskata par derīgu, ja vismaz divi no trim replikātiem dod pozitīvu rezultātu (CD86 SI ≥ 150 %) un nav citotoksiski (šūnu dzīvotspēja ≥ 70 %).

Testēšanas pārskats

23. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta vielas

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība pilnīgā barotnē, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Izskats, šķīdība pilnīgā barotnē, šķīdība DMSO un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā un šķīdinātāja/nesēja kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Ja tiek izmantoti citi (testēšanas vadlīnijā neminēti) šķīdinātāji/nesēji: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotā testa apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)

— Izmantotais plūsmas citometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotās antivielas un citotoksicitātes marķieris

— Procedūra, ar kādu, testējot standartvielas, pierādīta laboratorijas kompetence šā testa izpildē, un procedūra, ar kādu pierādīta šā testa rezultātu reproducējamība laika griezumā, piem., vēsturiskie kontroļu dati un/vai vēsturiskie reaģētspējas pārbaužu dati

Testa pieņemamības kritēriji

— Ar šķīdinātāja/nesēja kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un CD86 SI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Ar pozitīvo kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un SI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Šūnu dzīvotspēja visās testētajās testētās ķimikālijas koncentrācijās

Testa procedūra

— Izmantotais izpildes reižu skaits

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšana un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētā)

— Ekspozīcijas ilgums

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

— Tabulā apkopoti dati, tostarp CV_{70} (attiecīgā gadījumā), šūnu dzīvotspējas vērtības, EC_{150} vērtības (attiecīgā gadījumā), kas katrā izpildes reizē iegūtas attiecībā uz testējamo ķimikāliju un pozitīvo kontroli, un norāde uz testējamās ķimikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli

— Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

— Ar testu *U-SENS™* iegūto rezultātu iztirzājums

— Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājumi

LITERATŪRA

(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. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Available at: 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. Available at: [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. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [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. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Available at: 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. Available at: 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. Available at: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

2.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (14).

***AOP* (nelabvēlīga iznākuma ceļš)**: no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (15).

Koncentrācijatkarīga CD86 atbildreakcija: ja koncentrācijai, pie kuras rezultāts ir pozitīvs (CD86 SI ≥ 150) seko koncentrācija, pie kuras CD86 SI ir vēl lielāks, ir konstatējama koncentrācijatkarība (jeb koncentrācijatkarīga atbildreakcija).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV70: aplēstā koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja ir 70 %.

Dreifs: gadījums, kad i) 3. neapstrādātā kontroles replikāta koriģētā % $CD86^+$ vērtība ir mazāka par 50 % no 1. un 2. neapstrādātā kontroles replikāta koriģēto % $CD86^+$ vērtību vidējās vērtības un ii) 3. negatīvās kontroles replikāta koriģētā % $CD86^+$ vērtība ir mazāka par 50 % no 1. un 2. negatīvās kontroles replikāta koriģēto % $CD86^+$ vērtību vidējās vērtības.

EC150: aplēstās koncentrācijas, pie kurām CD86 ekspresijas SI ir 150 %.

Plūsmas citometrija: citometrijas paņēmiens, kurā fluīdā suspendētas šūnas pa vienai laiž caur fokusētu ierosinošu gaismu, kura izkliedējas šūnām un to sastāvdaļām specifiskos rakstos; šūnas nereti tiek marķētas ar fluorescējošiem marķieriem tā, ka tās gaismu vispirms absorbē un tad emitē mainītā frekvencē.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja)**: strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku selektīvu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā, piem., oksidācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (14).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reprodu̧cējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reprodu̧cējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (14).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (14).

SI: stimulācijas indekss. ģeometriskās vidējās fluorescences intensitātes relatīvās vērtības ar ķimikāliju apstrādātās šūnās salīdzinājumā ar attiecīgajām vērtībām ar šķīdinātāju apstrādātās šūnās.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (14).

Iekrāsošanas buferšķīdums: fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas satur 5 % liellopu embriju seruma.

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testu.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar ko tiek sniegta informācija par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, tā aizsargājot cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (16).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīgs tests: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam (14).

2.2. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot paredzamo *U-SENS™* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot CV70 un EC150 vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar testu *U-SENS™* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar testu *U-SENS™* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par testu *U-SENS™* ir pieejami arī publicēti references dati (1) (8).

1. tabula. 1

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot testu *U-SENS™*

Standartvielas	***CAS* Nr.**	**Agregātstāvoklis**	***In vivo* prognoze** [1]	**U-SENS™ Šķīdinātājs/nesējs**	**U-SENS™ CV70 references diapazons µg/ml** [2]	**U-SENS™ EC150 references diapazons µg/ml** [2]
4-fenilēndiamīns	106-50-3	ciets	sensibilizators (spēcīgs)	pilnīga barotne [3]	< 30	pozitīvs (≤ 10)
pikrilsulfonskābe	2508-19-2	šķidrs	sensibilizators (spēcīgs)	pilnīga barotne	> 50	pozitīvs (≤ 50)
dietilmaleāts	141-05-9	šķidrs	sensibilizators (vidējs)	DMSO	10–100	pozitīvs (≤ 20)
rezorcīns	108-46-3	ciets	sensibilizators (vidējs)	pilnīga barotne	> 100	pozitīvs (≤ 50)
kanēļspirts	104-54-1	ciets	sensibilizators (vājš)	DMSO	> 100	pozitīvs (10–100)
4-alilanizols	140-67-0	šķidrs	sensibilizators (vājš)	DMSO	> 100	pozitīvs (< 200)
saharīns	81-07-2	ciets	nav sensibilizators	DMSO	> 200	negatīvs (> 200)
glicerīns	56-81-5	šķidrs	nav sensibilizators	pilnīga barotne	> 200	negatīvs (> 200)
pienskābe	50-21-5	šķidrs	nav sensibilizators	pilnīga barotne	> 200	negatīvs (> 200)
salicilskābe	69-72-7	ciets	nav sensibilizators	DMSO	> 200	negatīvs (> 200)

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

(1) *In vivo* bīstamības (un potences) prognoze ir balstīta uz *LLNA* datiem (1) (8). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (17).

(2) Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (1) (8).

(3) Pilnīga barotne — barotne RPMI-1640, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma, 2 mM L-glutamīna, 100 vienībām/ml penicilīna un 100 µg/ml streptomicīna (8).

3. papildinājums

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: TESTS *IL-8 LUC*

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. Atšķirībā no testiem, ar ko analizē šūnu virsmas marķieru ekspresiju, tests *IL-8 Luc* kvantificē izmaiņas IL-8 — ar dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju asociēta citokīna — ekspresijā. Izmantojot no THP-1 iegūto IL-8 reportieršūnu līniju (THP-G8, kas izveidota no cilvēka akūtās monocītiskās leikēmijas šūnu līnijas THP-1), mēra IL-8 ekspresiju pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1). Tad luciferāzes ekspresiju izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.

2. Tests *IL-8 Luc* ir izvērtēts validācijas pētījumā (2), ko veica Japānas Alternatīvo metožu validācijas centrs (*JaCVAM*), **Ekonomikas, tirdzniecības un rūpniecības ministrija** (*METI*) un **Japānas Dzīvniektestēšanas alternatīvu biedrība** (*JSAAF*), un pēc tam ar **Starptautiskās sadarbības alternatīvu testēšanas metožu jomā** (*ICATM*) atbalstu neatkarīgi profesionālizvērtēts (3) *JaCVAM* un Veselības, darba un labklājības ministrijas (*MHLW*) paspārnē. Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, testu *IL-8 Luc* ir lietderīgi izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Piemēri, kā testa *IL-8 Luc* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, ir pieejami literatūrā (4) (5) (6).

3. Ir pierādīts, ka tests *IL-8 Luc* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar šūnu kultūrām un luciferāzes mērījumiem. Reproducējamības līmenis ir attiecīgi 87,7 % tajā pašā laboratorijā un 87,5 % citās laboratorijās (2). Validācijas pētījuma dati (2) un citi publicētie darbi (1) (6) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 118 no 143 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 25 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un testa *IL-8 Luc* pareizība ādas sensibilizatoru (ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem (ANO GHS / *CLP* nekategorizēti) ir 86 % (101/118) ar jutību 96 % (92/96) un specifiskumu 41 % (9/22). Izslēdzot vielas, kas ir ārpus tālāk (5. punktā) aprakstītā izmantojamības lauka, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 113 no 136 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 23 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un testa *IL-8 Luc* pareizība bija 89 % (101/113) ar jutību 96 % (92/96) un specifiskumu 53 % (9/17). Izmantojot *Urbisch et al.* (7) norādītos datus par cilvēku, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 76 no 90 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 14 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un pareizība bija 80 % (61/76) ar jutību 93 % (54/58) un specifiskumu 39 % (7/18). Izslēdzot vielas, kas ir ārpus izmantojamības lauka, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 71 no 84 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 13 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un testa pareizība bija 86 % (61/71) ar jutību 93 % (54/58) un specifiskumu 54 % (7/13). Testā *IL-8 Luc* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķimikālijas, kurām novērojama zema/vidēja ādas sensibilizācijas potence (ANO GHS / *CLP* 1.B apakškategorija), nevis ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (ANO GHS / *CLP* 1.A apakškategorija) (6). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka tests *IL-8 Luc* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *IL-8 Luc* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas testus, kuros neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka testu *IL-8 Luc* var izmantot testējamām ķimikālijām, kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, reakcijas mehānismi, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (2) (6).

5. Lai gan testā *IL-8 Luc* par šķīdinātāju izmanto *X-VIVO™ 15*, tas pareizi izvērtēja ķimikālijas, kuru Log K_{ow} >3.5, un ķimikālijas, kuru šķīdība ūdenī, aprēķināta ar *EPI Suite™*, ir apmēram 100 μg/ml; sensibilizatorus, kas ūdenī šķīst vāji, tas detektē labāk nekā tests *IL-8 Luc*, kurā par šķīdinātāju izmanto dimetilsulfoksīdu (DMSO) (2). Tomēr attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas koncentrācijā 20 mg/ml neizšķīst, rezultāti sakarā ar to vājo šķīdību *X-VIVO™ 15* var būt pseidonegatīvi. Tāpēc šādu ķimikāliju gadījumā negatīvus rezultātus ņemt vērā nedrīkst. Validācijas pētījumā tika konstatēts, ka daudz pseidonegatīvu rezultātu iegūst, testējot anhidrīdus. Turklāt šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās spējas (8) un eksperimenta apstākļu dēļ negatīvus rezultātus testā var dot arī prohaptēni (vielas, kurām nepieciešama metaboliskā aktivācija) un prehaptēni (vielas, kuras aktivizējas oksidējoties). Tomēr, lai gan domājamiem prehaptēniem/prohaptēniem (ķimikālijām, par kurām ir aizdomas, ka tās varētu būt prehaptēni/prohaptēni) negatīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi, testa *IL-8 Luc* datu kopā pareizi ir 11 no 11 slēdzieniem prehaptēnu gadījumā, 6 no 6 slēdzieniem prohaptēnu gadījumā un 6 no 8 slēdzieniem prehaptēnu/prohaptēnu gadījumā (2). Balstoties uz neseno visaptverošo apskatu par trīs bezdzīvnieku testiem (*DPRA*, *KeratinoSens™* un *h-CLAT*), ko izmanto prehaptēnu un prohaptēnu noteikšanai (9), un arī apstākli, ka testā *IL-8 Luc* izmantotās THP-G8 šūnas pieder pie *h-CLAT* izmantotās šūnu līnijas THP-1, testa *IL-8 Luc* iekļaušana citu testu kombinācijā var uzlabot bezdzīvnieku testu jutību prehaptēnu un prohaptēnu noteikšanā. Līdz šim testētie virsmaktīvie aģenti neatkarīgi no tipa (piem., katjoniski, anjoniski, nejoniski) devuši (pseido)pozitīvus rezultātus. Visbeidzot, ķimikālijas, kas ietekmē luciferāzi, var radīt maldīgu priekšstatu par tās aktivitāti vai ietekmēt mērījumus, izraisot vai nu šķietamu inhibēšanos, vai pastiprinātu luminiscenci (10). Piem., ir ziņots, ka fitoestrogēna koncentrācijas, kas lielākas par 1 μM, citos uz luciferāzi balstītos reportiergēnu testos radījušas luminiscences signālu traucējumus luciferāzes reportiergēna pārmērīgas aktivācijas dēļ. Tāpēc luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai augstām tādu savienojumu koncentrācijām, kuri domājami izraisa fitoestrogēnisku luciferāzes reportiergēna aktivāciju, ir rūpīgi jāizmeklē (11). Ņemot vērā visus šos apsvērumus, virsmaktīvie aģenti, anhidrīdi un ķimikālijas, kas ietekmē luciferāzi, ir ārpus šā testa izmantojamības lauka. Gadījumos, kad ir liecības, ka tests *IL-8 Luc* nav izmantojams vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

6. Kā norādīts iepriekš, tests *IL-8 Luc* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Lai noskaidrotu, vai *IL-8 Luc* rezultāti kombinācijā ar citiem informācijas avotiem var palīdzēt novērtēt potenci, ir vajadzīga papildu informācija, vēlams, balstīta uz datiem par cilvēku.

7. Definīcijas ir sniegtas 3.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

8. Tests *IL-8 Luc* izmanto cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līniju THP-1, kas iegūta no Amerikas tipveida kultūru kolekcijas (Manasasa, VA, ASV). Tohoku Universitātes Medicīnas augstskolas Dermatoloģijas departaments, izmantojot šo šūnu līniju, izveidoja no THP-1 iegūtu IL-8 reportiersūnu līniju THP-G8, kurā ir luciferāzes gēni *Stable Luciferase Orange* (*SLO*) un *Stable Luciferase Red* (*SLR*), ko kontrolē attiecīgi IL-8 un gliceraldehīda 3-fosfāta dehidrogenāzes (*GAPDH*) promoteri (1). Tas ļauj kvantitatīvi izmērīt luciferāzes gēna indukciju, detektējot luminiscenci no labi zināmiem gaismu izstarojošiem luciferāzes substrātiem, kas kalpo par IL-8 un *GAPDH* aktivitātes rādītāju šūnās pēc to ekspozīcijas sensibilizējošām ķimikālijām.

9. Divkrāsu testa sistēmu veido viena oranžo izstarojoša luciferāze (*SLO*; λmaks. = 580 nm) (12) IL-8 promotera gēnu ekspresijai un sarkano izstarojoša luciferāze (*SLR*; λmaks. = 630 nm) (13) iekšējās kontroles promotera *GAPDH* gēnu ekspresijai. Reaģējot ar jāņtārpiņu d-luciferīnu, šīs divas luciferāzes izstaro dažādas krāsas, un to luminiscenci vienlaicīgi mēra viensoļa reakcijā, testa maisījuma izstaroto gaismu sadalot ar optisko filtru (14) (3.2. papildinājums).

10. THP-G8 šūnas 16 stundas apstrādā ar testējamo ķimikāliju; pēc tam mēra *SLO* luciferāzes aktivitāti (*SLO-LA*), kas atspoguļo IL-8 promotera aktivitāti, un *SLR* luciferāzes aktivitāti (*SLR-LA*), kas atspoguļo *GAPDH* promotera aktivitāti. Lai saīsinājumus būtu vieglāk uztvert, *SLO-LA* un *SLR-LA* sauc attiecīgi par *IL8LA* un *GAPLA*. Apzīmējumi, kas saistīti ar luciferāzes aktivitāti testā *IL-8 Luc*, definēti 1. tabulā. Izmantojot mērījumu vērtības, aprēķina normalizēto *IL8LA* (*nIL8LA*), kas *IL8LA* un *GAPLA* attiecība, *nIL8LA* (*Ind-IL8LA*) indukciju, kas ir ar testējamo ķimikāliju apstrādātu THP-G8 šūnu *nIL8LA* četrkārt mērītu vērtību un neapstrādātu THP-G8 šūnu *nIL8LA* vērtību aritmētisko vidējo attiecība, un *GAPLA* (*Inh-GAPLA*) inhibēšanos, kas ir ar testējamo ķimikāliju apstrādātu THP-G8 šūnu četrkārt mērītu *GAPLA* vērtību un neapstrādātu THP-G8 šūnu *GAPLA* vērtību aritmētisko vidējo attiecība un ko izmanto par citotoksicitātes indikatoru.

1. tabula. 1

Ar luciferāzes aktivitāti testā *IL-8 Luc* saistīto apzīmējumu definīcijas

Abreviatūra	Definīcija
GAPLA	*SLR* luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo *GAPDH* promotera aktivitāti
IL8LA	*SLO* luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo *IL-8* promotera aktivitāti
nIL8LA	*IL8LA*/*GAPLA*
Ind-IL8LA	Ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *nIL8LA* / neapstrādāto šūnu *nIL8LA*
Inh-GAPLA	Ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA* / neapstrādāto šūnu *GAPLA*
CV_{05}	Zemākā ķimikālijas koncentrācija, pie kuras *Inh-GAPLA* ir < 0,05

11. Lai būtu vieglāk validēt modificētus *in vitro* IL-8 luciferāzes testus, kas līdzinās testam *IL-8 Luc*, un lai ESAO testēšanas vadlīniju Nr. 442E būtu iespējams savlaicīgi attiecīgi grozīt ar mērķi šos testus tajā iekļaut, ir pieejami veiktspējas standarti (VS) (15) Attiecībā uz testiem, kas validēti saskaņā ar VS, ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual Acceptance of Data, MAD*) būs garantēta tikai tad, ja ESAO šos testus būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā Nr. 442E (16).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

12. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām, ievērojot labu *in vitro* metožu praksi (17), jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 3.3. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 15. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 21.–24. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliecinās, ka laika gaitā testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

13. Testam *IL-8 Luc* ir pieejama standartprocedūra, kas jāizmanto, veicot šo testu (18). Laboratorijas, kas vēlas šo testu veikt, rekombinanto šūnu līniju THP-G8 var iegūt no *GPC Lab. Co. Ltd.* (Totori, Japāna), iepriekš parakstot ESAO

parauga nosacījumiem atbilstošu materiālu nodošanas līgumu. Galveno testa komponentu un procedūru apraksts sniegts nākamajos punktos.

Šūnu sagatavošana

14. Testam *IL-8 Luc* izmanto šūnu līniju THP-G8 no *GPC Lab. Co. Ltd.* (Totori, Japāna) (sk. 8. un 13. punktu). Saņemtās šūnas pavairo (2–4 pasāžas) un uzglabā sasaldētas kā viendabīgu krājumu. Šā krājuma šūnas var pavairot līdz maksimāli 12 pasāžām vai maksimāli 6 nedēļas. Pavairošanai izmanto kultūras barotni RPMI-1640, kurā ir 10 % liellopu embriju seruma (*foetal bovine serum, FBS*), antibiotisks/antimikotisks šķīdums (100 U/ml penicilīna G, 100 µg/ml streptomicīna un 0,25 µg/ml amfotericīna B 0,85 % fizioloģiskajā šķīdumā) (piem., GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicīna (piem., *CAS* Nr. 58-58-2) un 300 µg/ml G418 (piem., *CAS* Nr. 108321-42-2).

15. Pirms šūnu izmantošanas testēšanai tās jākvalificē, pārbaudot to reaģētspēju. Šī pārbaude jāveic 1–2 nedēļas vai 2–4 pasāžas pēc atkausēšanas, izmantojot pozitīvo kontroli, 4-nitrobenzilbromīdu (4-NBB) (*CAS* Nr. 100-11-8, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība). 4-NBB jāizsauc pozitīva *Ind-IL8LA* (≥ 1,4) atbildreakcija, savukārt PS — negatīva (< 1,4). Testam izmanto tikai šūnas, kas izturējušas reaģētspējas pārbaudi. Pārbaude veicama saskaņā ar 22.–24. punktā aprakstītajām procedūrām.

16. Testēšanas vajadzībām THP-G8 šūnas uzsēj blīvumā 2 līdz 5 × 10^5 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 48 vai 96 stundas. Testēšanas dienā no kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas noskalo ar RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS* bez antibiotikām, un resuspendē RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS* bez antibiotikām, blīvumā 1 × 10^6 šūnas/ml. Tad šūnas sadala melnā 96 plakandibena iedobju platē (piem., Costar Cat#3603), izmantojot 50 µl (5 × 10^4 šūnas uz iedobi).

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu sagatavošana

17. Testējamo ķimikāliju un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Testā *IL-8 Luc* testējamās ķimikālijas izšķīdina X-VIVO™ 15, komerciāli pieejamā bezseruma barotnē (Lonza, 04-418Q), līdz galīgajai koncentrācijai 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 pievieno 20 mg testējamās ķimikālijas (neatkarīgi no ķimikālijas šķīdības) mikrocentrifūgas stobriņā, papildina līdz 1 ml tilpumam un tad 30 min intensīvi vorteksē un krata ar rotoru, kura maksimālais ātrums ir 8 apgr./min, apkārtējās vides temperatūrā (aptuveni 20 °C). Ja cietas ķimikālijas joprojām nešķīst, stobriņu turklāt sonicē (apstrādā ar skaņu), līdz ķimikālija pilnīgi izšķīdusi vai stabili disperģēta. Ja testējamā ķimikālija X-VIVO™ 15 šķīst, šķīdumu ar X-VIVO™ 15 atšķaida, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 5, un izmanto par testējamās ķimikālijas izejšķīdumu X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Ja testējamā ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, maisījumu atkal vismaz 30 min rotē un tad 5 min centrifugē ar 15000 apgr./min (≈20000*g*); iegūto supernatantu izmanto par testējamās ķimikālijas izejšķīdumu X-VIVO™ 15. Citu šķīdinātāju (piem., DMSO, ūdens vai kultūras barotnes) izmantošana zinātniski jāpamato. Ķimikāliju šķīdināšanas procedūra ir detalizēti aprakstīta 3.5. papildinājumā. 18.–23. punktā aprakstītos X-VIVO™ 15 šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar melnajā 96 plakandibena iedobju platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 16. punktu).

18. Pirmās testa izpildes reizes mērķis ir noteikt citotoksisko koncentrāciju un novērtēt ķimikāliju ādas sensibilizācijas potenciālu. Izmantojot X-VIVO™ 15, 96 iedobju testa blokā (piem., Costar Cat#EW-01729-03) izdara testējamās ķimikālijas un X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu divi (sk. 3.5. papildinājumu). Pēc tam melnā 96 plakandibena iedobju platē 50 µl šūnu suspensijas pievieno 50 µl atšķaidītā šķīduma uz iedobi. Tātad testējamajām ķimikālijām, kas šķīst X-VIVO™ 15, testējamo ķimikāliju galīgās koncentrācijas ir diapazonā no 0,002 līdz 2 mg/ml (3.5. papildinājums). Testējamajām ķimikālijām, kas X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst, nosaka tikai atšķaidījuma koeficientus diapazonā no 2 līdz 2^{10}, lai gan testējamo ķimikāliju faktiskās galīgās koncentrācijas nav droši zināmas un ir atkarīgas no tā, cik piesātināts ir izejšķīdums — testējamās ķimikālijas šķīdums X-VIVO™ 15.

19. Nākamajās testa izpildes reizēs (t. i., otrais, trešais un ceturtais replikāts) X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sagatavo koncentrācijā, kas četrkārtīgi pārsniedz šūnu dzīvotspējas koncentrāciju 05 (CV_{05} — zemākā koncentrācija, pie kuras *Inh-GAPLA* ir < 0,05) pirmajā eksperimentā. Ja pirmajā izpildes reizē *Inh-GAPLA* pie augstākās koncentrācijas nesamazinās zem 0,05, X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sagatavo augstākajā pirmās izpildes reizes koncentrācijā. CV_{05} koncentrāciju aprēķina, pirmās izpildes reizes izejšķīduma koncentrāciju dalot ar CV_{05} atšķaidījuma koeficientu (X) (atšķaidījuma koeficients CV_{05} (X) — atšķaidījuma koeficients, kas vajadzīgs izejšķīduma atšķaidīšanai līdz CV_{05}) (3.5. papildinājums). Ja testējamā viela X-VIVO koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst, CV_{05} nosaka pēc izejšķīduma koncentrācijas × 1/X. 2. līdz 4. izpildes reizei sagatavo otru izejšķīdumu — 4 × CV_{05} (3.5. papildinājums).

20. Otro X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sērijveidā atšķaida ar atšķaidījuma koeficientu 1,5, izmantojot 96 iedobju testa bloku. Pēc tam melnā 96 plakandibena iedobju platē 50 µl šūnu suspensijas pievieno 50 µl atšķaidītā šķīduma uz iedobi. Katra testējamā ķimikālija katrā koncentrācijā jātestē 4 iedobēs. Pēc tam paraugus samaisa ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē 37 °C un pie 5 % CO_2; tad, kā aprakstīts tālāk, izmēra luciferāzes aktivitāti.

21. Šķīdinātāja kontrole ir šāds maisījums: 50 µl X-VIVO™ 15 un 50 µl šūnu suspensijas RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS*, uz iedobi.

22. Par pozitīvo kontroli ieteicams izmantot 4-NBB. 1,5 ml mikrofūgas stobriņā sagatavo 20 mg 4-NBB, kam pievieno X-VIVO™ 15 līdz 1 ml. Stobriņu intensīvi vorteksē un krata ar rotoru, kura maksimālais ātrums ir 8 apgr./min, vismaz 30 min. Pēc 5 min ilgas centrifugēšanas (20000 g) supernatantu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 4, un 500 µl atšķaidītā supernatanta pārvieto uz iedobi 96 iedobju testa blokā. Atšķaidīto supernatantu vēl atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientus 2 un 4, un 50 µl šķīduma pievieno 50 µl THP-G8 šūnu suspensijai melnas 96 plakandibena iedobju plates iedobēs (3.6. papildinājums). Pozitīvā kontrole katrā koncentrācijā jātestē 4 iedobēs. Plati sakrata ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē CO_2 inkubatorā (37 °C, 5 % CO_2); pēc tam izmēra luciferāzes aktivitāti, kā aprakstīts 29. punktā.

23. Par negatīvo kontroli ieteicams izmantot pienskābi (PS). 1,5 ml mikrofūgas stobriņā sagatavo 20 mg PS, kam pievieno X-VIVO™ 15 līdz 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml PS šķīdumu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 5 (4 mg/ml); 500 µl šā 4 mg/ml PS šķīduma pārvieto uz 96 iedobju testa bloka iedobi. Šo šķīdumu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 2, un tad vēlreiz atšķaida ar atšķaidījuma koeficientu 2, iegūstot šķīdumus ar koncentrāciju 2 mg/ml un 1 mg/ml. 50 µl šo 3 šķīdumu un šķīdinātāja kontroles (X-VIVO™ 15) pievieno 50 µl THP-G8 šūnu suspensijas melnas 96 plakandibena iedobju plates iedobēs. Negatīvo kontroli katrā koncentrācijā testē 4 iedobēs. Plati sakrata ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē CO_2 inkubatorā (37 °C, 5 % CO_2); pēc tam izmēra luciferāzes aktivitāti, kā aprakstīts 29. punktā.

24. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās vai negatīvās kontroles.

25. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un testējamo ķimikāliju starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķimikālijām plati noslēdzot.

26. Lai iegūtu pozitīvu vai negatīvu prognozi, ar testējamajām ķimikālijām un šķīdinātāja kontroli vajadzīgas 2 līdz 4 izpildes reizes (sk. 2. tabulu). Katru izpildes reizi veic citā dienā ar svaigu X-VIVO™ 15 izejšķīdumu un neatkarīgi ievāktām šūnām. Šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas.

Luciferāzes aktivitātes mērījumi

27. Luminiscenci mēra, izmantojot 96 iedobju mikroplates luminometru ar optiskajiem filtriem, piem., *Phelios* (*ATTO*, Tokija, Japāna), *Tristan 941* (*Berthold*, Bādvildbāde, Vācija) vai *ARVO* (*PerkinElmer*, Voltema, MA, ASV). Lai nodrošinātu reproducējamību, luminometrs katram testam jākalibrē (19). Šai kalibrēšanai pieejamas rekombinantās luciferāzes, kas izstaro oranžu un sarkanu gaismu.

28. Uz katru plates iedobi, kurā ir ar ķimikāliju apstrādāta vai neapstrādāta šūnu suspensija, pārnes 100 µl iepriekš sasildīta testa reaģenta *Tripluc® Luciferase* (*Tripluc*). Plati 10 minūtes krata apkārtējās vides temperatūrā — aptuveni 20 °C. Luciferāzes aktivitātes mērīšanai plati ieliek luminometrā. Bioluminiscenci mēra gan bez optiskā filtra (F0), gan ar to (F1), katrreiz 3 s. Citu iestatījumu izmantošanas gadījumā (piem., atkarībā no izmantotā luminometra modeļa) jāsniedz pamatojums.

29. Parametrus katrai koncentrācijai aprēķina, par pamatu ņemot izmērītās vērtības (piem., *IL8LA*, *GAPLA*, *nIL8LA*, *Ind-IL8LA*, *Inh-GAPLA*, *IL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *GAPLA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *nIL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *Ind-IL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *Inh-GAPLA* vidējā vērtība ± standartnovirze un *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāls). Šajā punktā izmantoto parametru definīcijas sk. attiecīgi 3.1 un 3.4. papildinājumā.

30. Daudzkrāsu reportieru testos pirms mērīšanas parasti panāk krāsu izšķiršanu ar detektoriem (luminometru un plašu lasītāju), kas aprīkoti ar optiskajiem filtriem, piem., sliekšņfiltriem [*sharp-cut filters*] (garviļņu vai īsviļņu caurlaides filtriem) vai frekvenču joslas filtriem. Pirms testēšanas saskaņā ar 3.2. papildinājumu jākalibrē filtru pārvades koeficienti katrai bioluminiscences signālkrāsai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

31. Lai iegūtu pozitīvu/negatīvu prognozi, katrai izpildes reizei jāatbilst šādiem kritērijiem:

— uzskata, ka testa *IL-8 Luc* prognoze ir pozitīva, ja testējamās ķimikālijas *Ind-IL8LA* ≥ 1,4 un *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāla apakšējā robeža ≥ 1,0;

— uzskata, ka testa *IL-8 Luc* prognoze ir negatīva, ja testējamās ķimikālijas *Ind-IL8LA* < 1,4 un/vai *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāla apakšējā robeža < 1,0.

Prognozes modelis

32. Testējamās ķimikālijas, attiecībā uz kurām 1., 2., 3. un 4. reizē gūti divi pozitīvi rezultāti, uzskata par pozitīvām, savukārt tās, attiecībā uz kurām 1., 2., 3. un 4. reizē gūti trīs negatīvi rezultāti, uzskata par potenciāli negatīvām (2. tabula). No potenciāli negatīvām ķimikālijām ķimikālijas, kas X-VIVO™ 15 izšķīdušas koncentrācijā 20 mg/ml, uzskata par negatīvām, savukārt par ķimikālijām, kas X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml nav izšķīdušas, spriedumu neizdara (1. attēls).

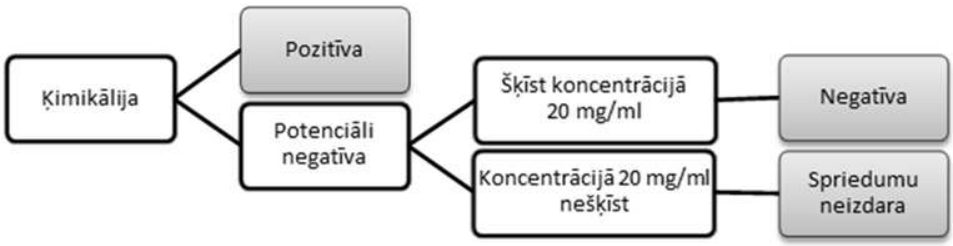
2. tabula.

Pozitīvu un potenciāli negatīvu ķimikāliju identificēšanas kritēriji

1. izpildes reize	2. izpildes reize	3. izpildes reize	4. izpildes reize	Galīgā prognoze
Pozitīva	Pozitīva	—	—	Pozitīva
	Negatīva	Pozitīva	—	Pozitīva
		Negatīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
Negatīva	Pozitīva	Pozitīva	—	Pozitīva
		Negatīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
	Negatīva	Pozitīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
		Negatīva	—	Potenciāli negatīva

1. attēls.

Galīgā slēdziena prognozes modelis



Pieņemamības kritēriji

33. Izmantojot testu *IL-8 Luc*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem:

— *Ind-IL8LA* vērtībai katrā izpildes reizē jāpārsniedz 5,0 vismaz vienā pozitīvās kontroles, 4-NBB, koncentrācijā;

— *Ind-IL8LA* vērtībai katrā izpildes reizē jābūt mazākai par 1,4 vismaz vienā negatīvās kontroles, pienskābes, koncentrācijā;

— datus no platēm, kuru kontroles iedobēs ar šūnām un *Tripluc*, bet bez ķimikālijām *GAPLA* vērtība mazāk nekā pieckārtīgi pārsniedz šo vērtību iedobēs, kurās ir tikai testa barotne (50 µl RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS*, un 50 µl X-VIVO™ 15 uz iedobi), atmet;

— datus no platēm, kurās *Inh-GAPLA* vērtība pie visām testējamo vai kontroles ķimikāliju koncentrācijām ir mazāka nekā 0,05, atmet; tādā gadījumā pirmo testu atkārto tā, lai atkārtotā testa augstākā galīgā koncentrācija būtu iepriekšējā testa zemākā galīgā koncentrācija.

Testēšanas pārskats

34. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamās ķimikālijas

Vienkomponenta viela:

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Šķīdība X-VIVO™ 15. Ja ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, norāda, vai pēc centrifugēšanas novērojama izgulsnēšanās vai flotācija

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Ja neizmanto X-VIVO™ 15: katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Šķīdība X-VIVO™ 15. Ja ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, norāda, vai pēc centrifugēšanas novērojama izgulsnēšanās vai flotācija

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Ja neizmanto X-VIVO™ 15: katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību piemērotiem pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Ja tiek izmantotas citas (testēšanas vadlīnijā neminētas) negatīvās kontroles: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotā testa apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)

— *FBS* partijas numurs un izcelsme, melnās 96 plakandibena iedobju plates partijas numurs un reaģenta *Tripluc* partijas numurs

— Testēšanā izmantoto šūnu pasāžu skaits un blīvums

— Šūnu skaitīšanas metode, kas izmantota uzsēšanai pirms testēšanas, un pasākumi, kas veikti, lai nodrošinātu šūnu viendabīgu sadalījumu skaita ziņā

— Izmantotais luminometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotais luciferāzes substrāts un pienācīgu luminiscences mērījumu pierādīšana ar 3.2. papildinājumā aprakstīto kontroltestu

— Procedūra, ar kuru pierādīta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes ilgstoša reproducējamība

Testa procedūra

— Replikātu un izpildes reižu skaits

— Testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšanas procedūras un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētajiem)

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

— Izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

— *IL8LA* un *GAPLA* mērījumi

— *nIL8LA*, *Ind-IL8LA* un *Inh-GAPLA* aprēķini

— *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāls

— Grafiks, kurā attēlotas devas–atbildreakcijas līknes attiecībā uz luciferāzes aktivitātes inducēšanos un dzīvotspēju

— Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

— Ar testu *IL-8 Luc* iegūto rezultātu iztirzājums

— Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājums

LITERATŪRA

(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. Available at: 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. Available at: 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. Available at: 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. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at. 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. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

3.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (16).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš):: no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (20).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV05: šūnu dzīvotspēja 05, t. i., minimālā koncentrācija, pie kuras ķimikāliju *Inh-GAPLA* vērtība ir mazāka par 0,05.

FInSLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *Ind-IL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *Ind-IL8LA*.

GAPLA: luciferāzes aktivitāte, kas raksturīga *Stable Luciferase Red* (*SLR*) (λmaks. = 630 nm), ko regulē *GAPDH* promoters un kas uzrāda šūnu dzīvotspēju un dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

IATA (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja):: strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku selektīvu un līdz ar to minimālu testēšanu.

II-SLR-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *Inh-GAPLA*. Definīciju sk. ierakstā par *Inh-GAPLA*.

IL-8 (interleikīns-8): no endotēlijšūnām, fibroblastiem, keratinocītiem, makrofāgiem un monocītiem iegūts citokīns, kas izraisa neitrofilu un T šūnu limfocītu hemotaksi.

IL8LA: luciferāzes aktivitāte, kas raksturīga *Stable Luciferase Orange* (*SLO*) (λmaks. = 580 nm), ko regulē IL-8 promoters.

Ind-IL8LA: inducēšanās pakāpe. To iegūst, ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *nIL8LA* dalot ar nestimulēto THP-G8 šūnu *nIL8LA*, un šī vērtība izsaka, kādā mērā ķimikālijas inducē IL-8 promotera aktivitāti.

Inh-GAPLA GAPLA: inhibēšanās. To iegūst, ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA* dalot ar neapstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA*, un šī vērtība izsaka ķimikāliju citotoksiskumu.

Minimālais inducēšanas slieksnis (MIS): zemākā koncentrācija, pie kuras ķimikālija atbilst pozitīvuma kritērijiem.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

nIL8LA SLO: luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo IL-8 promotera aktivitāti (*IL8LA*), normalizēta ar *SLR* luciferāzes aktivitāti, kas atspoguļo *GAPDH* promotera aktivitāti (*GAPLA*). Tā izsaka IL-8 promotera aktivitāti pēc tam, kad ņemta vērā šūnu dzīvotspēja vai šūnu skaits.

nSLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *nIL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *nIL8LA*.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (16).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (16).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (16).

SLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *IL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *IL8LA*.

SLR-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *GAPLA*. Definīciju sk. ierakstā par *GAPLA*.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (16).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Virsmaktīvs aģents: viela, piem., detergents, kas var samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielas; to dēvē arī par mitrinātāju. (*TG437*)

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo metodi.

THP-G8 testā *IL-8 Luc*: izmantota IL-8 reportieršūnu līnija. Cilvēka makrofāgiskā šūnu līnija THP-1, kura transficēta ar luciferāzes *SLO* un *SLR* gēniem attiecīgi IL-8 un *GAPDH* promoteru kontrolē.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar ko tiek sniegta informācija par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, tā aizsargājot cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (21).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam.

3.2. papildinājums

LUCIFERĀZES AKTIVITĀTES MĒRĪŠANAS PRINCIPS UN OPTISKO FILTRU PĀRVADES KOEFICIENTU NOTEIKŠANA SLO UN SLR

Daudzreportieru testa sistēmu *Tripluc* var izmantot ar mikroplates tipa luminometru, kam ir daudzu krāsu detektēšanas sistēma un ko var aprīkot ar optisko filtru (piem., *Phelios AB-2350* (*ATTO*), *ARVO* (*PerkinElmer*), *Tristar LB941* (*Berthold*)). Par optisko filtru mērīšanā izmanto 600–620 nm garviļņu vai īsviļņu caurlaides filtru vai 600–700 nm frekvenču joslas filtru.

Divu krāsu luciferāzu mērīšana ar optisko filtru

Šis ir piemērs, kurā izmantots *Phelios AB-2350* (*ATTO*). Šis luminometrs ir aprīkots ar 600 nm garviļņu caurlaides filtru (*R60 HOYA Co.*, 600 nm GCF, 1. filtrs) *SLO* (λmaks. = 580 nm) un *SLR* (λmaks. = 630 nm) luminiscences nošķiršanai.

Lai noteiktu 600 nm GCF pārvades koeficientus, vispirms, izmantojot attīrītus luciferāzes *SLO* un *SLR* fermentus, i) izmēra *SLO* un *SLR* bioluminiscences intensitāti bez filtra (F0), ii) izmēra *SLO* un *SLR* bioluminiscences intensitāti caur 600 nm GCF (1. filtrs) un iii) aprēķina tālāk norādītos 600 nm GCF pārvades koeficientus attiecībā uz *SLO* un *SLR*.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Ja testa parauga *SLO* un *SLR* intensitāte ir attiecīgi O un R, tad i) gaismas intensitāte bez filtra (pilns optiskais spektrs) (F0) un ii) caur 600 nm GCP (1. filtru) pārvadītas gaismas intensitāte (F1) ir tāda, kā redzams šajās formulās.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Šīs formulas var izteikt arī šādi:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Tad, izmantojot aprēķinātos pārvades koeficientus (κO_{R60} un κR_{R60}) un izmērīto F0 un F1, O un R vērtību var aprēķināt šādi:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Pārvades koeficientu noteikšanas materiāli un metodes

1) Reaģenti

Atsevišķi attīrīti luciferāzes fermenti:

liofilizēts attīrīts *SLO* ferments

liofilizēts attīrīts *SLR* ferments

(kas validācijas darba vajadzībām iegūti no *GPC Lab. Co. Ltd.*, Totori, Japāna, kopā ar šūnu līniju THP-G8)

Testa reaģents:

testa reaģents *Tripluc® Luciferase* (piem., no *TOYOBO Cat#MRA-301*)

Barotne: luciferāzes testam (30 ml, turēta 2–8 °C)

Reaģents	Koncentrācija	Galīgā koncentrācija barotnē	Vajadzīgais daudzums
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) Fermenta šķīduma sagatavošana

Liofilizētu attīrītu luciferāzes fermentu izšķīdina stobriņā, tam pievienojot 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl vai Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), kas papildināts ar 10 % (masa/tilp.) glicerīna, fermenta šķīdumu sadala 10 µl alikvotās vienreizlietojamos 1,5 ml stobriņos un -80 °C tur saldētavā. Sasaldēto fermenta šķīdumu pēc tam var izmantot 6 mēnešus. Kad šķīdumu izmanto, katram fermenta šķīduma (atšķaidīta fermenta šķīduma) stobriņam pievieno 1 ml luciferāzes testa barotnes (RPMI-1640 ar 10 % *FBS*) un to tur uz ledus, lai nenotiktu dezaktivācija.

3) Bioluminiscences mērīšana

Testa reaģentu *Tripluc® Luciferase* (*Tripluc*) atkausē un tur istabas temperatūrā vai nu ūdens vannā, vai apkārtējās vides temperatūrā. Luminometru ieslēdz 30 min pirms mērījumu sākšanas, lai fotoelektronpavairotājlampa nostabilizētos. 100 µl atšķaidītā fermenta šķīduma pārnes uz melnu 96 iedobju plati (plakandibena) (*SLO* referencparaugu uz #B1, #B2, #B3, *SLR* referencparaugu uz #D1, #D2, #D3). Tad 100 µl iepriekš sasildīta *Tripluc* ar automātisko pipeti pārnes uz katru plates iedobi, kurā ir atšķaidītais fermenta šķīdums. Ar plates kratītāju plati 10 min krata istabas temperatūrā (apm. 25 °C). Iedobēs šķīdumā likvidē burbuļus, ja tādi parādās. Lai izmērītu luciferāzes aktivitāti, plati ieliek luminometrā. Bioluminiscenci mēra gan bez optiskā filtra (F0), gan ar to (F1), katrreiz 3 s.

Optiskā filtra pārvades koeficientu aprēķina šādi:

pārvades koeficients (*SLO* (κO_{R60})) = (#B1 ar F1+ #B2 ar F1+ #B3 ar F1) / (#B1 ar F0+ #B2 ar F0+ #B3 ar F0)

pārvades koeficients (*SLR* (κR_{R60})) = (#D1 ar F1+ #D2 ar F1+ #D3 ar F1) / (#D1 ar F0+ #D2 ar F0+ #D3 ar F0)

Aprēķinātos pārvades koeficientus izmanto visiem mērījumiem, ko veic ar to pašu luminometru.

Aprīkojuma kvalitātes kontrole

Jāizmanto *IL-8 Luc* protokolā aprakstītās procedūras (18).

3.3. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, iegūstot paredzamo testa *IL-8 Luc* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 9 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 9 standartvielām (kas izraudzītas tā, lai būtu reprezentatīvas ādas sensibilizācijas atbildreakciju diapazonam) iegūstot vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar testu *IL-8 Luc* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar testu *IL-8 Luc* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par testu *IL-8 Luc* ir pieejami arī publicēti references dati (6) (1).

1. tabula.

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot testu *IL-8 Luc*

Standartvielas	*CAS* Nr.	Agregātstāvoklis	Šķīdība X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml	*In vivo* prognoze (1)	*IL-8 Luc* prognoze (2)	References diapazons (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	*IL-8 Luc* MIS (5)
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	ciets	nešķīst	sensibilizators (ļoti spēcīgs)	pozitīva	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehīds	50-00-0	šķidrs	šķīst	sensibilizators (spēcīgs)	pozitīva	9–30	4–9
2-merkaptobenztiazols	149-30-4	ciets	nešķīst	sensibilizators (vidējs)	pozitīva	250–29-0	60–250
etilēndiamīns	107-15-3	šķidrs	šķīst	sensibilizators (vidējs)	pozitīva	500–70-0	0,1–0,4
etilēnglikola dimetakrilāts	97-90-5	šķidrs	nešķīst	sensibilizators (vājš)	pozitīva	> 2000	0,04–0,1
4-alilanizols (estragols)	140-67-0	šķidrs	nešķīst	sensibilizators (vājš)	pozitīva	> 2000	0,01–0,0-7
streptomicīna sulfāts	3810-74-0	ciets	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000
glicerīns	56-81-5	šķidrs	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000
izopropanols	67-63-0	šķidrs	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs
(1) *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (19).
(2) Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (1) (6).
(3) CV_{05} un *IL-8 Luc* MIS aprēķinātas ar *EPI Suite™* doto šķīdību ūdenī.
(4) CV_{05}: minimālā koncentrācija, pie kuras ķimikāliju uzrādītā *Inh-GAPLA* vērtība ir mazāka par 0,05.
(5) MIS: zemākā koncentrācija, pie kuras ķimikālija atbilst pozitīvuma kritērijiem.

3.4. papildinājums

INDEKSI UN SLĒDZIENU KRITĒRIJI

nIL8LA (nSLO-LA)

Attiecīgi *IL8LA* (*SLO-LA*) un *GAPLA* (*SLR-LA*) mēra i-tās koncentrācijas (i = 0–11) j-to atkārtojumu (j = 1–4). Normalizētā *IL8LA*, ko dēvē par *nIL8LA* (*nSLO-LA*), ir definēta šādi:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Tā ir šā testa pamatmērvienība.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Atkārtojuma vidējotās *nIL8LA* (*nSLO-LA*) palielinājuma pakāpe pie i-tās koncentrācijas salīdzinājumā ar 0-to koncentrāciju, *Ind-IL8LA*, ir šā testa pamatmērs. Šo attiecību izsaka ar šādu formulu:

$$Ind - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Vadošā laboratorija ierosinājusi uzskatīt, ka pozitīvam testējamās ķimikālijas rezultātam atbilst vērtība 1,4. Šīs vērtības pamatā ir vadošās laboratorijas vēsturisko datu izpēte. Datu pārvaldības grupa šo vērtību izmantojusi visos validācijas pētījuma posmos. Primārais iznākums, *Ind-IL8LA*, ir divu aritmētisko vidējo attiecība, kā redzams vienādojumā.

95 % ticamības intervāls (95 % TI)

Balstoties uz šo attiecību, var aplēst 95 % ticamības intervālu (95 % TI), kas parāda, cik precīzs ir šis primārā iznākuma mērs. 95 % TI apakšējā robeža ≥ 1 liecina, ka *nIL8LA* pie i-tās koncentrācijas ir ievērojami lielāka nekā šķīdinātāja kontroles gadījumā. 95 % TI var iegūt vairākos veidos. Šajā pētījumā šādam nolūkam izmantota Fīlera [*Fieller*] teorēma. Pēc šīs teorēmas 95 % ticamības intervālu iegūst saskaņā ar šādu formulu:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

kur: .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

ir centrālā t sadalījuma 97,5. procentile ar brīvības pakāpes ν, kur

$$\nu = (\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/\{(\frac{sd_0^2}{n_0})^2/(n_0 - 1) + (\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/(n_{yi} - 1)\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA ir i-tās koncentrācijas atkārtojuma vidējotās *GAPLA* (*SLR-LA*) attiecība pret attiecīgo šķīdinātāja kontroles vērtību, un to izsaka

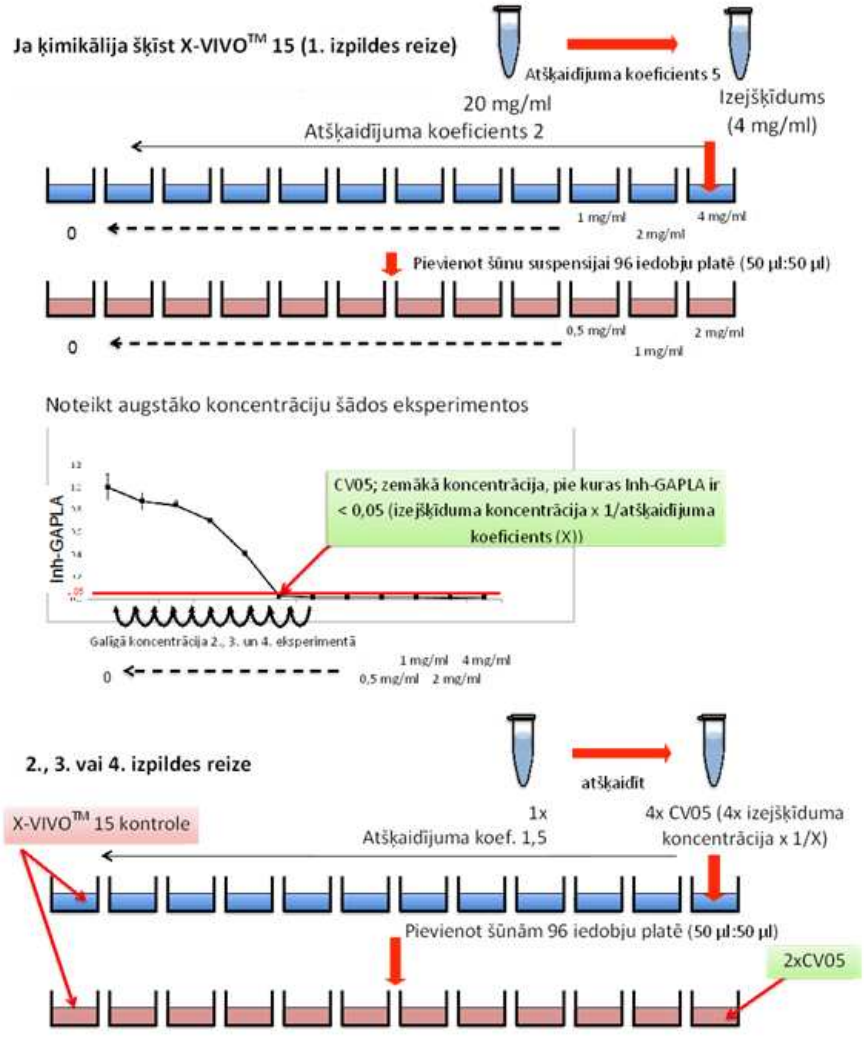
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Tā kā *GAPLA* ir *nIL8LA* saucējs, ļoti maza vērtība izraisa lielas *nIL8LA* variācijas. Tāpēc var uzskatīt, ka, ja *Inh-GAPLA* vērtība ir ļoti maza (mazāka par 0,05), *Ind-IL8LA* vērtības ir neprecīzas.

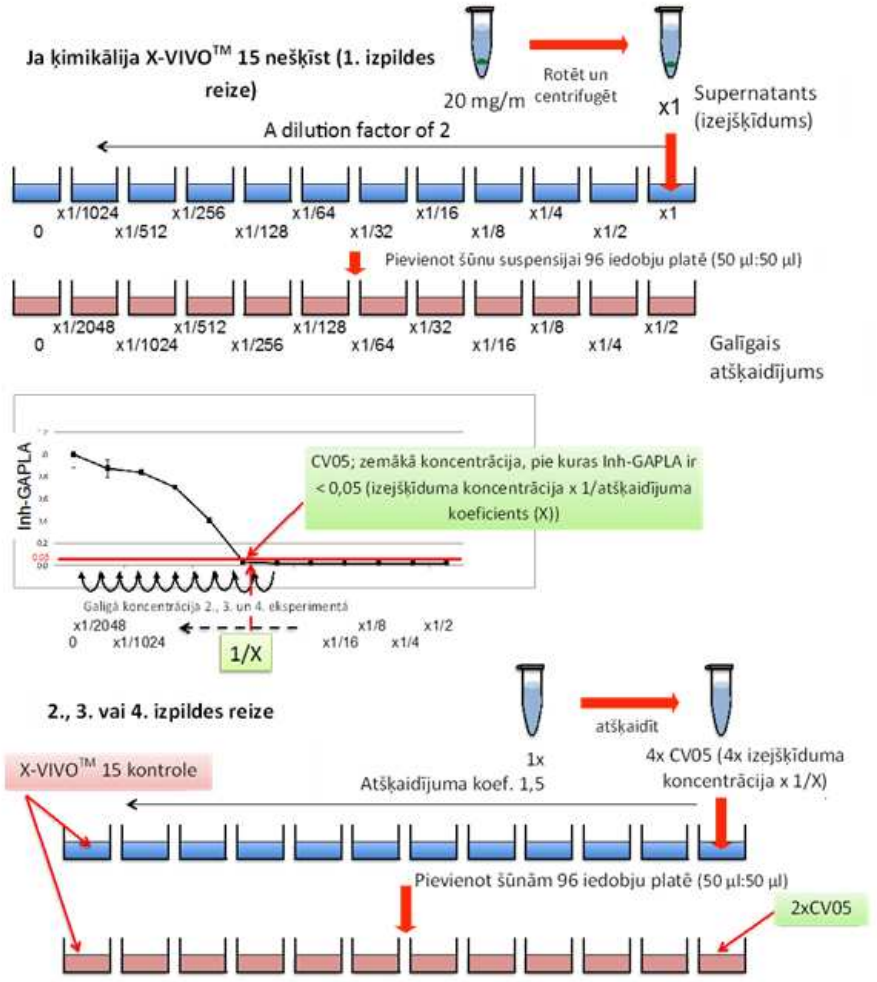
3.5. papildinājums

METODES, KĀ IZŠĶĪDINĀT ĶIMIKĀLIJAS TESTA IL-8 LUC VAJADZĪBĀM: SHĒMA

a) Ķimikālijas, kas *X-VIVO*^{TM} *15* šķīst koncentrācijā 20 mg/ml

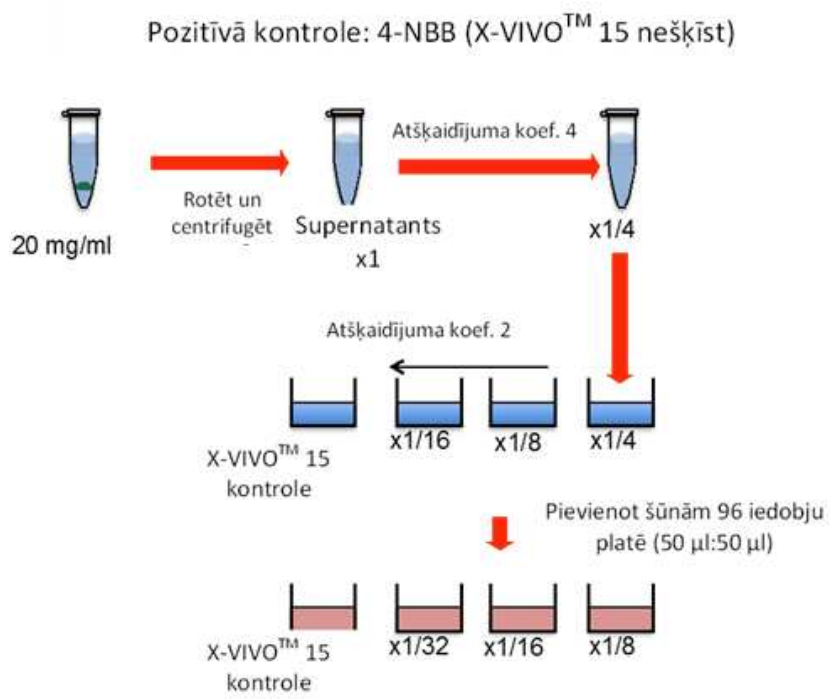


b) Ķimikālijas, kas *X-VIVO*^{TM} *15* koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst



3.6. papildinājums

METODE, KĀ IZŠĶĪDINĀT 4-NBB IZMANTOŠANAI PAR POZITĪVO KONTROLI TESTA IL-8 LUC VAJADZĪBĀM: SHĒMA



"

(9) C daļai pievieno šādas nodaļas:

"C.52. **PAPLAŠINĀTAIS VIENAS MEDAKU PAAUDZES REPRODUKCIJAS TESTS (*MEOGRT*)**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 240 (2015). Paplašinātais vienas medaku paaudzes reprodukcijas tests (*MEOGRT*) ir visaptveroša testēšanas metode, kurā, izmantojot vairākās paaudzēs eksponētas zivis, iegūst datus, kas relevanti ķimikāliju (arī domājamu endokrīni disruptīvu ķimikāliju, EDĶ) ekoloģiskās bīstamības un radīto risku novērtēšanai. Testā *MEOGRT* ekspozīciju turpina līdz izšķilšanās brīdim (līdz divām nedēļām pēc apaugļošanas, npa) otrajā (F2) paaudzē. Lai pamatotu lietderību paaudzi F2 turpināt pēc izšķilšanās, būtu vajadzīga papildu izpēte; pašlaik nav pietiekamas informācijas, kas ļautu noteikt relevantus nosacījumus vai kritērijus, kuri dotu pamatu paaudzes F2 turpināšanai. Tomēr, ņemot vērā jaunu informāciju un datus, šī testēšanas metode var tikt atjaunināta. Noteiktos apstākļos (piem., ja ķimikālijai ir liels biokoncentrēšanās potenciāls vai indikācijas par pārpaaudzisku ietekmi citos taksonos), potenciāli varētu noderēt norādījumi par paaudzes F2 turpināšanu. Ar šo testēšanas metodi var izvērtēt ķimikāliju (arī potenciālu endokrīni disruptīvu ķimikāliju) potenciālo hronisko ietekmi uz zivīm. Metodē galvenais uzsvars likts uz potenciālo ietekmi populācijas līmenī (proti, nelabvēlīga ietekme uz izdzīvotību, attīstību, pieaugumu un reprodukciju), kas dod iespēju aprēķināt nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) vai efektīvo koncentrāciju (ECx); tomēr jāatzīmē, ka ECx pieejas reti ir piemērotas lieliem šāda veida pētījumiem, jo testējamo koncentrāciju skaitu palielināt tik lielā mērā, lai varētu noteikt vajadzīgo ECx, var būt nepraktiski, turklāt lielā izmantoto dzīvnieku skaita dēļ tas var radīt ievērojamas bažas no dzīvnieku labklājības viedokļa. Ja ķimikālija nav jānovērtē vairākās paaudzēs vai nav potenciāla endokrīni disruptīva ķimikālija, piemērotākas var būt citas testēšanas metodes (1). Piemērotākā suga šai testēšanas metodei ir Japānas medaka, jo tai ir īss dzīves cikls un var noteikt ģenētisko dzimumu (2), kas šajā metodē ir izšķirīgi svarīgi. Šajā metodē aprakstītās konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti attiecas tikai uz Japānas medaku. Citas mazu sugu zivis (piem., zebrzivis) var izmantot ar līdzīgu testēšanas protokolu.

2. Šī testēšanas metode mēra vairākus bioloģiskos beigupunktus. Galvenais uzsvars likts uz potenciālo nelabvēlīgo ietekmi uz populācijas līmeņa parametriem, tostarp izdzīvotību, vispārējo attīstību, pieaugumu un reprodukciju. Otrkārt, lai iegūtu informāciju par mehānismiem un gūtu sasaisti ar citu veidu lauka un laboratorijas pētījumu rezultātiem gadījumos, kad ir vēlāki pierādījumi par ķimikālijas potenciālu būt endokrīni disruptīvai (piem., androgēniska vai estrogēniska darbība citos testos), noderīgu papildu informāciju iegūst, mērot vitelogenīna (vtg) informatīvo RNS (iRNS) (vai vitelogenīna proteīnu, VTG), fenotipiskās sekundārās dzimumpazīmes (SDzP), kas saistītas ar ģenētisko dzimumu, un izvērtējot histopatoloģiju. Jāpiezīmē: ja nav aizdomu, ka testējamā ķimikālija vai tās metabolīti varētu būt EDĶ, mērīt šos sekundāros beigupunktus var nebūt vajadzīgs un piemērotāk varētu būt veikt pētījumu, kurš prasa mazāk resursu un kurā izmanto mazāk dzīvnieku (1). Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Tā kā testētas salīdzinoši nedaudzas ķimikālijas un šā visai sarežģītā testa validēšanā iesaistījušās salīdzinoši nedaudzas laboratorijas, ir gaidāms, ka tad, kad būs pieejami pietiekami daudzi pētījumi, lai varētu novērtēt šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, testēšanas metode tiks pārskatīta un vajadzības gadījumā grozīta, ņemot vērā gūto pieredzi. Datus var izmantot ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara 5. līmenī (3). Testēšanas metodes sākumā pieaugušas zivis (paaudze F0) reproduktīvajā fāzē tiek eksponētas testējamajai ķimikālijai. Ekspozīcija turpinās paaudzes F1 attīstības un reprodukcijas, kā arī paaudzes F2 izšķilšanās laikā; tādējādi ar testu var izvērtēt gan strukturālos, gan aktivacionālos endokrīnos ceļus. Interpretējot endokrīnos beigupunktus, var izvēlēties pierādījumu svara pieeju.

4. Testā jāizmanto tik daudzi īpatņi, lai testa jauda būtu pietiekama reproduktīvi relevanto beigupunktu izvērtēšanai (sk. 3. papildinājumu), tomēr dzīvnieku labklājības nolūkā vienlaikus jārūpējas, lai tiktu izmantots minimālais vajadzīgais dzīvnieku skaits. Ņemot vērā, cik daudzi testa dzīvnieki vajadzīgi, ir rūpīgi jāapdomā, vai tests patiešām ir vajadzīgs, proti, vai relevantu informāciju par daudziem *MEOGRT* beigupunktiem jau nesatur esošie dati. Šajā ziņā var palīdzēt ESAO zivju toksicitātes testēšanas satvars (1).

5. Testēšanas metodes pamatmērķis ir noskaidrot vienas vielas ietekmi. Ja rodas vajadzība testēt maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.

6. Ir svarīgi, lai pirms testa sākšanas būtu pieejama informācija par testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām, īpaši tālab, lai varētu iegūt stabilus ķimikālijas šķīdumus. Svarīgi ir arī tas, lai būtu pieejama pietiekami jutīga analītiskā metode testējamās ķimikālijas koncentrāciju verificēšanai.

TESTA PRINCIPS

7. Testa sākumā dzimumgatavus tēviņus un mātītes (vismaz 12 npa) vaislas pāros 3 nedēļas eksponē testējamajai ķimikālijai, kura šajā laikā atbilstoši savai toksikokinētiskajai uzvedībai izplatās vecākpaaudzes (F0) zivju organismā. Pēc iespējas tuvāk ceturtās nedēļas pirmajai dienai savāc ikrus paaudzes F1 sākšanai. Paaudzes F1 audzēšanas laikā (15 nedēļas) novērtē šķilstību [izšķilšanās rādītājs] un izdzīvotību. Turklāt izlases veidā 9–10 npa pārbauda zivju ontoģenētiskos beigupunktus un 12.–14. npa trīs nedēļas novērtē nārstošanu. Kad apritējusi trešā reproduktīvās novērtēšanas nedēļa, sāk paaudzi F2, ko audzē līdz izšķilšanās beigām.

TESTA DERĪGUMA KRITĒRIJI

8. Piemērojami šādi testa derīguma kritēriji:

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt ≥ 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;

— vidējai ūdens temperatūrai visā testa laikā jābūt diapazonā no 24 līdz 26 °C. Atsevišķu akvāriju īslaicīgas novirzes no šīs vidējās vērtības nedrīkst pārsniegt 2 °C;

— kontroļu vidējai fekunditātei abās paaudzēs (F0 un F1) jābūt lielākai nekā 20 ikri uz pāri dienā. Visu novērtēšanas laikā producēto ikru fertilitātei jāpārsniedz 80 %. Turklāt 16 no rekomendētajiem 24 kontroles vaislas pāriem (> 65 %) vajadzētu producēt vairāk nekā 20 ikrus uz pāri dienā;

— kontrolēs ikru šķilstībai jābūt ≥ 80 % (vidēji) (gan paaudzē F1, gan F2);

— izdzīvotībai pēc izšķilšanās līdz 3. npa un no 3. npa līdz paaudzes F1 nonāvēšanai (t. i., 15. npa) kontrolēs (F1) jābūt attiecīgi ≥ 80 % (vidēji) un ≥ 90 % (vidēji);

— jābūt pieejamām liecībām, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

Lai gan ūdens temperatūra nav derīguma kritērijs, vienas apstrādes replikāti nedrīkstētu būt statistiski atšķirīgi un arī apstrādes grupas testā nedrīkstētu statistiski viena no otras atšķirties (ik dienas veiktu temperatūras mērījumu ziņā un neskaitot īslaicīgas novirzes).

9. Lai gan vairāk eksponētajās grupās var būt novērojami samazināti vairošanās rādītāji, reprodukcijai vismaz trešās lielākās ekspozīcijas grupā un visās mazākas ekspozīcijas F0 grupās jābūt pietiekamai, lai piepildītu šķilšanās inkubatorus. Turklāt paaudzes F1 trešās lielākās ekspozīcijas grupā un mazākas ekspozīcijas grupās embriju izdzīvotībai jābūt pietiekamai, lai būtu iespējams izvērtēt beigupunktus gandrīz pieaugušu īpatņu paraugojumā (sk. 36. un 38. punktu un 9. papildinājumu). Turklāt paaudzes F1 otrās augstākās ekspozīcijas grupā jābūt vismaz minimālai izdzīvotībai pēc izšķilšanās (~20 %). Tie nav gluži derīguma kritēriji, bet rekomendācijas, kuru ievērošana ļaus aprēķināt robustas *NOEC* vērtības.

10. Ja novērojamas novirzes no testa derīguma kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa rezultātu ticamību un šīs novirzes un apsvērumi jāatspoguļo testēšanas pārskatā.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

11. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

a) skābekļa un pH mērinstrumenti;

b) aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai;

c) attiecīgs aprīkojums temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktam monitoringam;

d) ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā uz ieteicamo noslogojumu un piepildītību (sk. 3. papildinājumu);

e) pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti ± 0,5 mg).

Ūdens

12. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugu dzīvnieki uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un pieaugumu. Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanai izmantotais ūdens nerada nepienācīgu ietekmi uz testa rezultātu (piem., testējamās ķimikālijas kompleksēšanās ceļā) vai nelabvēlīgi neietekmē vaislas zivju rādītājus, noteiktos starplaikos jāņem paraugi analīzei. Ja zināms, ka atšķaidīšanai izmantotā ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, tad, piem., reizi sešos mēnešos jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cietvielu mērījumi. Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības ir norādītas 2. papildinājumā. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā.

Ekspozīcijas sistēma

13. Tas, kādai jābūt ekspozīcijas sistēmas uzbūvei un materiāliem, nav noteikts. Veidojot testa sistēmu, jāizmanto stikls, nerūsošais tērauds vai cits ķīmiski inerts materiāls, kas nav kontaminēts citos testos. Šā testa vajadzībām labi piemērota ekspozīcijas sistēma var būt pastāvīgas caurplūdes sistēma (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testa šķīdumi

14. Testējamās ķimikālijas izejšķīdumu ekspozīcijas sistēmā ievada ar piemērotu sūkni. Pirms ekspozīcijas sākšanas izejšķīduma caurplūdumu kalibrē pēc testa šķīduma analītiskajiem rādītājiem un testa gaitā to periodiski pārbauda volumetriski. Atkarībā no testējamās ķimikālijas stabilitātes un ūdens kvalitātes testa šķīdumu katrā kamerā pienācīgi atjaunina (piem., no vismaz 5 tilpumatjaunināšanām dienā līdz 16 tilpumatjaunināšanām dienā vai līdz 20 ml/min caurplūdumam).

15. Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus sagatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams sagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piem., samaisot un/vai apstrādājot ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas/sistēmas vai pasīvas dozēšanas metodes (14). Katrā ziņā jācenšas izvairīties no šķīdinātāju vai nesēju izmantošanas, jo: 1) daži šķīdinātāji paši var izraisīt toksicitāti un/vai nevēlamu vai negaidītu atbildreakciju, 2) ja testējamās ķimikālijas koncentrācija pārsniedz tās šķīdību ūdenī (kā nereti gadās, ja izmanto šķīdinātājus), noteiktās efektīvās koncentrācijas var būt nepareizas, 3) šķīdinātāju izmantošana ilgākos testos var radīt ievērojamu bioplēvi, kas saistāma ar mikroorganismu aktivitāti, un tā var ietekmēt vides apstākļus, kā arī spēju uzturēt ekspozīcijas koncentrācijas, un, 4) ja nav vēsturisko datu, kas pierāda, ka šķīdinātājs pētījuma iznākumu neietekmē, šķīdinātājus var izmantot tikai ar šķīdinātāja kontroli, savukārt tas ir pretrunā dzīvnieku labklājības principiem, jo testa veikšanai tad vajadzīgi papildu dzīvnieki. Šķīdinātāju izmanto kā galēju līdzekli sarežģīti testējamu ķimikāliju gadījumā, un piemērotāko metodi izvēlas, izmantojot ESAO norādījumu dokumentu Nr. 23 par sarežģīti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (15). Šķīdinātāja izvēli nosaka testējamās ķimikālijas ķīmiskās īpašības un pieejamie vēsturiskie dati par šķīdinātāja izmantošanu. Ja par nesēju izmanto šķīdinātāju, jāizvērtē iespēja līdzās bezšķīdinātāja (negatīvajām) kontrolēm (tikai atšķaidīšanas ūdens) izmantot pienācīgas šķīdinātāja kontroles. Ja no šķīdinātāja izmantošanas nevar izvairīties un ir novērojama mikrobiāla aktivitāte (bioplēves veidošanās), ieteicams visā testa laikā reģistrēt / pārskatā norādīt bioplēves apmēru katrā tvertnē (vismaz reizi nedēļā). Ideālā gadījumā šķīdinātāja koncentrācija šķīdinātāja kontrolē un visās apstrādātajās grupās būtu jāuztur nemainīga. Ja šķīdinātāja koncentrāciju neuztur nemainīgu, šķīdinātāja kontrolē jāizmanto augstākā šķīdinātāja koncentrācija, ko izmanto apstrādē. Gadījumos, kad par nesēju izmanto šķīdinātāju, maksimālajai šķīdinātāja koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 100 µl/l vai 100 mg/l (15), un ir ieteicams šķīdinātāja koncentrāciju saglabāt pēc iespējas mazu (piem., < 20 µl/l), lai novērstu iespējamu šķīdinātāja ietekmi uz mērītajiem beigupunktiem (16).

Testa dzīvnieki

Zivju izvēle un turēšana

16. Testa suga ir Japānas medaka (*Oryzias latipes*), jo tai ir īss dzīves cikls un nosakāms ģenētiskais dzimums. Lai gan ar līdzīgu testēšanas protokolu var izmantot citu mazu zivju sugu pārstāvjus, šajā testēšanas metodē aprakstītās konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti attiecas tikai uz Japānas medaku (sk. 1. punktu). Ir viegli panākt medakas vairošanos nebrīvē; ir publicētas tās kultivēšanas metodes (17) (18) (19), un ir pieejami dati no īstermiņa letalitātes, agrīno dzīves cikla stadiju un pilna dzīves cikla testiem (5) (6) (8) (9) (20). Visas zivis pakļauj 16 stundu fotoperiodam (16 gaismas stundas un 8 tumsas stundas). Zivis baro ar dzīviem sāļūdens vēžveidīgo *Artemia* spp. nauplijiem, vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas. Ar analīzēm regulāri pārliecinās, ka komerciāli pieejamajās barības pārslās nav kontaminantu.

17. Ja vien tiek ievērota pienācīga audzēšanas prakse, īpašs kultivēšanas protokols nav vajadzīgs. Piemēram, līdz 4. npa medakas var audzēt 2 l tvertnēs, kurās tur 240 zivju kāpurus uz tvertni, pēc tam līdz 8. npa 2 l tvertnēs, kurās tur 10 zivis uz tvertni, un beigās tās 2 l tvertnēs tur vaislas pāros.

Zivju aklimatizācija un atlase

18. Testa zivis jāatlasa no viena laboratorijas krājuma, kas vismaz divas nedēļas pirms testa aklimatizējies tādos ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos, kas līdzinās testa apstākļiem (piezīme: šis aklimatizācijas periods nav *in situ* pirmsekspozīcijas periods). Ir ieteicams testa zivis iegūt no iekšēja krājuma, jo pieaugušu zivju transportēšana ir stresors, kas var kavēt paredzamu nārstošanu. Zivis visa turēšanas perioda laikā divreiz dienā baro ar sāļūdens garneļu nauplijiem, un ekspozīcijas fāzē tām vajadzības gadījumā papildus dod komerciāli pieejamas barības pārslas. Uzskatāms, ka, lai nodrošinātu pietiekamu replikāciju, testa sākšanai vajadzīgi vismaz 42 vaislas pāri (ja vajadzīga šķīdinātāja kontrole, tad 54 vaislas pāri, daļēji tāpēc, ka nav vēsturisku datu, kas ļautu izmantot tikai bezšķīdinātāja kontroli). Turklāt, lai novērstu spontānu XX tēviņu iespējamu iekļaušanu, jāpārliecinās, ka katrs paaudzes F0 vaislas pāris ir XX un XY (proti, normāla dzimumhromosomu kombinācija gan mātītei, gan tēviņam) (sk. 39. punktu).

19. Aklimatizācijas fāzē jāreģistrē kultivēto zivju mirstība un pēc 48 h stabilizācijas perioda jāpiemēro šādi kritēriji:

— ja mirstība kultivētajā populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu pārsniedz 10 %: partiju neizmanto vispār;

— ja mirstība populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu ir diapazonā no 5 % līdz 10 %: 2 nedēļu aklimatizācijas periodam pievieno vēl septiņas papildu dienas; ja nākamo septiņu dienu laikā mirstība pārsniedz 5 %, partiju neizmanto vispār;

— ja mirstība populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu ir zem 5 %: partiju pieņem.

20. Divu nedēļu aklimatizācijas periodā pirms testa zivīm nevajadzētu ārstēt slimības, un ekspozīcijas laikā no slimību ārstēšanas jāizvairās vispār, ja iespējams. Zivis ar klīniskām slimības pazīmēm pētījumā neizmanto. Jāfiksē visi novērojumi un profilaktiska vai terapeitiska slimību ārstēšana kultivēšanas periodā pirms testa.

21. Ekspozīcijas fāzi sāk ar ģenētiski dzimumdimorfām pieaugušām zivīm, kurām ir noteikts ģenētiskais dzimums un kuras izraudzītas no reproduktīvi nobriedušiem laboratorijas dzīvniekiem, kas kultivēti 25 ± 2 °C. Ņem zivis, kas nedēļā pirms ekspozīcijas pierādījušas spēju vairoties (proti, radījušas dzīvotspējīgus pēcnācējus). Visā testā izmantoto zivju grupā katra dzimuma īpatņu masai testa sākumā jābūt diapazonā ± 20 % no attiecīgā dzimuma īpatņu vidējās aritmētiskās masas. Lai aplēstu vidējo masu, apakšparaugotas zivis pirms testa nosver. Atlasītajām zivīm jābūt vismaz 12. npa, mātītēm ≥ 300 mg un tēviņiem ≥ 250 mg.

TESTA PLĀNS

Testējamās koncentrācijas

22. Ieteicams izmantot piecas ķimikālijas koncentrācijas un vienu vai vairākas kontroles. Izvēloties testējamo koncentrāciju diapazonu, jāņem vērā visi informācijas avoti, tostarp struktūras un aktivitātes kvantitatīvās sakarības (*QSAR*), informācija par analogiem, zivju testu (piem., akūtās toksicitātes testu) rezultāti (šā pielikuma C.1. nodaļa), zivju īstermiņa reprodukcijas testu rezultāti (šā pielikuma C.48. nodaļa) un citu testēšanas metožu, piem., šā pielikuma C.15., C.37., C.41., C.47. vai C.49. nodaļā aprakstīto metožu (21) (22) (23) (24) (25) (26), rezultāti, ja tādi pieejami, vai, ja nepieciešams, rezultāti no diapazona noteikšanas testa, kurā var būt iekļauta arī reprodukcijas fāze. Ja nepieciešams, diapazona noteikšanas testu var veikt līdzīgos apstākļos (ūdens kvalitāte, testa sistēma, noslogojums ar dzīvniekiem) kā galīgo testu. Ja nākas izmantot šķīdinātāju un vēsturisku datu nav, diapazona noteikšanas testā var noskaidrot šķīdinātāja piemērotību. Augstākā testējamā koncentrācija nedrīkst pārsniegt šķīdību ūdenī, 10 mg/l vai 1/10 no 96 h LC_{50} (27). Zemākajai koncentrācijai jābūt 10 līdz 100 reizes mazākai par augstāko. Piecu koncentrāciju izmantošana šajā testā dod iespēju ne vien izmērīt devas–atbildreakcijas sakarības, bet arī noskaidrot zemāko nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) un *NOEC*, kas dažās regulatīvajās programmās vai jurisdikcijās ir nepieciešams riska novērtēšanai. Atstatuma koeficients starp testējamās ķimikālijas nominālajām koncentrācijām blakusesošos apstrādes līmeņos parasti ir ≤ 3,2.

Apstrādes grupu un kontroļu replikāti

23. Jāizmanto vismaz sešas replikātkameras uz testa koncentrāciju (sk. 7. papildinājumu). Reproduktīvajā fāzē (izņemot paaudzei F0) replikācijas struktūru dubulto fekunditātes novērtēšanai, un katrā replikātā ir tikai viens vaislas pāris (sk. 42. punktu).

24. Papildus testējamajām koncentrācijām vajadzīga arī atšķaidīšanas ūdens kontrole un vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontrole. Lai nodrošinātu pietiekamu statistisko jaudu, kontrolēm jāizmanto dubults replikātkameru skaits (t. i., kontrolēm izmanto vismaz divpadsmit replikātus). Reproduktīvajā fāzē replikātu skaitu kontrolēs dubulto (t. i., vismaz 24 replikāti, tikai viens vaislas pāris uz replikātu). Pēc reproducēšanās kontroles replikātos vajadzētu būt ne vairāk kā 20 zivju embriju.

PROCEDŪRA

Testa sākšana

25. Reproduktīvi aktīvās pieaugušās zivis, ko izmanto testa paaudzes F0 izveidei, atlasa pēc diviem kritērijiem: vecums (parasti vairāk nekā 12 npa, bet ieteicams nepārsniegt 16 npa) un masa (≥ 300 mg mātītēm un ≥ 250 mg tēviņiem).

26. Mātīšu un tēviņu pārus, kas atbilst šīm specifikācijām, kā atsevišķus pārus ievieto katrā replikāttvertnē, tā testa sākumā iegūstot divpadsmit replikātus kontrolēs un sešus replikātus apstrādēs ar ķimikāliju. Šīm tvertnēm pēc nejaušības principa nosaka apstrādi (piem., T1–T5 un kontrole) un replikātu (piem., A–L kontrolei un A–F apstrādei) un tad ievieto ekspozīcijas sistēmā, uz katru tvertni nodrošinot attiecīgu plūsmu.

Ekspozīcijas nosacījumi

27. Pilnīgs testa parametru un nosacījumu kopsavilkums atrodams 3. papildinājumā. Ja šīs specifikācijas tiek ievērotas, kontroles zivju beigupunktu vērtībām vajadzētu būt līdzīgām tām, kas norādītas 4. papildinājumā.

28. Testa laikā vismaz vienā katras apstrādes grupas un kontroles testa traukā mēra izšķīdušo skābekli, pH un temperatūru. Šos mērījumus (izņemot temperatūras mērījumu) visā ekspozīcijas periodā veic vismaz reizi nedēļā. Vidējai ūdens temperatūrai visā testa laikā jābūt diapazonā no 24 līdz 26 °C. Temperatūru visā ekspozīcijas periodā mēra katru dienu. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā. Apstrādātie replikāti nedrīkstētu būt statistiski atšķirīgi, un arī apstrādātās testa grupas nedrīkstētu statistiski viena no otras atšķirties (ik dienas veiktu temperatūras mērījumu ziņā un neskaitot īslaicīgas novirzes).

Ekspozīcijas ilgums

29. Testā trīs nedēļas tiek eksponētas reproduktīvi nobriedušas paaudzes F0 zivis. 4. nedēļā aptuveni 24. testa dienā izveido paaudzi F1, bet paaudzes F0 vaislas pārus humāni nonāvē un reģistrē to masu un garumu (sk. 34. punktu). Pēc tam paaudzi F1 eksponē vēl 14 nedēļas (kopā 15 ekspozīcijas nedēļas paaudzei F1) un paaudzi F2 eksponē divas nedēļas līdz izšķilšanās laikam. Testa kopējais ilgums principā ir 19 nedēļas (t. i., līdz paaudzes F2 izšķilšanās laikam). Testa laika grafiki ir redzami 2. tabulā un vēl sīkāk izskaidroti 9. papildinājumā.

Barošanas režīms

30. Zivis var *ad libitum* barot ar sāļūdens vēžveidīgajiem *Artemia* spp. (24 h veciem nauplijiem), vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas. Ar analīzēm regulāri pārliecinās, ka komerciāli pieejamajās barības pārslās nav kontaminantu, piemēram, hlororganisko pesticīdu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu (turpmāk "PAO") un polihlorbifenilu (turpmāk "PHB"). Jāizvairās no barības ar paaugstinātu endokrīni aktīvu vielu līmeni (piem., fitoestrogēniem), kas testā varētu ietekmēt atbildreakciju. No testēšanas traukiem pēc vajadzības jāizņem neapēstā barība un izkārnījumi, piem., katras tvertnes apakšdaļu rūpīgi iztīrot ar sifonu. Vienu vai divas reizes nedēļā jānotīra arī katras tvertnes sienas un dibens (piem., noskrāpējot netīrumus ar skrāpi). Barošanas režīma piemērs atrodams 5. papildinājumā. Barības daudzumu nosaka pēc zivju skaita uz replikātu. Tas nozīmē, ka barības daudzumu samazina, ja replikātā ir zivju nāves gadījumi.

Analītiskie konstatējumi un mērījumi

31. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķimikālijas pievades sistēmas darbība. Visām nepieciešamajām analītiskajām metodēm jābūt atzītām, un nepieciešamas arī pietiekamas zināšanas par ķimikālijas stabilitāti testa sistēmā. Testa laikā pienācīgos intervālos nosaka testējamās ķimikālijas koncentrācijas, vēlams — vienā katras apstrādes grupas replikātā vismaz reizi nedēļā, katru nedēļu izvēloties citu tās pašas apstrādes grupas replikātu.

32. Testa laikā ar regulāriem starplaikiem (piem., vismaz trīs reizes nedēļā) pārbauda atšķaidītāja un izejšķīduma caurplūdumu. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām, rezultātu var balstīt kā uz izmērītajām, tā nominālajām vērtībām. Ja ķimikālijas zivīs ievērojami uzkrājas, testa koncentrācijas, zivīm augot, var mazināties. Tādos gadījumos ieteicams testējamā šķīduma atjaunināšanās rādītāju katrā kamerā pielāgot tā, lai testa koncentrācijas paliktu iespējami nemainīgas.

Novērojumi un mērītie beigupunkti

33. Mērītie beigupunkti ir fekunditāte (potenciālā auglība), fertilitāte (faktiskā auglība), izšķilšanās, pieaugums un izdzīvotība, kas ļauj izvērtēt iespējamās populācijas līmeņa ietekmes. Ik dienas turklāt jānovēro uzvedība un jāatzīmē jebkādas uzvedības īpatnības. Citi mehānistiski beigupunkti ietver hepatiskos vtg iRNS vai VTG proteīnu līmeņus, kas noteikti imūntestā (28), fenotipiskos dzimummarķierus, piem., raksturīgās tēviņu anālās spuras papillas, gonādiskā dzimuma histoloģisko izvērtējumu un nieru, aknu un gonādu histopatoloģisko izvērtējumu (sk. beigupunktu sarakstu 1. tabulā). Visus šos specifiskos beigupunktus izvērtē īpatņa ģenētiskā dzimuma noteikšanas kontekstā, balstoties uz medakas tēviņu gēna *dmy* klātesību vai neesību (sk. 41. punktu). Izvērtē arī laiku līdz nārstošanai. Turklāt, izmantojot anālās spuras papillu skaitu, var iegūt vienkāršu fenotipisko dzimumu attiecību, kas ļauj konkrētas medakas atzīt par fenotipiskiem tēviņiem vai mātītēm. Nav gaidāms, ka šī testēšanas metode ļaus noteikt pieticīgas novirzes no paredzamās dzimumu attiecības, jo salīdzinoši mazais zivju skaits replikātā nedod pietiekamu statistisko jaudu. Turklāt histopatoloģiskās novērtēšanas laikā tiek izvērtētas gonādas un tiek veiktas daudz spēcīgākas gonādiskā fenotipa analīzes ģenētiskā dzimuma kontekstā.

34. Galvenais šīs testēšanas metodes mērķis ir novērtēt testējamās ķimikālijas iespējamo populācijas līmeņa ietekmi. Mehānistiski beigupunkti (VTG, SDzP un konkrētas gonādiskas histopatoloģiskās ietekmes) var palīdzēt arī noteikt, vai ietekmi mediē endokrīnā iedarbība. Tomēr šos mehānistiskos beigupunktus var iespaidot arī sistēmiska toksicitāte vai cita toksicitāte. Līdz ar to, lai varētu vieglāk saprast atbildreakcijas mehānistiskajos beigupunktos, var būt vajadzība detalizēti novērtēt arī aknu un nieru histopatoloģiju. Ja šo detalizēto izmeklēšanu tomēr neveic, jebkurā gadījumā jāatzīmē un pārskatā jānorāda histopatoloģiskajā izvērtēšanā nejauši ievērotas būtiskas anormālijas.

Humāna zivju nonāvēšana

35. Beidzot paaudzes F0 un F1 ekspozīciju, kad tiek apakšparaugotas gandrīz pieaugušas zivis, zivis būtu jānonāvē ar pienācīgu anestētiska šķīduma daudzumu (piem., trikaīna metānsulfonātu, MS-222 (*CAS* Nr.: 886-86-2), 100–500 mg/l), ko gļotādu kairinājuma mazināšanai atšķaida ar 300 mg/l $NaHCO_3$ (nātrija bikarbonāts, *CAS* Nr.: 144-55-8). Ja zivīm novērojamas ievērojamu ciešanu pazīmes (ļoti smagas, droši paredzama nāve) un tās uzskatāmas par mirstošām, tās anestezē un eitanazē, bet datu analīzes nolūkos uzskata par nāves gadījumiem. Ja zivi eitanazē tāpēc, ka tā mirst, tas jāatzīmē un jānorāda pārskatā. Atkarībā no tā, kurā pētījuma brīdī zivi eitanazē, var zivi paturēt, lai tai veiktu histopatoloģisko analīzi (zivi fiksēt iespējamas histopatoloģijas vajadzībām).

Manipulācijas ar ikriem un zivju kāpuriem

Ikru ievākšana no vaislas pāriem nākamās paaudzes iegūšanai

36. Pārejot no paaudzes F0 uz paaudzi F1, ikrus ievāc 4. testa nedēļas pirmajā dienā (vai vajadzības gadījumā pirmajās divās dienās), bet no paaudzes F1 uz paaudzi F2 — 18. nedēļas pirmajā dienā (vai attiecīgi pirmajās divās dienās). 18. testa nedēļa atbilst pieaugušām paaudzes F1 zivīm 15 npa (nedēļas pēc apaugļošanas). Lai nodrošinātu, ka visi no vaislas pāra ievāktie ikri ir no viena nārsta, ir svarīgi no katras tvertnes dienu pirms ikru ievākšanas iztīrīt visus iepriekšējos ikrus. Pēc nārsta medaku mātītes dažkārt ikrus līdz brīdim, kad tos var novietot uz substrāta, tur pie uroģenitālās atveres. Ja tvertnē substrāta nav, ikri būs vai nu pie mātītes, vai tvertnes dibenā. Atkarībā no to novietojuma ikrus 4. testa nedēļā (F0) vai 18. testa nedēļā (F1) vai nu uzmanīgi noņem no mātītes, vai ar sifonu noņem no tvertnes dibena. Visus vienā apstrādes reizē ievāktos ikrus pirms ievietošanas inkubācijas kamerās apvieno.

37. Ikru pavedienus, kas iznērstos ikrus notur kopā, noņem. No katra vaislas pāra (1 pāris uz replikātu) ievāc apaugļotos ikrus (līdz 20), tos sagrupē pēc apstrādes un sistemātiski sadala pa piemērotām inkubācijas kamerām (6., 7. papildinājums). Izmantojot kvalitatīvu stereomikroskopu, var saskatīt agrīnas apaugļošanās/attīstības pazīmes, piem., apaugļošanās plēves (horija) piebriešanu, notiekošu šūnu dalīšanos vai blastulas veidošanos. Inkubācijas kameras var ievietot atsevišķos "inkubācijas akvārijos", ko izveido katrai apstrādei (kādā gadījumā tajos jāmēra ūdens kvalitātes parametri un testējamās ķimikālijas koncentrācijas), vai replikātakvārijā, kurā tur izšķīlušos kāpurus (piem., eleiteroembrijus jeb brīvi peldošos embrijus). Ja vajadzīga otrā vākšanas diena (23. testa diena), apkopo visus ikrus no abām dienām un tos sistemātiski iedala katrā apstrādes replikātā.

Ikru audzēšana līdz izšķilšanās brīdim

38. Apaugļotos ikrus pastāvīgi kustina, piem., inkubatorā laižot gaisa burbuļus vai inkubatoru vertikāli šūpojot. Ik dienas pārbauda un reģistrē apaugļoto ikru (embriju) mirstību. Nedzīvos ikrus no inkubatoriem izņem (9. papildinājums). 7. dienā pēc apaugļošanas (dpa) kustināšanu izbeidz vai samazina tā, lai apaugļotie ikri nosēstos inkubatora dibenā. Tas veicina izšķilšanos, kas parasti notiek nākamajā vai aiznākamajā dienā. Saskaita katrā apstrādes un kontroles grupā izšķīlušos īpatņus (jaunos kāpurus, eleiteroembrijus) (replikātus apvienojot). Apaugļotus ikrus, kas kontrolē nav izšķīlušies līdz divkāršotai medianālajai dienai (parasti 16. vai 18. dpa), uzskata par dzīvotnespējīgiem un atmet.

39. Katrā replikāttvertnē ievieto divpadsmit izšķīlušos īpatņus. Izšķīlušos īpatņus no inkubācijas kamerām sakopo un sistemātiski sadala pa replikāttvertnēm (7. papildinājums). To var izdarīt, pēc nejaušības principa izvēloties izšķīlušos īpatni no apstrādes grupas un tad izšķīlušos īpatni neselektīvi ievietojot replikātakvārijā. Katrā tvertnē jābūt vienādam skaitam (n=12) izšķīlušos kāpuru (ne vairāk kā 20 kāpuru katrā). Ja nav pietiekami daudz kāpuru, lai varētu aizpildīt visus apstrādes replikātus, ir ieteicams tos sadalīt tā, lai pēc iespējas lielākā skaitā replikātu būtu 12 kāpuri. Ar kāpuriem var droši veikt manipulācijas, izmantojot liela diametra stikla pipetes. Liekos kāpurus humāni nonāvē ar anestēzijas līdzekli. Pēdējās nedēļās pirms vaislas pāru izveides reģistrē dienu, kurā katrā replikātā konstatē pirmo nārstošanu.

Vaislas pāru sagatavošana

Spuru paraugošana un genotipiskā dzimuma noteikšana

40. Genotipiskā dzimuma noteikšanu spuru paraugošanas ceļā veic 9–10 npa (t. i., paaudzei F1 12.–13. testa nedēļā). Lai noteiktu īpatņa genotipisko dzimumu, visas tvertnē esošās zivis anestezē (izmantojot apstiprinātas metodes, piem., *IACUC*) un no astes spuras dorsālā vai ventrālā gala paņem nelielu audu paraugu (29). Replikāta zivis var turēt replikāttvertnē nelielos būros, vēlams, pa vienai zivij uz būri. Ja tās vienu no otras var atšķirt, katrā būrī var turēt arī divas zivis. Viena metode, kā to panākt, ir, ņemot audu paraugu, astes spuru apgriezt atšķirīgi (piem., vienai dorsālo, vienai ventrālo galu).

41. Medakas genotipisko dzimumu nosaka ar identificētu un sekvenētu gēnu (*dmy*), kas atrodas Y hromosomā. *dmy* klātbūtne liecina par liecina par XY īpatni (neatkarīgi no fenotipa), savukārt *dmy* trūkums liecina par XX īpatni (neatkarīgi no fenotipa) (30); (31). No katra spuras apgriezuma ekstrahē dezoksiribonukleīnskābi (DNS), un *dmy* klātesību vai neesību var noteikt ar polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodēm (sk. šā pielikuma C.41. nodaļas 9. papildinājumu vai 3. un 4. papildinājumu avotā (29)).

Vaislas pāru izveide

42. Izmantojot informāciju par genotipisko dzimumu, izveido XX–XY vaislas pārus neatkarīgi no ārējā fenotipa, ko var ietekmēt ekspozīcija testējamajai ķimikālijai. Nākamajā dienā pēc tam, kad noteikts katras zivs genotipiskais dzimums, pēc nejaušības principa no katra replikāta izvēlas divas XX zivis un divas XY zivis un izveido divus XX–XY vaislas pārus. Ja replikātā vai nu divu XX zivju, vai divu XY zivju nav, piemērotas zivis ņem no citiem apstrādes replikātiem. Galvenais ir iegūt ieteikto replikātu vaislas pāru skaitu (12) katrā apstrādes grupā un kontrolēs (24). Veidojot vaislas pārus, neņem zivis ar acīmredzamām anormālijām (problēmas ar peldpūsli, deformēts mugurkauls, ārkārtējas lieluma variācijas utt.). F1 reproduktīvajā fāzē katrā replikāttvertnē vajadzētu būt tikai vienam vaislas pārim.

Gandrīz pieaugušu īpatņu paraugošana un beigupunktu novērtēšana

Vaislas pāros neiekļauto zivju paraugošana

43. Pēc vaislas pāru sagatavošanas zivis, ko tālākai pavairošanai neizraugās, humāni nonāvē, lai varētu veikt gandrīz pieaugušu īpatņu beigupunktu mērījumus 12.–13. testa nedēļā (F1). Ir ļoti svarīgi ar zivīm apieties tā, lai joprojām varētu izsekot, kāds genotipiskais dzimums konkrētai zivij noteikts vaislas pāru atlases laikā. Visi savāktie dati tiek analizēti konkrētās zivs genotipiskā dzimuma kontekstā. Katru zivi izmanto dažādiem beigupunktu mērījumiem,

tostarp nosaka zivju mazuļu / gandrīz pieaugušu zivju izdzīvotību (7.–12./13. testa nedēļa (F1)), pieaugumu garumā (ja astes spura ir īsāka tāpēc, ka veikta paraugošana ģenētiskā dzimuma analīzei, var mērīt standartgarumu; kopējo garumu var mērīt tikai tad, ja *dmy* noteikšanas vajadzībām paraugota tikai astes spuras dorsālās vai ventrālās daivas gala daļa) un ķermeņa masu (t. i., slapjmasu pēc nosusināšanas), aknu vtg iRNS (vai VTG) un anālās spuras papillas (sk. 1. un 2. tabulu). Jāņem vērā, ka vaislas pāru masa un garums vajadzīgs arī apstrādes grupas vidējā pieauguma aprēķinam.

Audu paraugošana un vitelogenīna mērīšana

44. Aknas izpreparē un līdz vtg iRNS (vai VTG) mērīšanai glabā ≤ −70 °C. Zivs asti, arī anālo spuru, saglabā piemērotā fiksatorā (piem., Deividsona fiksatorā) vai nofotografē tā, lai vēlāk varētu izskaitīt anālās spuras papillas. Vajadzības gadījumā šajā laikā var paraugot un saglabāt arī citus audus (piem., gonādas). Aknu VTG koncentrāciju kvantificē ar homologu *ELISA* paņēmienu (sk. attiecībā uz medaku ieteiktās procedūras šā pielikuma C.48. nodaļas 6. papildinājumā). Alternatīvas metodes, kā kvantificēt vtg iRNS, t. i., ekstrahēt gēna *vtg I* iRNS no aknu parauga un noteikt gēna *vtg I* kopiju skaitu (uz kopējās iRNS ng) ar kvantitatīvu PĶR, izstrādājusi ASV Vides aizsardzības aģentūra (29). Mazāk resursprasīga un tehniski vienkāršāka metode ir nevis noteikt gēna *vtg* kopiju skaitu kontroles un apstrādes grupās, bet gan noteikt relatīvo (kārtas) izmaiņu gēna *vtg I* ekspresijā kontroles un apstrādes grupās.

Sekundārās dzimumpazīmes

45. Parastos apstākļos tikai dzimumgatavību sasniegušiem medaku tēviņiem ir papillas, kas kā sekundāra dzimumpazīme attīstās uz dažu anālās spuras staru savienojumplātnītēm un ir potenciāls endokrīni disruptīvas ietekmes biomarķieris. Anālās spuras papillu (to savienojumplātnīšu, kam ir papillas) skaitīšanas metode ir sniegta 8. papildinājumā. Īpatņa anālās spuras papillu skaitu izmanto arī tam, lai attiecīgo īpatni kategorizētu par ārēji fenotipisku tēviņu vai mātīti nolūkā aprēķināt vienkāršu dzimumu attiecību replikātā. Medaku, kam papillu ir vairāk nekā 0, uzskata par tēviņu; medaku, kam anālās spuras papillu nav, uzskata par mātīti.

Fekunditātes un fertilitātes novērtēšana

46. Paaudzē F0 fekunditāti un fertilitāti novērtē 1. līdz 3. testa nedēļā, bet paaudzē F1 — 15. līdz 17. testa nedēļā. 21 dienu pēc kārtas no katra vaislas pāra ik dienas savāc ikrus. Ikrus katru rītu uzmanīgi noņem no ar tīklu notvertu mātīšu pavēderes un/vai ar sifonu noņem no akvārija dibena. Katru dienu reģistrē gan katra replikātu vaislas pāra fekunditāti, gan fertilitāti. Fekunditāte (potenciālā auglība) pēc definīcijas ir iznērsto ikru skaits, bet fertilitāte (faktiskā auglība) pēc funkcionālās definīcijas ir apaugļoto un dzīvotspējīgo ikru skaits skaitīšanas laikā. Skaitīšanu veic iespējami drīz pēc ikru ievākšanas.

47. Replikātu fekunditāti ik dienas reģistrē kā ikru skaitu uz vaislas pāri; to analizē ar ieteiktajām statistiskajām procedūrām, izmantojot replikātu vidējās vērtības. Replikātu fertilitāte ir vaislas pāra auglīgo ikru kopskaits, kas dalīts ar attiecīgā pāra ikru kopskaitu. Statistiski fertilitāti analizē kā attiecību vienā replikātā. Replikāta šķilstība ir izšķīlušos īpatņu skaits, dalīts ar ievietoto embriju skaitu (parasti 20). Statistiski šķilstību analizē kā attiecību vienā replikātā.

Pieaugušu īpatņu paraugošana un beigupunktu novērtēšana

Vaislas pāru zivju paraugošana

48. Pēc 17. testa nedēļas (proti, kad veiksmīgi sākusies paaudze F2) pieaugušos paaudzes F1 īpatņus humāni nonāvē un novērtē dažādus beigupunktus (sk. 1. un 2. tabulu). Anālo spuru nofotografē, lai novērtētu spuras papillas sk. 8. papildinājumu), un/vai asti tieši aiz uroģenitālās atveres noņem un saglabā ar fiksatoru, lai papillas varētu izskaitīt vēlāk. Ja vēlas, daļu astes spuras šajā laikā var paraugot un arhivēt, lai varētu verificēt ģenētisko dzimumu (*dmy*). Vajadzības gadījumā var paņemt audu paraugu, lai varētu atkārtot *dmy* analīzi konkrētās zivs ģenētiskā dzimuma verificēšanai. Ķermeņa dobumu atver, lai to būtu iespējams caurskalot ar piemērotiem fiksatoriem (piem., Deividsona fiksatoru), un visu ķermeni iegremdē fiksatorā. Tomēr, ja pirms fiksācijas veic pienācīgu permeabilizāciju, ķermeņa dobumu atvērt nav vajadzības.

Histopatoloģija

49. Katru zivi histoloģiski izmeklē uz patoloģijām gonādiskajos audos (30) (29). Kā minēts 33. punktā, citus šajā testā izvērtētos mehānistiskos beigupunktus (t. i., VTG, SDzP un konkrētas gonādiskas histopatoloģiskās ietekmes) var ietekmēt arī sistēmiska vai citāda toksicitāte. Līdz ar to, lai varētu vieglāk saprast atbildreakcijas mehānistiskajos beigupunktos, var būt vajadzība detalizēti novērtēt arī aknu un nieru histopatoloģiju. Ja šo detalizēto izmeklēšanu tomēr neveic, jebkurā gadījumā jāatzīmē un pārskatā jānorāda histopatoloģiskajā izvērtēšanā nejauši ievērotas būtiskas anormālijas. Var apsvērt "lejupēju lasīšanu" no augstākās apstrādes grupas (salīdzinājumā ar kontroli) uz apstrādes grupu, kurā ietekme nav novērojama, taču ir ieteicams iepazīties ar histopatoloģijai veltītajiem norādījumiem (29). Parasti visus paraugus sagatavo/sadala, bet pēc tam tos nolasa patologs. Ja izmanto "lejupējās lasīšanas" ieeju, jāpiezīmē, ka procedūras *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices* (*RSCABS*) pamatā ir pieņēmums, ka, palielinoties devas līmeņiem, palielināsies arī bioloģiskā ietekme (patoloģija). Tāpēc, ja novērtē tikai vienas lielas devas atstātu ietekmi, neskatot vidējas devas, mazinās testa jauda. Šāda pieeja var būt pieņemama, ja, lai noteiktu, ka lielajai devai ietekmes nav, statistiska analīze nav vajadzīga. Šajā izvērtējumā noskaidro arī gonādisko fenotipu.

Citi novērojumi

50. *MEOGRT* sniedz datus, ko var izmantot (piem., pierādījumu svara pieejā), lai vienlaicīgi izvērtētu vismaz divu galveno veidu nelabvēlīga iznākuma ceļus (*AOP*), kas noved pie reproduktīvajiem traucējumiem: a) endokrīniski mediēti ceļi, kas disruptē hipotalāma, hipofīzes un gonādu (HHG) endokrīnisko asi, un b) neendokrīniski mediētas toksicitātes ceļi, kas izraisa izdzīvotības, pieauguma (garums un masa) un reproduktīvo rādītāju samazinājumu. Šajā testā ir iekļauti arī beigupunkti, ko parasti mēra hroniskās toksicitātes testos, piemēram, pilna dzīves cikla testā un agrīno dzīves cikla stadiju testā, un ar tiem var izvērtēt briesmas, ko rada gan neendokrīniski mediēti toksiskās iedarbības veidi, gan endokrīniski mediēti toksicitātes ceļi. Testa laikā ik dienas jānovēro uzvedība un jāatzīmē jebkādas uzvedības īpatnības. Turklāt jāreģistrē jebkāda mirstība un jāaprēķina izdzīvotība līdz zivju atlasei (6./7. testa nedēļa), izdzīvotība pēc atlases līdz gandrīz pieaugušu īpatņu paraugošanai (9.–10. npa) un izdzīvotība no pāru izveides līdz pieaugušu zivju paraugošanai.

1. tabula

Pārskats par MEOGRT beigupunktiem (*)

Dzīves cikla stadija	Beigupunkts	Paaudze
Embriji (2 npa)	Šķilstība (% un laiks līdz izšķilšanās brīdim)	F1, F2
Mazuļi (4 npa)	Izdzīvotība	F1
Gandrīz pieauguši īpatņi (9 vai 10 npa)	Izdzīvotība	F1
	Pieaugums (garums un masa)	
	Vitelogenīns (iRNS vai proteīns)	
	Sekundārās dzimumpazīmes (anālās spuras papillas)	
	Dzimumu attiecība pēc ārējām pazīmēm	
	Laiks līdz 1. nārstam	
Pieaugušas zivis (12–14 npa)	Reprodukcija (fekunditāte un fertilitāte)	F0, F1
Pieaugušas zivis (15 npa)	Izdzīvotība	F1
	Pieaugums (garums un masa)	
	Sekundārās dzimumpazīmes (anālās spuras papillas)	
	Histopatoloģija (gonādu, aknu, nieru)	

(*) Šie beigupunkti jāanalizē statistiski.

NORISES GRAFIKS

51. 2. tabulā sniegtais *MEOGRT* norises grafiks atspoguļo testa gaitu. *MEOGRT* laikā 4 nedēļas tiek eksponēti pieauguši paaudzes F0 īpatņi un 15 nedēļas — paaudzes F1 īpatņi, kā arī otrā paaudze (F2), kas tiek eksponēta līdz izšķilšanās laikam (2 npa). Kopsavilkums par *MEOGRT* posmiem ir pieejams 9. papildinājumā.

2. tabula

MEOGRT ekspozīcijas un beigupunktu mērījumu grafiks

***MEOGRT* ekspozīcijas un beigupunktu grafiks**

F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																		1	2	
Testa nedēļa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Dzīves cikla stadijas atslēga					**Embriji**					**Kāpuri**					**Mazuļi**			**Gandrīz pieauguši īpatņi**	**Pieaugušas zivis**	
Beigupunkti																				
Fekunditāte	F_0														F_1					
Fertilitāte	F_0														F_1					
Šķilstība					F_1														F_2	
Izdzīvotība						F_1						F_1						F_1		
Pieaugums				F_0								F_1						F_1		
Vitelogenīns												F_1								
Sekundārās dzimumpazīmes												F_1						F_1		
Histopatoloģija																		F_1		
Testa nedēļa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

- Eksperimenta plāns: 7 replikātu grupas
  - 5 grupas apstrādā ar testējamo ķimikāliju
  - 2 grupas ir kontroles (ja izmanto šķīdinātāju, 4)
- Grupu uzbūve:
  - 12 replikāti reprodukcijas, pieaugušu zivju patoloģiju un SDzP noteikšanai (10. līdz 18. ned.)
  - 6 replikāti šķilstības, izdzīvotības, vtg un gandrīz pieaugušu īpatņu SDzP un pieauguma noteikšanai (1. līdz 9. ned.)

SDzP: sekundārās dzimumpazīmes; ned.: nedēļa; vtg: vitelogenīns

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

52. Tā kā visām testa zivīm nosaka genotipisko dzimumu, dati par katra genotipiskā dzimuma zivīm (t. i., XY tēviņiem un XX mātītēm) analizējami atsevišķi. Ja tā nerīkojas, ievērojami samazinās analīzes statistiskā jauda. Veicot datu statistisko analīzi, vēlams ievērot procedūras, kas aprakstītas ESAO dokumentā *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* ["Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi"] (32). Sīkāki norādījumi par statistisko analīzi sniegti 10. papildinājumā.

53. Testa plānam un statistisko testu atlasei vajadzētu dot pietiekamu jaudu, lai varētu noteikt bioloģiski svarīgas izmaiņas beigupunktos gadījumos, kad jāziņo *NOEC* (32). Relevanto efektīvo koncentrāciju un parametru ziņošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma. Ir jāidentificē katra tāda beigupunkta procentuālās izmaiņas, kuru ir svarīgi noteikt vai aplēst. Eksperimenta plāns jāizstrādā tā, lai tas būtu iespējams. Maz ticams, ka visiem beigupunktiem procentuālās izmaiņas būs vienādas, un tāpat ir maz ticams, ka var izplānot reālistisku eksperimentu, kurš šiem kritērijiem atbilstu attiecībā uz visiem beigupunktiem, tāpēc, lai eksperimentu izplānotu pienācīgi, galvenā uzmanība ir jāpievērš beigupunktiem, kas ir svarīgi konkrētajam eksperimentam. 10. papildinājumā ir pieejama statistiskās analīzes plūsmas diagramma un norādījumi, kā apstrādāt datus un izvēlēties vispiemērotāko statistisko testu vai modeli. Var izmantot arī citas statistiskas pieejas, ja tās ir zinātniski pamatotas.

54. Katras replikātu kopas ietvaros jāanalizē variācijas, izmantojot dispersijas analīzi vai kontingences tabulu, kā arī pietiekamas un piemērotas statistiskās analīzes metodes, kuru pamatā ir šī analīze. Lai varētu veikt multiplo salīdzinājumu starp atsevišķo koncentrāciju un kontroļu rezultātiem, nepārtrauktas atbildreakcijas gadījumā ieteicams izmantot descendentu procedūru (piemēram, Džonkhīra–Terpstras testu). Ja dati neatbilst monotonai atbildreakcijai uz koncentrāciju, būtu jāizmanto Daneta tests vai Dannas tests [*Dunn's test*] (pēc pienācīgas datu transformēšanas, ja tāda vajadzīga).

55. Nosakot fekunditāti, ikrus skaita ik dienas, bet tos var analizēt kā ikru kopskaitu vai kā atkārtotu mērījumu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt šo beigupunktu, atrodama 10. papildinājumā. Histopatoloģijas datiem, kas ir smaguma atzīmju formā, ir izstrādāts jauns statistiskais tests — *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices* (*RSCABS*) (33).

56. Pārskatā norāda visus ar ķimikāliju apstrādātajā grupā novērotos beigupunktus, kas ievērojami atšķiras no attiecīgo kontroļu beigupunktiem.

Ar datu analīzi saistītie apsvērumi

Kompromitētu apstrādes līmeņu izmantošana

57. Nosakot, vai replikāts vai visa apstrādes grupa liecina par acīmredzamu toksicitāti un būtu no analīzes jāizslēdz, jāņem vērā vairāki faktori. Acīmredzamu toksicitāti definē kā > 4 tādus nāves gadījumus vienā replikātā laikā no 3. līdz 9. npa, ko nevar izskaidrot ar tehnisku kļūdu. Citas acīmredzamas toksicitātes pazīmes ir hemorāģijas, anormāla uzvedība, anormāla peldēšana, anoreksija un jebkuras citas klīniskas saslimšanas pazīmes. Subletālām toksicitātes pazīmēm var būt nepieciešama kvalitatīva izvērtēšana, un tā vienmēr jāveic salīdzinājumā ar atšķaidīšanai izmantotā ūdens kontrolgrupu (tikai tīrs ūdens). Ja acīmredzama toksicitāte ir novērojama augstākā līmeņa vai līmeņu apstrādēs, šīs apstrādes no analīzes cenzē.

Šķīdinātāja kontroles

58. Šķīdinātāja izmantošana ir apsverama tikai kā galējs līdzeklis, kad visas citas ķimikālijas padošanas iespējas ir jau izskatītas. Ja lieto šķīdinātāju, kopā ar to izmanto arī atšķaidīšanas ūdens kontroli. Testu beidzot, izvērtē potenciālo šķīdinātāja ietekmi. To dara, šķīdinātāja kontrolgrupu statistiski salīdzinot ar atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Visrelevantākie šajā analīzē izskatāmie beigupunkti ir pieauguma determinanti (masa), jo tos var ietekmēt vispārēja toksicitāte. Ja šajos beigupunktos konstatē statistiski nozīmīgas atšķirības starp atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, tas, vai ir kompromitēts testa derīgums, rūpīgi jāizvērtē speciālistam. Ja abu kontroļu rezultāti ir atšķirīgi, ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama atšķaidīšanas ūdens kontrolei. Ja statistiski nozīmīgu atšķirību starp abām kontrolgrupām nav, ir ieteicams testējamajai ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzināt ar abām grupām (šķīdinātāja un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupām) kopā, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama tikai šķīdinātāja vai tikai atšķaidījuma ūdens kontrolgrupai.

Testēšanas pārskats

59. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija: fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības:

— ķīmiskās identifikācijas dati;

vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (ciktāl vajadzīgs un iespējams) u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs);

daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga:

— zinātniskais nosaukums, celms (ja zināms), avots un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmākas manipulācijas.

Testa apstākļi:

— fotoperiodi

— testa plāns (piem., kameru lielums, materiāls un ūdens tilpums, testa kameru un replikātu skaits, izšķīlušos īpatņu skaits uz replikātu);

— izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjaunināšanas biežums (ja tādu izmanto, norāda šķīdināšanas aģentu un tā koncentrāciju);

— testējamās ķimikālijas dozēšanas metode (piem., sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);

— metodei raksturīgā atgūstamība un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko tās iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, hlora atlikuma līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās cietvielas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;

— nominālās testējamās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie un to standartnovirzes;

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, temperatūra (katru dienu) un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

— sīka informācija par barošanu (piem., barības veidi, avots, dotais daudzums un došanas biežums).

Rezultāti:

— Pierādījumi, ka kontroles atbilst vispārīgajiem derīguma kritērijiem:

— šādi dati par kontrolgrupu (un arī šķīdinātāja kontroli, ja tādu izmanto) un apstrādes grupām: F1 un F2 izšķilšanās rādītāji (šķilstība un laiks līdz izšķilšanās brīdim), F1 izdzīvotība pēc izšķilšanās, F1 pieaugums (garums un ķermeņa masa), F1 genotipiskais dzimums un dzimumdiferenciācija (t. i., sekundārās dzimumpazīmes — anālās spuras papillas un gonādu histoloģija), F1 fenotipiskais dzimums, F1 sekundārās dizmumpazīmes (anālās spuras papillas), F1 vtg iRNS (vai VTG proteīns), F1 histopatoloģiskais novērtējums (gonādas, aknas un nieres) un F0 un F1 reprodukcija (fekunditāte un fertiliāte — potenciālā un faktiskā auglība) (sk. 1. un 2. tabulu);

— statistiskās analīzes pieeja (regresijas analīze vai dispersijas analīze) un datu apstrāde (izmantotie statistiskie testi un modeļi);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) (p=0,05); katrai novērtētajai atbildreakcijai — EC_x (attiecīgā gadījumā) un ticamības intervāli (piem., 90 % vai 95 %) un EC_x aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficients, regresijas modeļa formula, aplēstie modeļa parametri un to standartkļūdas;

— jebkādas novirzes no šīs testēšanas metodes un novirzes no pieņemamības kritērijiem, kā arī apsvērumi attiecībā uz iespējamo ietekmi uz testa iznākumu.

60. Attiecībā uz beigupunktu mērījumiem jānorāda vidējās vērtības un to standartnovirzes (ja iespējams, gan uz replikātu, gan uz koncentrāciju).

LITERATŪRA

(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. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Available at: 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) Šā pielikuma C.15. nodaļa. Īstermiņa toksicitātes tests zivīm embrija un dzeltenummaisa attīstības posmos.

(22) Šā pielikuma C.37. nodaļa. Zivju 21 dienas tests. Estrogēniskās un androgēniskās darbības un aromatāzes inhibēšanās īstermiņa skrīnings.

(23) Šā pielikuma C.41. nodaļa. Zivju dzimumattīstības tests.

(24) Šā pielikuma C.48. nodaļa. Īsais zivju vairošanās tests.

(25) Šā pielikuma C.47. nodaļa. Zivju agrīno attīstības stadiju toksicitātes tests.

(26) Šā pielikuma C.49. nodaļa. Zivju embriju akūtās toksicitātes (*FET*) tests.

(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.

1. Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

Fekunditāte: ikru skaits.

Fertilitāte: dzīvotspējīgo ikru skaits / fekunditāte.

Garums līdz astes spuras sazarojuma vietai (GLS): garums no purna gala līdz vidējo astes spuras staru galam; to izmanto attiecībā uz zivīm, kurām grūti noteikt, kur beidzas mugurkauls (www.fishbase.org).

Šķilstība: izšķīlušos īpatņu skaits / inkubatorā ievietoto embriju skaits.

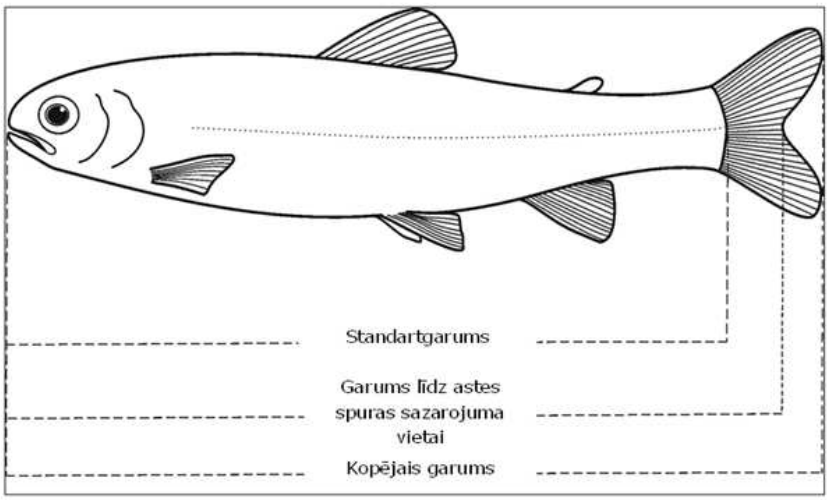
IACUC: Institucionālā dzīvnieku aprūpes un izmantošanas komiteja.

Standartgarums (SG): zivs garums, kas nomērīts no purna gala līdz pēdējā skriemeļa tālākajam galam vai astes pamatnes sānu viduslīnijas tālākajam galam. Vienkārši sakot, šajā mērījumā neņem vērā astes spuras garumu (www.fishbase.org).

Kopējais garums (KG): zivs garums no purna gala līdz astes spuras garākās daivas galam; to parasti mēra, abas daivas saspiežot gar viduslīniju. Tas ir taisnas līnijas mērījums, ko nemēra pa ķermeņa izliekuma līniju (www.fishbase.org).

1. attēls.

Dažādo izmantoto garumu ilustrācija.



ECx: (efektīvā koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, pie kuras ietekme uz testa organismiem konkrētā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontroli ir x %. Piemēram, EC_{50} ir koncentrācija, kas pēc aplēsēm konkrētā ekspozīcijas periodā ietekmē kādu testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

Caurplūdes tests ir tests, kurā testa šķīdumi visā ekspozīcijas laikā nepārtraukti plūst caur testa sistēmu.

HHG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Noslogojums: zivju slapjmasa uz ūdens tilpumdaudzumu.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$). Pie visām testa koncentrācijām, kas augstākas par *LOEC*, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie *LOEC*. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā *LOEC* (un līdz ar to arī *NOEC*) izraudzīta. Norādījumi sniegti 5. un 6. papildinājumā.

Medianālā letālā koncentrācija (LC_{50}): testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas pēc aplēsēm testa laikā ir letāla 50 % testa organismu.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*): testa koncentrācija, kura ir tieši zem *LOEC* un kurai, salīdzinot ar kontroli, noteiktā ekspozīcijas periodā nav nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Piepildītība: zivju skaits uz ūdens tilpumdaudzumu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

VTG: vitelogenīns, olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas tādu seksuāli aktīvu mātīšu organismā, kuras dēj olas / nērš ikrus.

npa: nedēļas pēc apaugļošanas.

2. Papildinājums

DAŽI PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI

Viela	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmijs	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

3. Papildinājums

TESTA MEOGRT NOSACĪJUMI

1. Ieteicamās sugas	Japānas medaka (*Oryzias latipes*)
2. Testa veids	Pastāvīgas caurplūdes
3. Ūdens temperatūra	Testa nominālā temperatūra ir 25 °C. Vidējā temperatūra katrā tvertnē testa laikā ir 24–26 °C.
4. Apgaismojuma kvalitāte	Fluorescējošās spuldzes (plaša spektra un ~150 lm/m^2) (~150 lx)
5. Fotoperiods	16 h gaismas, 8 h tumsas
6. Noslogojums	F0: 2 pieauguši īpatņi uz replikātu; F1: sāk ar, maksimums, 20 ikriem (embrijiem) uz replikātu, pie izšķilšanās skaitu samazina līdz 12 embrijiem uz replikātu un tad 9.–10. npa, gatavojoties reproduktīvajai gāzei, saglabā 2 pieaugušus īpatņus (XX–XY vaislas pāri)
7. Minimālais izmantojamais testa kameras tilpums	1,8 l (piem., 18x9x15 cm liela testa kamera)
8. Testa šķīdumu tilpumapmaiņu skaits	Vismaz 5 tilpumatjaunināšanas dienā, līdz 16 tilpumatjaunināšanām dienā (vai plūsmu 20 ml/min)
9. Testa organismu vecums iniciēšanas laikā	F0: > 12 npa, bet ieteicams nepārsniegt 16 npa
10. Organismu skaits uz replikātu	F0: 2 zivis (pāris — tēviņš un mātīte); F1: ne vairāk kā 20 zivju (ikru) uz replikātu (no F0 un F1 vaislas pāriem)
11. Apstrāžu skaits	5 apstrādes, kurām izmanto testējamo ķimikāliju, un attiecīga kontrole vai kontroles
12. Replikātu skaits uz vienu apstrādi	Vismaz 6 replikāti uz katru apstrādi, kurai izmanto testējamo ķimikāliju, un vismaz 12 replikāti kontrolei un šķīdinātāja kontrolei, ja tādu izmanto (replikātu skaitu dubulto F1 reprodukcijas fāzē)
13. Organismu skaits vienā testā	Vismaz 84 zivis F0 un 504 F1 (ja izmanto šķīdinātāja kontroli, 108 zivis F0 un 648 zivis F1). Īpatņu skaitu nosaka, skaitot īpatņus pēc eleiteroembriju stadijas beigām.
14. Barošanas režīms	Zivis *ad libitum* baro ar sāļūdens vēžveidīgajiem *Artemia* spp. (24 h veciem nauplijiem), vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas (5. papildinājumā ir pieejams tāda barošanas režīma piemērs, kas nodrošina pietiekamu augšanu un attīstību, lai nebūtu problēmu ar reprodukciju)
15. Aerācija	Neveic, ja vien izšķīdušais skābeklis nepietuvojas < 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības
16. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai athlorēts krāna ūdens

17. Ekspozīcijas periods	Principā 19 nedēļas (no F0 līdz F2 izšķilšanās laikam)
18. Bioloģiskie beigupunkti (galvenie)	Šķilstība (F1 un F2); izdzīvotība (F1, no izšķilšanās līdz 4. npa (kāpura stadijas beigas / mazuļa stadijas sākums), no 4. līdz 9. (vai 10.) npa (no mazuļa stadijas sākuma līdz gandrīz pieaugušiem īpatņiem) un no 9. līdz 15. npa (no gandrīz pieaugušiem īpatņiem līdz pieaugušu īpatņu nonāvēšanai)); pieaugums (F1, garums un masa 9. un 15. npa); sekundārās dzimumpazīmes (F1, anālās spuras papillas 9. un 15. npa); vitelogenīns (F1, vtg iRNS vai VTG proteīns 15 npa); fenotipiskais dzimums (F1, pēc gonādu histoloģijas 15 npa); reprodukcija (F0 un F1, fekunditāte un fertilitāte 21 dienu); laiks līdz nārstam (F1) un histopatoloģija (F1, gonādu, aknu un nieru histopatoloģija 15 npa)
19. Testa derīguma kritēriji	Izšķīdušais skābeklis ≥ 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības; vidējā ūdens temperatūra visā testa laikā 24–26 °C; kontrolē(-s) veiksmīgi reproducējas ≥ 65 % mātīšu; vidējā dienas fekunditāte kontrolē(-s) ir ≥ 20 ikri; kontrolēs (vidēji) ≥ 80 % šķilstība (gan paaudzē F1, gan F2); kontrolēs izdzīvotība no izšķilšanās līdz 3. npa — ≥ 80 % (vidēji) un no 3. npa līdz paaudzes īpatņu nonāvēšanai — ≥ 90 % (vidēji) (F1), testējamās ķimikālijas koncentrācijas šķīdumā apmierinoši uzturētas ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

4. papildinājums

NORĀDĪJUMI PAR TIPISKĀM KONTROLES VĒRTĪBĀM

Jāpiezīmē, ka šo kontroles vērtību pamatā ir ierobežots skaits validācijas pētījumu, un, pieredzei augot, tās var būt jāgroza.

Pieaugums

Visām zivīm, ko paraugo 9. (vai 10.) un 15. nedēļā pēc apaugļošanas (npa), izmēra masu un garumu. Ja ievēro šo protokolu, paredzamā slapjmasa 9. npa ir 85–145 mg tēviņiem un 95–150 mg mātītēm. Paredzamā masa 15. npa ir 250–330 mg tēviņiem un 280–350 mg mātītēm. Lai gan atsevišķu zivju rādītāji var no šiem diapazoniem būtiski novirzīties, tad, ja no tiem būtiski novirzās vidējā kontroles īpatņu masa, it sevišķi tad, ja tā ir mazāka, ir pamats domāt, ka ir problēmas ar barošanu, temperatūras regulēšanu, ūdens kvalitāti, slimībām vai kādu šo faktoru kombināciju.

Šķilstība

Veiksmīga šķilstība kontrolēs parasti ir ap 90 %, tomēr neparasti nav pat tik zemi rādītāji kā 80 %. Ja šķilstība ir zem 75 %, iespējams, ikri attīstības stadijā nav pietiekami kustināti vai nav pienācīgi aprūpēti, piem., nav laikus novākti nedzīvie ikri, līdz ar to sākusies sēnīšu infestācija.

Izdzīvotība

Izdzīvotības rādītāji līdz 3. npa un pēc 3. npa kontrolēs parasti ir vismaz 90 %, bet satraukumam nav pamata arī tad, ja izdzīvotība agrīnajās dzīves cikla stadijās kontrolēs ir pat tikai 80 %. Bažas raisa izdzīvotības rādītāja noslīdēšana zem 80 % (kontrolēs), kas var liecināt, ka akvārijs netiek pietiekami tīrīts, līdz ar to zivju kāpuri mirst no slimībām vai skābekļa trūkuma zema izšķīdušā skābekļa līmeņa dēļ. Nāves cēloņi var būt arī tvertnes tīrīšanas laikā radītas traumas un zivju kāpuru iekļūšana ūdens novades sistēmā.

Vitelogenīna gēns

Lai gan vitelogenīna (vtg) gēna absolūtie līmeņi, izteikti kopijās uz ng kopējās iRNS, dažādās laboratorijās var ievērojami atšķirties izmantoto procedūru vai instrumentu atšķirību dēļ, vtg līmenim kontroles mātītēs vajadzētu būt aptuveni 200 reizes lielākam nekā kontroles tēviņos. Šī attiecība bieži vien sasniedz pat 1 000–2 000, bet, ja tā ir zem 200, ir pamats aizdomām, ka paraugs ir kontaminēts vai ir problēmas ar izmantoto procedūru un/vai reaģentiem.

Sekundārās dzimumpazīmes

Tēviņiem normālais sekundāro dzimumpazīmju (kopējais to anālās spuras staru segmentu skaits, kam ir papillas) diapazons 9–10 npa ir 40–80 segmenti. Līdz 15. npa kontrolēs tēviņiem šim diapazonam vajadzētu būt aptuveni 80–120, bet mātītēm — 0. Retos gadījumos dažiem tēviņiem neizskaidrojamā kārtā papillas 9. npa vēl nav attīstījušās, bet, tā kā visiem kontroles tēviņiem tās attīstās līdz 15. npa, šīs parādības cēlonis, visticamāk, ir attīstības aizkavēšanās. Ja kontrolē papillas ir novērojamas mātītēm, populācijā ir XX tēviņi.

XX tēviņi

Normālā XX tēviņu incidence kultūrā 25 °C temperatūrā ir aptuveni 4 % vai mazāk, un tā pieaug, temperatūrai palielinoties. XX tēviņu proporcija populācijā jātiecas minimalizēt. Tā kā XX tēviņu incidencei konstatējams ģenētisks komponents un tāpēc tā ir pārmantojama, iedarbīgs līdzeklis, kā samazināt XX tēviņu incidenci populācijā, ir audzējamā krājuma monitorēšana un rūpēšanās, lai krājums netiktu pavairots ar XX tēviņiem.

Nārsts

Nārsts kontroles replikātos pirms fekunditātes novērtēšanas būtu jāmonitorē ik dienas. Nārsta pazīmes kontroles pāros var kvalitatīvi novērtēt vizuāli. Līdz 12.–14. npa nārstojušai vajadzētu būt lielākajai daļai kontroles pāru. Ja līdz šim laikam nārstojošo pāru skaits ir mazs, ir pamats bažām par zivju veselību, briedumu vai labklājību.

Fekunditāte (potenciālā auglība)

Veselas, labi barotas medakas 12–14 npa parasti nērš ikrus ik dienas (15 līdz 50 ikrus dienā). 16 no ieteicamajiem 24 kontroles vaislas pāriem (> 65 %) vajadzētu iznērst vairāk nekā 20 ikrus dienā uz vienu pāri, un šis rādītājs var sasniegt pat aptuveni 40 ikrus dienā. Mazāka vērtība var liecināt, ka vaislas pāri ir nenobrieduši, nepietiekami baroti vai neveseli.

Fertilitāte (faktiskā auglība)

Kontroles vaislas pāru auglīgo ikru proporcija parasti ir ap 90 %, un nav reti gadījumi, kad tās sasniedz vai pārsniedz 95 %. Ja kontroles ikru fertilitātes rādītājs nesasniedz 80 %, ir pamats bažām, ka dzīvnieki ir neveseli vai audzēšanas apstākļi ir neoptimāli.

5. papildinājums

BAROŠANAS REŽĪMA PIEMĒRS

1. tabulā ir sniegts tāda barošanas režīma piemērs, kas nodrošina pietiekamu augšanu un attīstību, lai nebūtu problēmu ar reprodukciju. Novirzes no šā barošanas režīma var būt pieņemamas, bet ir ieteicams tās testēt, lai pārliecinātos, ka novērojama pieņemama augšana un reprodukcija. Ievērojot ieteicamo barošanas režīmu, pirms testa sākšanas jānosaka sāļūdens garneļu sausmasa konkrētā biezas sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumā. To var izdarīt, nosverot konkrētu biezās sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumu, kas uz iepriekš nosvērtām plātnēm 24 stundas žāvēts 60 °C temperatūrā. Lai ņemtu vērā sāls daudzumu suspensijā, izžāvē un nosver identisku suspensijā izmantotā sāls šķīduma tilpumdaudzumu un to atņem no izžāvētās sāļūdens garneļu suspensijas masas. Alternatīva ir sāļūdens garneles pirms žāvēšanas izfiltrēt un noskalot ar destilētu ūdeni; tad nav vajadzības mērīt "tukšā sāls parauga" masu. Iegūto sāļūdens garneļu sausmasu pēc tabulas pārrēķina biezās sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumā, kas dodams katrai zivij. Turklāt, lai pārliecinātos, ka zivīm tiek dots pareizais sāļūdens garneļu sausmasas daudzums, biezo sāļūdens garneļu suspensijas alikvotas ieteicams ik nedēļas nosvērt.

1. tabula.

Barošanas režīma piemērs

Laiks (pēc izšķilšanās)	Sāļūdens garneles (mg sausmasas uz zivi dienā)
1. diena	0,5
2. diena	0,5
3. diena	0,6
4. diena	0,7
5. diena	0,8
6. diena	1,0
7. diena	1,3
8. diena	1,7
9. diena	2,2
10. diena	2,8
11. diena	3,5
12. diena	4,2
13. diena	4,5

Laiks (pēc izšķilšanās)	Sāļūdens garneles (mg sausmasas uz zivi dienā)
14. diena	4,8
15. diena	5,2
16.–21. diena	5,6
4. nedēļa	7,7
5. nedēļa	9,0
6. nedēļa	11,0
7. nedēļa	13,5
8. nedēļa (nonāvēšana)	22,5

6. Papildinājums

IKRU INKUBĀCIJAS KAMERU PARAUGI

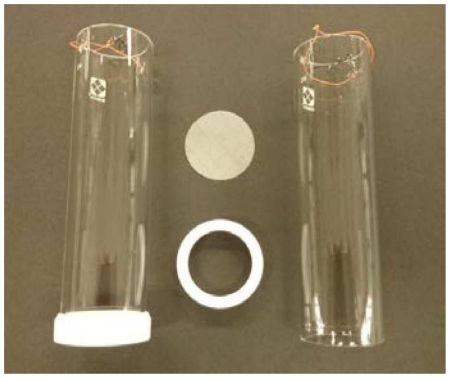
A piemērs





Šis inkubators sastāv no transversāli sadalītas stikla centrifūgas mēģenes, ko savieno nerūsošā tērauda manšete un vietā notur uzskrūvējamais centrifūgas vāciņš. Cauri vāciņam iet neliels stikla vai nerūsošā tērauda stobriņš, kuru novieto netālu no mēģenes apaļā dibena un pa kuru viegli laiž gaisa burbulīšus, lai ikrus suspendētu un mazinātu risku, ka starp tiem izplatīsies saprofītiskas sēnīšinfekcijas, reizē atvieglojot ķimikāliju apmaiņu starp inkubatoru un tvertni, kurā tas atrodas.

B piemērs





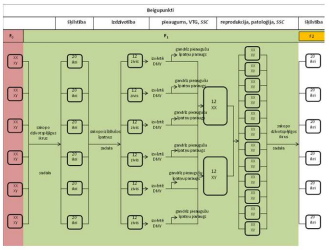
Šis inkubators sastāv no cilindriska stikla stobriņa (diametrs: 5 cm, garums: 10 cm) un nerūsošā tērauda stieples sieta (0, 25 φ un 32 meši), kas piestiprināts stobriņa apakšai ar PTFE gredzenu. Inkubatorus tvertnēs iekar no paceļama stieņa un vertikāli krata (aptuveni 5 cm amplitūdā) medakas ikriem piemērotā ciklā (aptuveni reizi 4 sekundēs).

7. Papildinājums

REPLIKĀTU SAKOPOŠANAS UN SADALĪŠANAS SHĒMA TESTĒŠANAS METODEI MEOGRT

1. attēls.

Replikātu sakopošana un sadalīšana testā *MEOGRT*. Attēlā redzama viena apstrāde vai puse no kontroles. Sakopošanas dēļ replikātu identitāte visā testā nav vienāda. Jāņem vērā, ka jēdziens "ikri" attiecas uz dzīvotspējīgiem apaugļotiem ikriem (kas ekvivalenti embrijiem).



Apstrādes un replikācija

Testēšanas metodē ieteicams izmantot piecas apstrādes ar testējamo ķimikāliju (izmantojot tehniskās tīrības pakāpes materiālu) un negatīvo kontroli. Replikātu skaits uz apstrādi visā *MEOGRT* laikā nav vienāds, un replikātu skaits kontrolē ir divreiz lielāks nekā katrā atsevišķajā apstrādē. Paaudzē F0 katrā apstrādē ar testējamo ķimikāliju ir seši replikāti, savukārt negatīvajā kontrolē ir 12 replikāti. Ir ļoti ieteicams neizmantot šķīdinātājus, bet, ja tos tomēr izmanto, *MEOGRT* pārskatā iekļaujams gan šķīdinātāja izmantošanas, gan šķīdinātāja izvēles pamatojums. Ja izmanto šķīdinātāju, turklāt nepieciešamas divu veidu kontroles — a) šķīdinātāja kontrole un b) negatīvā kontrole. Katrā no abām kontrolgrupām visos *MEOGRT* laika grafika punktos jābūt visiem vajadzīgajiem replikātiem. Kamēr testa organismi attīstās paaudzē F1 (un F2 — līdz izšķilšanās brīdim), šī replikātu struktūra nemainās. Tomēr, kad organismi ir pieauguši un tiek sagatavoti paaudzes F1 vaislas pāri, reproduktīvo pāru replikātu skaitu uz apstrādi optimālā gadījumā dubulto; tāpēc katrā apstrādē ar testējamo ķimikāliju ir līdz 12 replikātpāriem, bet kontrolgrupā — 24 replikātpāri (un šķīdinātāja kontrolē vēl 24, ja tāda vajadzīga). F1 pāru embriju izšķilšanos nosaka pēc tās pašas replikātu struktūras kā F0 pāru embriju gadījumā — sākotnēji seši replikāti uz apstrādi ar testējamo ķimikāliju un 12 uz kontrolgrupu.

8. Papildinājums

ANĀLĀS SPURAS PAPILLU SKAITĪŠANA

Galvenie materiāli un reaģenti

— Stereomikroskops (ar kameru vai bez tās)

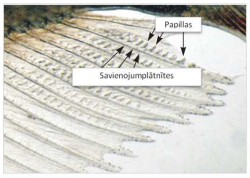
— Fiksators (piem., Deividsona; izmantot Buēna šķīdumu nav ieteicams), ja skaitīšanu neveic no attēla

Procedūras

Pēc nekropsijas anālo spuru nofotografē, lai būtu ērti izskaitīt anālās spuras papillas. Lai gan ieteicamā metode ir ar fotografēšanu, ir iespējams arī anālo spuru aptuveni 1 minūti fiksēt ar Deividsona fiksatoru vai citu piemērotu fiksatoru. Lai izskaitīt papillas būtu vieglāk, ir svarīgi, lai anālā spura fiksācijas laikā būtu izstiepta plakana. Ķermeni ar anālo spuru var Deividsona fiksatorā vai citā piemērotā fiksatorā turēt līdz analīzei. Izskaita, cik savienojumplātnītēm (sk. **1. attēlu**) ir papillas, kas iznāk no savienojumplātnītes aizmugurējās malas.

1. attēls.

Anālās spuras papillas



9. Papildinājums

DETALIZĒTS MEOGRT LAIKA GRAFIKS

1.–3. testa nedēļa (F0)

Nārstojošas paaudzes F0 zivis, kas atbilst atlases kritērijiem (sk. 16.–20. punktu) trīs nedēļas eksponē testējamajai ķimikālijai, lai attīstības laikā būtu eksponētas gametas un gonādu audi. Katrā replikāttvertnē tur vienu vaislas pāri (kurā ir viena XX mātīte un viens XY tēviņš). Iznērstos ikrus savāc, saskaita un 21 dienu (no 1. testa dienas) novērtē to fertilitāti.

4. testa nedēļa (F0 un F1)

Ir vēlami apaugļotus dzīvotspējīgus ikrus (embrijus) savākt vienā dienā; tomēr, ja embriju nav pietiekami daudz, tos var savākt divās dienās. Ja tos savāc divās dienās, visus apstrāžu embrijus, kas savākti pirmajā dienā, sakopo ar tiem, ko savāc otrajā dienā. Tad visus katrai apstrādei sakopotos embrijus pēc nejaušības principa sadala pa replikātinkubatoriem (20 embriji uz inkubatoru). Ik dienas pārbauda un reģistrē apaugļoto ikru (embriju) mirstību. Nedzīvos ikrus no inkubatoriem izņem (par to, ka apaugļoti ikri ir nedzīvi, jo īpaši agrīnās stadijās, var liecināt izteikts caurspīdības zudums un krāsas maiņa, ko rada olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, kā dēļ tie kļūst balti un necaurredzami; *OECD* (2010)).

Piezīme. Ja kaut vienai apstrādei ikri jāvāc arī otrā dienā, tāpat jārīkojas ar visām apstrādēm (arī kontrolēm). Ja pēc otrās ievākšanas dienas embriju skaits kādā apstrādē nav pietiekams 20 embrijiem uz inkubatoru, konkrētās apstrādes embriju skaitu samazina līdz 15 embrijiem uz inkubatoru. Ja nav arī 15 embriju uz inkubatoru, replikātinkubatoru skaitu samazina tiktāl, ka embriju pietiek 15 embrijiem uz inkubatoru. Vēl ir iespējams paaudzē F0 apstrādei un kontrolēm ņemt vairāk vaislas pāru, lai iegūtu vairāk ikru un varētu sasniegt ieteicamos 20 ikrus uz replikātu.

24. testa dienā paaudzes F0 vaislas pārus humāni nonāvē un reģistrē to masu un garumu. Vajadzības gadījumā F0 vaislas pārus var turēt vēl 1–2 dienas, lai paaudzi F1 varētu iegūt vēlreiz.

5.–6. testa nedēļa (F1)

Lai veicinātu izšķilšanos, inkubatoros esošo ikru kustināšanu vienu līdz divas dienas pirms gaidāmās izšķilšanās izbeidz vai samazina. Katru dienu jaunizšķīlušos mazuļus sakopo pēc apstrādes un sistemātiski sadala pa konkrētas apstrādes mazuļu replikāttvertnēm, kur nav vairāk kā 12 izšķīlušos mazuļu. To dara šādi: pēc nejaušības principa izvēlas jaunizšķīlušos mazuļus un tos nešķirojot pēc kārtas liek konkrētās apstrādes replikātos, līdz visos apstrādes replikātos ir 12 jaunizšķīlušies mazuļi. Ja mazuļu nav pietiekami daudz visu replikātu aizpildīšanai, cenšas panākt, lai pēc iespējas daudzos replikātos būtu 12 mazuļi F1 fāzes sākšanai.

Ikrus, kas kontrolē nav izšķīlušies līdz divkāršotai medianālajai dienai, uzskata par dzīvotnespējīgiem un atmet. Katra replikāta jaunizšķīlušos mazuļu skaitu reģistrē un aprēķina šķilstību.

7.–11. testa nedēļa (F1)

Visos replikātos ik dienas pārbauda un reģistrē zivju kāpuru izdzīvotību. 43. testa dienā reģistrē izdzīvojušo zivju skaitu katrā replikātā, kā arī replikātā sākotnēji ievietoto jaunizšķīlušos mazuļu skaitu (nomināli divpadsmit). Tā var aprēķināt, cik procenti dzīvnieku pēc izšķilšanās sasniedz gandrīz pieaugušu īpatņu stadiju.

12. testa nedēļa (F1)

78.–85. testa dienā no katras zivs astes spuras paņem nelielu paraugu, lai noteiktu konkrētā īpatņa genotipisko dzimumu (t. i., veic spuru paraugošanu). Izmantojot šo informāciju, izveido vaislas pārus.

Trīs dienu laikā pēc katras zivs genotipiskā dzimuma noteikšanas pēc nejaušības principa izraugās 12 vaislas pārus uz katru apstrādi un 24 pārus uz katru kontroli. No katra replikāta pēc nejaušības principa izraugās divas XX un divas XY zivis, tās sakopo pēc dzimuma un tad no to vidus pēc nejaušības principa izveido vaislas pāri (t. i., XX–XY pāri). Izveido vismaz 12 replikātus uz katru apstrādi ar ķimikāliju un vismaz 24 replikātus kontrolei (viens vaislas pāris uz replikātu). Ja replikātā sakopošanai vai nu divu XX zivju, vai divu XY zivju nav, zivis ar attiecīgo dzimuma genotipu ņem no citiem attiecīgās apstrādes replikātiem.

Atlikušās zivis (ne vairāk kā 8 uz replikātu) humāni nonāvē un paraugo, lai noskaidrotu dažādos gandrīz pieaugušo īpatņu beigupunktus. Visu gandrīz pieaugušo īpatņu paraugu *dmy* datus (XX vai XY) saglabā, lai nodrošinātu, ka visus beigupunktu datus ir iespējams sasaistīt ar katras konkrētās zivs ģenētisko dzimumu.

13.–14. testa nedēļa (F1)

Gandrīz pieaugušo īpatņu vaislas pāriem pieaugot, ekspozīciju turpina. 98. testa dienā (t. i., dienā pirms dienas, kurā sāk ikru ievākšanu), ikrus gan izņem no akvārijiem, gan noņem no mātītēm.

15.–17. testa nedēļa (F1)

Katrā replikātā 21 dienu pēc kārtas ievāc iznērstos ikrus un novērtē to fekunditāti un fertilitāti.

18. testa nedēļa (4. testa nedēļas atkārtojums) (F1 un F2)

120. testa dienas rītā katrā replikāttvertnē ievāc ikrus. Ievāktos ikrus novērtē un tos katra vaislas pāra ikrus, kas ir apaugļoti, pēc pavedienu noņemšanas sakopo pēc apstrādes un sistemātiski sadala ikru inkubācijas kamerās (20 apaugļoti ikri uz inkubatoru). Inkubatorus var ievietot atsevišķās "inkubatortvertnēs", ko sagatavo katrai apstrādei, vai replikāttvertnē, kurā izšķīlušies kāpuri paliks pēc izšķilšanās. Ir vēlami embrijus savākt vienā dienā; tomēr, ja embriju nav pietiekami daudz, tos var savākt divās dienās. Ja tos savāc divās dienās, visus apstrāžu embrijus, kas savākti pirmajā dienā, sakopo ar tiem, ko savāc otrajā dienā. Tad visus katras apstrādes sakopotos embrijus pēc nejaušības principa sadala pa replikātinkubatoriem (20 embriji uz inkubatoru). Piezīme. Ja kaut vienai apstrādei ikri jāvāc arī otrā dienā, tāpat jārīkojas ar visām apstrādēm (arī kontrolēm). Ja pēc otrās ievākšanas dienas embriju skaits kādā apstrādē nav pietiekams 20 embrijiem uz inkubatoru, konkrētās apstrādes embriju skaitu samazina līdz 15 embrijiem uz inkubatoru. Ja nav arī 15 embriju uz inkubatoru, replikātinkubatoru skaitu samazina tiktāl, ka embriju pietiek 15 embrijiem uz inkubatoru.

121. testa dienā (vai 122. testa dienā, lai būtu drošība, ka paaudze F2 sākta veiksmīgi) F1 vaislas pārus humāni nonāvē un analizē, lai noskaidrotu pieaugušo īpatņu beigupunktus. Vajadzības gadījumā F1 vaislas pārus var turēt vēl 1–2 dienas, lai paaudzi F2 varētu iegūt vēlreiz.

19.–20. testa nedēļa (F2)

Lai veicinātu izšķilšanos, inkubatoros esošo ikru kustināšanu vienu līdz divas dienas pirms gaidāmās izšķilšanās izbeidz vai samazina. Ja testu izbeidz, kad beidzas F2 izšķilšanās, izšķīlušos mazuļos katru dienu saskaita un atmet. (Embrijus, kas nav izšķīrušies pat pēc ilgākas inkubācijas, kas kontrolei ir divkārša medianālā izšķilšanās diena, uzskata par dzīvotnespējīgiem.)

10. papildinājums

STATISTISKĀ ANALĪZE

MEOGRT iegūtie bioloģiskie dati pēc veida nav unikāli, un līdzīgu datu (izņemot patoloģijas datus) analizēšanai ir izstrādātas daudzas piemērotas statistiskās metodes atkarībā no datu īpašībām, tostarp normalitātes, dispersiju homogenitātes, tā, vai pētījuma plāns ir piemērots hipotēzes testēšanai vai regresijas analīzei, parametriskajiem vai neparametriskajiem testiem utt. Ieteicamās statistiskās analīzes principā atbilst ESAO ieteikumiem attiecībā uz ekotoksiskuma datiem (*OECD* 2006) un *MEOGRT* datu analīzes lēmumu pieņemšanas plūsmas diagramma ir sniegta 2. attēlā.

Tiek pieņemts, ka visbiežāk datu kopu uzrādītās atbildreakcijas būs monotonas. Turklāt jāapdomā, vai izmantot vienpusēju vai abpusēju statistisko testu. Ja vien nav kāda bioloģiska pamata domāt, ka vienpusējs tests būtu nepiemērots, ieteicams izvēlēties vienpusēju testu. Lai gan nākamajā sadaļā ieteikti konkrēti statistiskie testi, tomēr, ja konkrēto *MEOGRT* iegūto datu apstrādei ir izstrādātas piemērotākas un/vai jaudīgākas statistiskās metodes, tad, lai pilnvērtīgi izmantotu šīs priekšrocības, izmanto attiecīgos statistiskos testus.

MEOGRT dati jāanalizē par katru genotipisko dzimumu atsevišķi. Ir divas stratēģijas, kā analizēt datus par zivīm ar invertētu dzimumu (XX tēviņiem vai XY mātītēm): 1) visus datus par dzimuminvertētām zivīm visā testā cenzēt, izņemot datus par dzimuminversijas prevalenci katrā replikātā; 2) visus datus par visām dzimuminvertētajām zivīm datu kopā paturēt un analizēt pēc genotipa.

Histopatoloģiskie dati

Histopatoloģiskos datus pārskatā norāda smaguma atzīmju formā, un to izvērtē ar jaunizstrādātu statistisko procedūru — *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices* (*RSCABS*), (*Green et al.*, 2014). Rao–Skota korekcija ļauj saglabāt informāciju par replikāciju; procedūra *by Slices* ietver bioloģisko ekspektāciju, ka smaguma atzīmes palielināsies, pieaugot apstrādes koncentrācijām. *RSCABS* rezultāti norāda, kurām apstrādēm katras diagnozes gadījumā ir lielāka patoloģiju prevalence nekā kontrolēm un kāds ir asociētais smaguma līmenis.

Dati par fekunditāti

Fekunditātes datus analizē, izmantojot descendentu Džonkhīra–Terpstras vai Viljamsa testu, kurā nosaka apstrādes efektus, ar nosacījumu, ka dati liecina par monotonu atbildreakciju uz koncentrāciju. Izmantojot descendentu testu, visus salīdzinājumus izdara nozīmības līmenī 0,05 bez korekcijām pēc veikto salīdzinājumu skaita. Paredzams, ka dati atbildīs monotonai atbildeakcijai uz koncentrāciju, bet par to var pārliecināties, vai nu datus apskatot, vai izveidojot apstrāžu vidējo vērtību lineāros un kvadrātiskos kontrastus pēc datu hierarhizēšanas. Ja vien nav tā, ka kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais — nenozīmīgs, veic trenda testu. Pretējā gadījumā, ja dati ir sadalīti normāli un dispersijas ir homogēnas, apstrāžu efektus nosaka ar Daneta testu. Ja šīs prasības nav izpildītas, izmanto Dannas testu ar Bonferroni–Holma [*Bonferroni–Holm*] korekciju. Visus norādītos testus veic neatkarīgi no vispārīga F vai Kraskela–Volisa [*Kruskal-Wallis*] testa. Sīkāku informāciju sk. *OECD* 2006.

Ja tam ir statistisks pamatojums, var izmantot alternatīvas metodes, piem., vispārinātu lineāru modeli ar Puasona kļūdām attiecībā uz ikru skaitīšanu (bez transformācijas) (*Cameron and Trividi*, 2013). Ja izmanto alternatīvu pieeju, ieteicams lūgt statistikas speciālista padomu.

Dienišķa ikru skaitīšana vienas paaudzes ietvaros

ANOVA modeli iegūst ar Y=laiks*laiks+apstrāde+*apstrāde+laiks*apstrāde+*laiks*apstrāde ar nejaušajiem efektiem, kuri ir replikāts(paaudze*apstrāde) un laiks*replikāts(apstrāde), kas pieļauj vairākām paaudzēm abu tipu nevienādās dispersijas elementus. Šeit "laiks" apzīmē ikru skaitīšanas biežumu (piem., dienu vai nedēļu). Tā ir atkārtotu mērījumu analīze: atkārtotos mērījumus veido korelācijas starp vienu un to pašu replikātu novērojumiem.

Apstrādes galvenos efektus testē ar Daneta (vai Daneta–Sjui) testu, kurā veic korekcijas pēc salīdzinājumu skaita. Ir vajadzīgas korekcijas attiecībā uz galveno efektu "paaudze" vai "laiks", jo šo divu efektu gadījumā "kontroles" līmeņa nav un potenciāli interesanti var būt salīdzināt katru līmeņu pāri. Šo divu galveno efektu gadījumā, ja F tests attiecībā uz galveno efektu ir nozīmīgs līmenī 0,05, šā faktora līmeņu pārveida salīdzinājumus var testēt līmenī 0,05 bez tālākām korekcijām.

Modelis ietver divu un triju faktoru mijiedarbību tā, ka galvenais efekts attiecībā uz laiku var nebūt nozīmīgs, lai gan laikam ir ievērojama ietekme uz rezultātiem. Tā, ja divu vai trīs faktoru mijiedarbība, kurā iesaistīts laiks, ir nozīmīga līmenī 0,05, laika līmeņu salīdzinājumus nozīmības līmenī 0,05 var pieņemt bez tālākām korekcijām.

Tad seko F testi, kuros noskaidro apstrādes nozīmību laikā, — tā sauktie *ANOVA* tabulas "griezumi" [*slices*]. Piemēram, ja griezums, kas atbilst paaudzes F1 apstrādei un laikam 12, ir nozīmīgs līmenī 0,05, tad pārveida salīdzinājumus attiecībā uz F1 apstrādi un laiku 12 var pieņemt līmenī 0,05 bez tālākām korekcijām. Tas pats attiecas uz testiem attiecībā uz laiku paaudzes F1 un apstrādes kontekstā un paaudzi konkrēta laika un apstrādes kontekstā.

Visbeidzot, ja salīdzinājums neietilpst nevienā no minētajām kategorijām, salīdzinājumi jākoriģē atbilstoši p vērtībām, izmantojot Bonferroni–Holma korekciju. Plašāka informācija par šādu modeļu analīzi atrodama *Hocking* (1985) un *Hochberg and Tamhane* (1987).

Vēl viena iespēja ir reģistrēt jēldatus un tos pētījuma pārskatā norādīt kā katras dienas fekunditāti (ikru skaits) uz replikātu. Pēc jēldatiem aprēķina katra replikāta vidējo vērtību un tai veic kvadrātsaknes transformāciju. Transformētajām replikātu vidējām vērtībām piemēro vienvirziena *ANOVA*, bet pēc tam Daneta kontrastus. Var būt lietderīgi katras apstrādes un/vai replikāta fekunditātes datus apskatīt arī vizuāli, izmantojot izkliedes diagrammu, kas ilustrē datus attiecībā pret laiku. Tā var neformāli novērtēt iespējamos efektus laikā.

Visi citi bioloģiskie dati

Visu statistisko analīžu pamatā ir pieņēmums, ka, ja devas izraudzītas pienācīgi, dati būs monotoni. Tātad tiek pieņemts, ka dati ir monotoni, un to monotonitāti formāli izvērtē ar lineāriem un kvadrātiskiem kontrastiem. Ja dati ir monotoni, ieteicams izmantot Džonkhīra–Terpstras replikātu mediānu trenda testu (*OECD* 2006 ieteikums). Ja kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais — nenozīmīgs, dati uzskatāmi par nemonotoniem.

Ja dati ir nemonotoni, it sevišķi tāpēc, ka atbildreakcija uz vienu vai divām augstāko līmeņu apstrādēm ir mazāka, jāapsver iespēja datu kopu cenzēt, proti, to analizēt, šīs apstrādes neņemot vērā. Šis lēmums būs jāpieņem, profesionāli izvērtējot visus pieejamos datus, it sevišķi datus, kas liecina par acīmredzamu toksicitāti šajos apstrādes līmeņos.

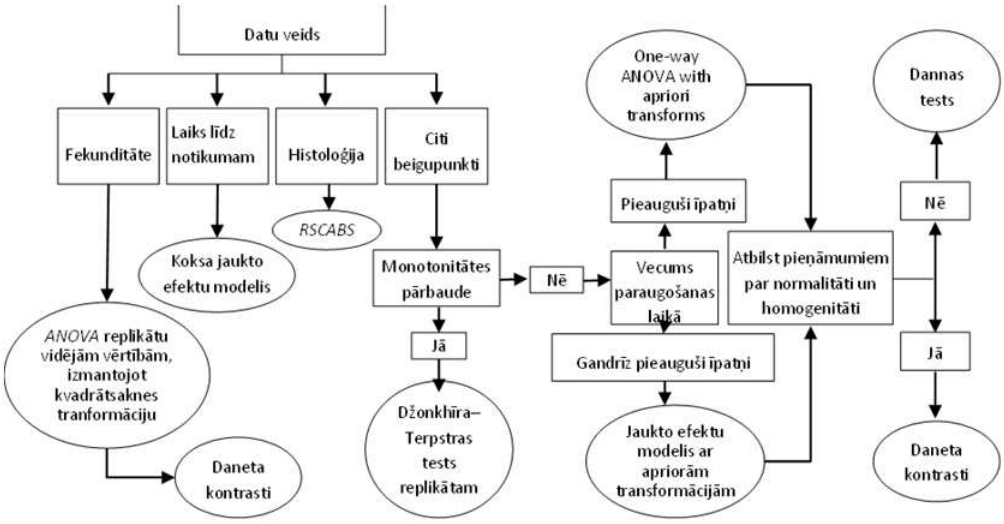
Nav ieteicams transformēt garuma un masas datus, lai gan tas dažkārt var būt nepieciešams. Savukārt attiecībā uz vitelogenīna datiem ieteicama logaritmiska transformācija, attiecībā uz SDzP datiem (anālās spuras papillas) — kvadrātsaknes transformācija; attiecībā uz datiem par šķilstības rādītāju, izdzīvotības procentuālo daļu, dzimumu attiecību un auglīgo ikru procentuālo daļu — arksinusa–kvadrātsaknes transformācija. Laiks līdz izšķilšanās brīdim un laiks līdz pirmajam nārstam jāuztver kā dati par laiku līdz notikumam, un atsevišķu embriju neizšķilšanās konkrētajā periodā vai replikātu nenārstošana jāuztver kā labēji cenzēti dati. Laiks līdz izšķilšanās brīdim jāaprēķina no katra replikāta medianālās izšķilšanās dienas. Šos beigupunktus aprēķina, izmantojot Koksa proporcionālo apdraudējumu modeli jauktiem efektiem.

Bioloģiskajos datos par pieaugušo īpatņu paraugiem ir viens mērījums uz replikātu, proti, katrā replikātakvārijā ir viena XX zivs un viena XY zivs. Tāpēc ieteicams replikātu vidējām vērtībām piemērot vienvirziena *ANOVA*. Ja ir spēkā *ANOVA* pieņēmumi (normalitāte un dispersijas homogenitāte, kas *ANOVA* atlikumos novērtēta attiecīgi ar Šapiro–Vilka [*Shapiro–Wilk*] testu un Levīna [*Levene*] testu), tad, lai noteiktu apstrādes, kas atšķiras no kontroles, izmanto Daneta kontrastus. Savukārt, ja *ANOVA* pieņēmumi nav spēkā, tad, lai noteiktu, kuras apstrādes atšķiras no kontroles, izmanto Dannas testu. Līdzīgu procedūru teicams izmantot attiecībā uz datiem procentuālo daļu formā (fertilitāte, šķilstība un izdzīvotība).

Bioloģiskajos datos par gandrīz pieaugušo īpatņu paraugiem ir 1 līdz 8 mērījumi uz replikātu, proti, genotipiskā dzimuma vidējo vērtību replikātā var veidot dažāds īpatņu skaits. Tāpēc ir ieteicams izmantot *ANOVA* modeli jauktiem efektiem, bet pēc tam Daneta kontrastus, ja spēkā normalitātes un dispersijas homogenitātes pieņēmumi (attiecībā uz jaukto efektu *ANOVA* atlikumiem). Ja pieņēmumi nav spēkā, tad, lai noteiktu, kuras apstrādes atšķiras no kontroles, izmanto Dannas testu.

2. attēls.

Plūsmas diagramma ar MEOGRT datu analīzei ieteicamajām statistiskajām procedūrām.



LITERATŪRA

(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. **ABINIEKU KĀPURU AUGŠANAS UN ATTĪSTĪBAS TESTS (*LAGDA*)**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai Nr. 241 (2015). Vajadzībai izstrādāt un validēt testu, ar kuru iespējams konstatēt un raksturot, kādas nelabvēlīgas sekas rada abinieku ekspozīcija toksiskām ķimikālijām, pamatā ir bažas, ka ķimikāliju līmeņi vidē var atstāt nelabvēlīgu ietekmi gan uz cilvēku, gan citu dzīvo dabu. ESAO testēšanas vadlīnijā "Abinieku kāpuru augšanas un attīstības tests (*LAGDA*)" aprakstīts toksiskuma tests, kurā izmanto tādas sugas abiniekus, kas ļauj ņemt vērā augšanu un attīstību no apaugļošanas līdz agrīnajai mazuļa stadijai. Šajā testā (kura garums parasti ir 16 nedēļas) tiek novērtēta agrīnā attīstība, metamorfoze, izdzīvotība, pieaugums un daļēja reproduktīvās sistēmas nobriešana. Ar to var novērtēt arī dažādus citus beigupunktus, kas dod iespēju diagnostiski izvērtēt domājamas endokrīni disruptīvas ķimikālijas (EDĶ) vai citu veidu ontoģenētiskos un reproduktīvos toksikantus. Šajā testēšanas metodē aprakstītās metodes pamatā ir validācijas darbs, ko ar Āfrikas piešvardi (*Xenopus laevis*) veikusi ASV Vides aizsardzības aģentūra (ASV VAA), un palīgdarbs Japānā (1). Lai gan augšanas un attīstības testēšanas protokolam varētu izmantot arī citu sugu abiniekus (svarīgs priekšnoteikums ir spēja noteikt ģenētisko dzimumu), konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti, kas izklāstīti šajā testēšanas metodē, attiecas tikai uz *Xenopus laevis*.

2. *LAGDA* ir augstākas pakāpes abinieku tests, kas ļauj iegūt pilnīgāku koncentrācijas–atbildreakcijas informāciju par nelabvēlīgo ietekmi un tāpēc ir piemērots apdraudējumu apzināšanai un raksturošanai un ekoloģisko risku novērtēšanai. Tests atbilst ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara 4. līmenim, kurā ietilpst *in vivo* testi, kas nodrošina arī datus par nelabvēlīgo ietekmi uz endokrīni relevantiem beigupunktiem (2). Vispārējais eksperimenta plāns paredz *X. laevis* embrijus, kas ir 8.–10. stadijā pēc Nivkopa un Fabera [*Nieuwkoop and Faber* (NF)] (3), eksponēt testējamajai ķimikālijai ne mazāk kā četrās dažādās koncentrācijās (parasti vismaz puslogaritmiskos intervālos), izmantojot arī vienu vai vairākas kontroles, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē, ar vienu starpposma apakšparaugu 62. NF stadijā (≤ 45 dienas pēc apaugļošanas, parasti aptuveni 45 dienas (dpa)). Katrai testējamajai koncentrācijai izmanto četrus replikātus, bet kontrolei astoņus replikātus. Ekspozīcijas gaitā izvērtētie beigupunkti (starpposma apakšparaugā un galīgajā paraugā, kad tests noslēdzas) ietver beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti, — mirstība, anormāla uzvedība un pieaugums (garums un masa) —, kā arī beigupunktus, kuru mērķis ir raksturot specifiskus endokrīno toksicitāti izraisošus iedarbības veidus, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera hormonu mediētiem fizioloģiskajiem procesiem. Šajā metodē galvenais uzsvars likts uz iespējamu populācijas līmenī relevantu ietekmi (proti, nelabvēlīgu ietekmi uz izdzīvotību, attīstību, augšanu un reproduktīvo attīstību), lai varētu aprēķināt nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) vai efektīvo koncentrāciju, kas mērāmajā beigupunktā rada × % izmaiņu (ECx). Tomēr jāatzīmē, ka uz ECx balstītas pieejas reti ir piemērotas šādiem lieliem pētījumiem, kuros palielināt testējamo koncentrāciju skaitu, lai varētu noteikt vajadzīgo ECx, var būt nepraktiski. Tāpat jāatzīmē, ka metode neaptver pašu reproduktīvo posmu. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Tā kā testētas salīdzinoši nedaudzas ķimikālijas un šā visai sarežģītā testa validēšanā iesaistījušās salīdzinoši nedaudzas laboratorijas, turklāt eksperimentu datos līdz šim nav dokumentēta interlaboratoriskā reproducējamība, ir gaidāms, ka tad, kad būs pieejami pietiekami daudzi pētījumi, lai varētu novērtēt šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, ESAO testēšanas vadlīnija Nr. 241 tiks pārskatīta un vajadzības gadījumā grozīta, ņemot vērā gūto pieredzi. *LAGDA* ir svarīgs tests, kas ļauj novērtēt abinieku populācijas sarukumu iespējamos cēloņus, izvērtējot ietekmi, ko rada ekspozīcija ķimikālijām jutīgajā kāpuru stadijā, kurā ietekme uz izdzīvotību un attīstību, arī normālu reproduktīvo orgānu attīstību, var atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz populācijām.

4. Tests ir izstrādāts tā, lai detektētu gan endokrīno, gan neendokrīno mehānismu apikālo ietekmi, un tajā ir diagnostiskie beigupunkti, kas ir daļēji specifiski svarīgām endokrīnajām modalitātēm. Jāatzīmē, ka līdz *LAGDA* izstrādei nebija neviena validēta testa, kas pildītu šo funkciju attiecībā uz abiniekiem.

5. Ir svarīgi, lai pirms testa sākšanas būtu pieejama informācija par testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām, īpaši tālab, lai varētu iegūt stabilus ķimikālijas šķīdumus. Svarīgi ir arī tas, lai būtu pieejama pietiekami jutīga analītiskā metode testējamās ķimikālijas koncentrāciju verificēšanai. Lai testam dotu pietiekamu jaudu, kas ļautu izvērtēt tādus populācijas līmenī relevantus beigupunktus kā pieaugums, attīstība un reproduktīvais briedums, aptuveni 16 nedēļas ilgajā testā vajadzīgi kopā 480 dzīvnieki, t. i., *X. laevis* embriji (vai, ja izmanto šķīdinātāja kontroli, 640 embriji).

6. Pirms testēšanas metodes izmantošanas kāda maisījuma testēšanai regulatīvā nolūkā ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus. Turklāt šajā testā netiek tieši izvērtēta fekunditāte, tāpēc tas ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālajā satvarā var nebūt piemērots lietošanai tālākā līmenī par 4.

TESTĒŠANAS METODES ZINĀTNISKAIS PAMATS

7. Mūsu pašreizējā izpratne par abinieku bioloģiju lielā mērā veidojusies, izmantojot laboratorijas paraugsugas *X. laevis* dzīvniekus. Šīs sugas dzīvniekus ir viegli audzēt laboratorijā, to ovulāciju var izraisīt ar cilvēka horija gonadotropīnu (*hCG*), un šo dzīvnieku krājumi ir plaši pieejami no komercaudzētājiem.

8. Abinieku, tāpat kā visu citu mugurkaulnieku, reprodukcija norit hipotalāma, hipofīzes un gonādu (HHG) ass kontrolē (4). Šīs endokrīnās sistēmas mediatori ir estrogēni un androgēni, kas nosaka dzimumdimorfo audu attīstību un fizioloģiju. Abinieku dzīves ciklā ir trīs stadijas, kad šī ass ir sevišķi aktīva: 1) gonādu diferenciācija kāpuru attīstības laikā, 2) sekundāro dzimumpazīmju attīstība un gonādu nobriešana mazuļu stadijā un 3) pieaugušo īpatņu funkcionāla reprodukcija. Ir pamats domāt, ka noteiktas ķimikālijas, piem., estrogēni un androgēni, katrā no šīm attīstības stadijām var izraisīt endokrīnus traucējumus, kuru ietekmē eventuāli mazinās organismu reproduktīvā spēja.

9. Gonādu attīstība sākas 43. NF stadijā, kad attīstās bipotenciālā ģenitālā kore. Gonādu diferenciācija sākas 52. NF stadijā, kad sākotnējās dīgļšūnas vai nu migrē uz medulārajiem audiem (tēviņi), vai paliek attīstošos gonādu kortikālajā reģionā (mātītes) (3). Pirmās ziņas, ka šis gonādu dzimumdiferenciācijas process *Xenopus* ir uzņēmīgs pret ķīmiskām izmaiņām, parādījās XX gs. 50. gados (5) (6). Ja kurkuļi šajā gonādu diferenciācijas periodā tiek eksponēti estradiolam, tēviņi dzimuminvertējas, proti, izaug par pilnīgi funkcionālām mātītēm (7) (8). Ir ziņas arī par mātīšu

funkcionālu dzimuminvertēšanos par tēviņiem pēc sēklinieku audu implantācijas kurkuļos (9). Taču, lai gan funkcionālu dzimuminversiju *X. tropicalis* izraisa arī ekspozīcija aromatāzes inhibitoram (10), tas nav konstatēts ar *X. laevis*. Vēsturiski toksikantu ietekme uz gonādu diferenciāciju tika novērtēta, gonādas histoloģiski izmeklējot metamorfozes laikā, un dzimuminversiju varēja noteikt, tikai analizējot dzimumu attiecību. Vēl nesen tieši noteikt *Xenopus* ģenētisko dzimumu nebija iespējams. Tomēr nesen atklāti ar dzimumu saistīti *X. laevis* marķieri, kas dod iespēju noteikt ģenētisko dzimumu un dzimuminvertētos dzīvniekus identificēt tieši (11).

10. Attīstoties jaunajiem tēviņiem, asinīs palielinās testosterona līmenis, kas atbilst sekundāro dzimumpazīmju attīstībai, kā arī sēklinieku attīstībai. Attīstoties mātītēm, olnīcās rodas estradiols, kā ietekmē plazmā parādās vitelogenīns (VTG) un olnīcā — vitelogenīniski oocīti un attīstās olvadi (12). Olvadi ir mātīšu sekundārā dzimumpazīme, kam ir loma oocītu nobriešanā reprodukcijas laikā. Oocītiem virzoties caur olvadu, tie pārklājas ar gļotainu apvalku un, gatavi apaugļošanai, sakrājas ikru maisā. Tā kā olvadu attīstība *X. laevis* (13) un *X. tropicalis* (12) korelē ar estradiola līmeni asinīs, to, šķiet, regulē estrogēni. Ir saņemtas ziņas, ka pēc ekspozīcijas polihlorbifeniliem (14) un 4-*terc*-oktilfenolam (15) olvadi attīstījušies arī tēviņiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testa plāns paredz *X. laevis* embrijus, kas ir 8.–10. NF stadijā, ūdens ceļā eksponēt testējamajai ķimikālijai četrās dažādās koncentrācijās, izmantojot arī vienu vai vairākas kontroles, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē, ar vienu starpposma apakšparaugu 62. NF stadijā. Lai gan var būt iespējams ar barību dot arī ļoti hidrofobisku ķimikāliju devas, līdz šim šajā testā pieredze ar šo ekspozīcijas ceļu ir maza. Katrai testējamajai koncentrācijai izmanto četrus replikātus, bet katrai kontrolei astoņus replikātus. Ekspozīcijas laikā izvērtē beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti (t. i., mirstība, anormāla uzvedība un pieaugums (garums un masa)), kā arī beigupunktus, kuru mērķis ir raksturot specifiskus endokrīno toksicitāti izraisošus iedarbības veidus, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera hormonu mediētiem fizioloģiskajiem procesiem (t. i., vairogdziedzera histopatoloģija, gonādu un gonādu vadu histopatoloģija, anormāla attīstība, vitelogenīns plazmā (pēc izvēles) un genotipisko/fenotipisko dzimumu attiecības).

TESTA DERĪGUMA KRITĒRIJI

12. Piemērojami šādi testa derīguma kritēriji:

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt ≥ 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības;

— ūdens temperatūrai jābūt 21 ± 1 °C diapazonā, un atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 1,0 °C;

— testa šķīduma pH jāuztur no 6,5 līdz 8,5, un atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 0,5;

— jābūt pieejamām liecībām, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām;

— kontrolēs mirstībai katrā replikātā ekspozīcijas periodā vajadzētu būt ≤ 20 %;

— dzīvotspējai nārstojumā, ar kuru izvēlas sākt pētījumu, vajadzētu būt ≥ 70 %;

— medianālajam laikam līdz 62. NF stadijai kontrolēs vajadzētu būt ≤ 45 dienām;

— kontrolēs un testa kontrolēs (ja tādas izmanto) testa organismu vidējai masai 62. NF stadijā un testa beigās vajadzētu sasniegt attiecīgi 1,0 ± 0,2 un 11,5 ± 3 g.

13. Lai gan tas nav derīguma kritērijs, ir ieteicams, lai analīzei būtu pieejamas vismaz trīs līmeņu apstrādes ar trim nekompromitētiem replikātiem. Pārmērīga mirstība, kas apstrādi kompromitē, ir > 4 tādi nāves gadījumi (> 20 %) 2 vai vairāk replikātos, ko nevar izskaidrot ar tehnisku kļūdu. Analīzei vajadzētu būt pieejamām vismaz divu līmeņu apstrādēm bez acīmredzamas toksicitātes. Acīmredzamas toksicitātes pazīmes ir, piemēram (bet ne tikai), pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana un nereaģēšana uz stimuliem, morfoloģiskas anormālijas (piem., deformētas ekstremitātes), hemorāģiski bojājumi un vēdera uzpūšanās.

14. Ja novērojamas novirzes no testa derīguma kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa rezultātu ticamību un šīs novirzes un apsvērumi jāatspoguļo testēšanas pārskatā.

METOŽU APRAKSTS

Aprīkojums

15. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

a) temperatūras regulēšanas aprīkojums (piem., sildītāji vai dzesētāji, kas noregulējami uz 21 ° ± 1 °C);

b) termometrs;

c) binokulārs stereomikroskops un disekcijas instrumenti;

d) digitālā kamera ar vismaz 4 megapikseļu izšķirtspēju un mikrorežīmu (ja nepieciešams);

e) analītiskie svari ar precizitāti līdz 0,001 mg vai 1 μg;

f) izšķīdušā skābekļa un pH mērinstrumenti;

g) gaismas intensitātes mērītājs, kas rezultātus uzrāda luksos.

Ūdens

Izcelsme un kvalitāte

16. Atšķaidīšanai var izmantot jebkādu vietēji pieejamu ūdeni (piem., avota ūdeni vai caur ogli izfiltrētu krāna ūdeni), kurā *X. laevis* var normāli augt un attīstīties; vajadzētu būt pierādījumiem, ka dzīvnieki šajā ūdenī aug normāli. Tā kā vietējā ūdens kvalitāte dažādās vietās var būtiski atšķirties, ir jāveic ūdens kvalitātes analīzes, jo īpaši, ja nav pieejami vēsturiski dati par ūdens izmantojamību abinieku kāpuru audzēšanā. Pirms testēšanas sākuma un/vai, piem., reizi sešos mēnešos, ja zināms, ka atšķaidīšanai izmantotā ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cietvielu mērījumi. Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības ir norādītas 2. papildinājumā.

Jodīda koncentrācija testēšanas ūdenī

17. Lai vairogdziedzeris varētu sintezēt tiroīdhormonus normālai metamorfozes norisei, kāpuriem ar ūdeni un uzturu jāuzņem pietiekami daudz jodīda. Empīriski iegūtu vadlīniju, kas noteiktu minimālās jodīda koncentrācijas barībā vai uzturā pienācīgai attīstībai, pašlaik nav. Taču jodīda pieejamība var ietekmēt vairogdziedzera sistēmas spēju reaģēt uz vairogdziedzera darbību ietekmējošajām ķimikālijām, un ir zināms, ka tā var mainīt vairogdziedzera pamataktivitāti, tāpēc, interpretējot vairogdziedzera histopatoloģijas rezultātus, šim aspektam jāpievērš uzmanība. Līdzšinējā darbā ir pierādīts, ka tests norit veiksmīgi, ja atšķaidīšanas ūdens jodīda (I^{-}) koncentrācija ir diapazonā no 0,5 līdz 10 µg/l. Ideālā gadījumā minimālajai jodīda koncentrācijai atšķaidīšanas ūdenī visā testā jābūt 0,5 µg/l (to pievieno kā nātrija sāli vai kālija sāli). Ja testēšanas ūdeni rekonstituē no dejonizēta ūdens, tam pievieno jodu minimālajā koncentrācijā 0,5 µg/l. Izmērītās jodīda koncentrācijas testa ūdenī (t. i., atšķaidīšanas ūdenī) un testa ūdens papildināšana ar jodu vai citiem sāļiem (ja tāda veikta) jānorāda pārskatā. Joda saturu var mērīt ne tikai testa ūdenī, bet arī barībā.

Ekspozīcijas sistēma

18. Tests ir izstrādāts, izmantojot caurplūdes atšķaidīšanas sistēmu. Sistēmas komponentiem, kas nonāk kontaktā ar ūdeni, jābūt izgatavotiem no stikla, nerūsošā tērauda un/vai citiem ķīmiski inertiem materiāliem. Ekspozīcijas tvertnēm jābūt stikla vai nerūsošā tērauda akvārijiem, un to izmantojamajai ietilpībai jābūt no 4,0 līdz 10,0 l (minimālais ūdens dziļums: 10 līdz 15 cm). Sistēmai jāspēj uzņemt visas ekspozīcijas koncentrācijas, kontroli un vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontroli; katrā apstrādē jābūt četriem replikātiem un kontrolēs astoņiem. Plūsmas ātrumam uz katru tvertni jābūt nemainīgam, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ekspozīciju ķimikālijai. Ieteicams nodrošināt piemērotu caurplūdumu (piem., vismaz 5 tvertnes šķīduma nomaiņas dienā), lai nepieļautu, ka ķimikālijas koncentrācija samazinās tāpēc, ka to metabolizē gan testa organismi, gan akvārijā esošie mikroorganismi, vai tāpēc, ka tā degradējas abiotiski (hidrolīze, fotolīze) vai zūd (izgarošana, sorbcija). Apstrādes tvertnes nejaušināti jāizkārto ekspozīcijas sistēmā tā, lai mazinātu iespējamo novietojuma ietekmi, piem., nelielas temperatūras, gaismas intensitātes u. tml. atšķirības. Papildu informāciju par caurplūdes ekspozīcijas sistēmu iekārtošanu var iegūt *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Ķimikālijas padošana: testa šķīdumu sagatavošana

19. Lai sagatavotu testa šķīdumus ekspozīcijas sistēmā, tajā ar piemērotu sūkni vai citu aparātu dozē testējamās ķimikālijas izejšķīdumu. Pirms ekspozīcijas sākšanas izejšķīduma caurplūdumu kalibrē pēc testa šķīduma analītiskajiem rādītājiem un testa gaitā to periodiski pārbauda volumetriski. Testa šķīdums katrā kamerā jāatjaunina, veicot vismaz 5 tilpumatjaunināšanas dienā.

20. Metodi, ar kādu testējamo ķimikāliju ievadīt sistēmā, nosaka atkarībā no tās fizikālķīmiskajām īpašībām. Tāpēc pirms testa sākšanas par ķimikāliju jāiegūst bāzlīnijas informācija, kas palīdz noteikt tās testējamību. Noderīga informācija par testējamās ķimikālijas specifiskajām īpašībām ir, piemēram, tās struktūrformula, molekulmasa, tīrība, stabilitāte ūdenī un gaismā, pK_a un K_{ow}, šķīdība ūdenī (vēlams, testa vidē) un tvaika spiediens, kā arī bionoārdāmības viegluma testa (testēšanas metode C.4. (17) vai C.29 (18)) rezultāti. Šķīdību un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai var rasties testējamās ķimikālijas zudumi iztvaikošanas dēļ. Testa veikšana bez iepriekš norādītās informācijas uzmanīgi jāizsver, jo pētījuma plāns būs atkarīgs no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām un testa rezultātus interpretēt bez šiem datiem var būt grūti vai bezjēdzīgi. Vajadzētu būt, ka testējamās ķimikālijas kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ir pieejama uzticama analītiska metode ar zināmu un literatūrā minētu pareizību un noteikšanas robežu. Ūdenī šķīstošas testējamās ķimikālijas var izšķīdināt testēšanas ūdens alikvotā tādā koncentrācijā, kas caurplūdes sistēmā ļauj nodrošināt testa mērķkoncentrāciju. Ķimikālijām, kas istabas temperatūrā ir šķidrā vai cietā agregātstāvoklī un ūdenī šķīst vidēji labi, var būt jāizmanto šķidruma:šķidruma vai šķidruma:cietvielas (piem., stikla vates kolonna) saturatori (19). Lai gan var būt iespējams ar barību dot arī ļoti hidrofobisku testējamo ķimikāliju devas, līdz šim šajā testā pieredze ar šo ekspozīcijas ceļu ir maza.

21. Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus sagatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams sagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piem., samaisot un/vai apstrādājot ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas/sistēmas vai pasīvas dozēšanas metodes (20). Ieteicams izmantot testa sistēmu bez papildšķīdinātāja; tomēr dažādām testējamajām ķimikālijām ir dažādas fizikālķīmiskās īpašības, tāpēc ķimikālijas ekspozīcijas ūdens sagatavošanai parasti vajadzīgas dažādas pieejas. Katrā ziņā jācenšas izvairīties no šķīdinātāju vai nesēju izmantošanas, jo: 1) daži šķīdinātāji paši var izraisīt toksicitāti un/vai nevēlamu vai negaidītu atbildreakciju, 2) ja testējamās ķimikālijas koncentrācija pārsniedz tās šķīdību ūdenī (kā nereti gadās, ja izmanto šķīdinātājus), noteiktās efektīvās koncentrācijas var būt nepareizas, 3) šķīdinātāju izmantošana ilgākos testos var radīt ievērojamu bioplēvi, kas saistāma ar mikroorganismu aktivitāti, un tā var ietekmēt vides apstākļus, kā arī spēju uzturēt ekspozīcijas koncentrācijas un, 4) ja nav vēsturisko datu, kas pierāda, ka šķīdinātājs pētījuma iznākumu neietekmē, šķīdinātājus var izmantot tikai ar šķīdinātāja kontroli, savukārt tas ir pretrunā dzīvnieku labklājības principiem, jo testa veikšanai tad vajadzīgi papildu dzīvnieki. Šķīdinātāju izmanto kā galēju līdzekli sarežģīti testējamu ķimikāliju gadījumā, un piemērotāko metodi izvēlas, izmantojot ESAO norādījumu dokumentu par sarežģīti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (21). Šķīdinātāja izvēli nosaka testējamās ķimikālijas ķīmiskās īpašības un pieejamie vēsturiskie kontroļu dati par šķīdinātāja izmantošanu. Ja vēsturisko datu nav, pirms galīgā pētījuma veikšanas jānosaka šķīdinātāja piemērotība. Ja no šķīdinātāja izmantošanas nevar izvairīties un novērojama mikrobiāla aktivitāte (bioplēves veidošanās), ieteicams visā testa laikā reģistrēt / pārskatā norādīt bioplēves apmēru katrā tvertnē (vismaz reizi nedēļā). Ideālā gadījumā šķīdinātāja koncentrācija šķīdinātāja kontrolē un visās apstrādātajās grupās būtu jāuztur nemainīga. Ja šķīdinātāja koncentrāciju neuztur nemainīgu, šķīdinātāja kontrolē jāizmanto augstākā šķīdinātāja koncentrācija, ko izmanto apstrādē. Gadījumos, kad par nesēju izmanto šķīdinātāju, maksimālajai šķīdinātāja koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 100 µl/l vai 100 mg/l (21) un ir ieteicams šķīdinātāja koncentrāciju saglabāt pēc iespējas zemu (piem., ≤ 20 µl/l), lai novērstu iespējamu šķīdinātāja ietekmi uz mērītajiem beigupunktiem (22).

Testa dzīvnieki

Testa suga

22. Testa suga ir *X. laevis* šādu iemeslu dēļ: 1) to bieži audzē laboratorijās visā pasaulē, 2) to ir viegli iegūt no komerciāliem piegādātājiem un 3) tai var noteikt ģenētisko dzimumu.

Pieaugušo dzīvnieku kopšana un audzēšana

23. Piemērota *X. laevis* kopšana un audzēšana ir aprakstīta standartizētā vadlīnijā (23). *X. laevis* turēšana un kopšana aprakstīta arī *Read* (24). Lai inducētu vairošanos, trim līdz pieciem pieaugušu mātīšu un tēviņu pāriem intraperitoneāli injicē cilvēka horija gonadotropīnu (*hCG*). Mātītēm un tēviņiem injicē, piem., attiecīgi aptuveni 800–1 000 SV [starptautiskās vienības] un 500–800 SV *hCG*, kas izšķīdināts 0,6–0,9 % fizioloģiskā šķīduma (vai varžu Ringera šķīduma, kas ir izotonisks fizioloģiskais šķīdums abiniekiem). Injicē aptuveni 10 µl uz g ķermeņa masas (~ 1 000 µl). Pēc inducēšanas vaislas pārus netraucētus tur lielās tvertnēs, kurās ir statiski apstākļi, lai veicinātu ampleksu. Vairošanās tvertnēm jābūt ar nerūsošā tērauda sieta dubultdibenu (piem., ar 1,25 cm acīm), kas ikriem ļauj uzkrāties

tvertnes apakšā. Vardes, kas *hCG* injekciju saņēmušas vēlā pēcpusdienā, lielāko daļu ikru parasti iznērš nākamās dienas priekšpusdienā. Kad iznērsts un apaugļots pietiekams daudzums ikru, pieaugušos dzīvniekus no vairošanās tvertnēm izņem. Tad ikrus savāc un atgļoto ar L-cisteīnu (23). Sagatavo 2 % L-cisteīna šķīdumu, kura pH koriģē līdz 8,1 ar 1 M NaOH. Šo 21 °C silto šķīdumu ielej 500 ml Erlenmeijera kolbā, kurā ir viena nārsta ikri, un minūti vai divas uzmanīgi skalo uz riņķi, bet pēc tam 6–8 reizes rūpīgi noskalo ar 21 °C siltu kultūršķīdumu. Tad ikrus pārnes uz kristalizācijas trauku un nosaka to dzīvotspēju, kam jābūt > 70 %, un embrijos, kuros konstatējama šūnu dalīšanās, anormālijām jābūt minimālām.

TESTA PLĀNS

Testējamās koncentrācijas

24. Ir ieteicams izmantot vismaz četras ķimikālijas koncentrācijas un attiecīgas kontroles (vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontroles). Parasti ieteicams izmantot koncentrāciju intervālu (atstatumu koeficientu), kas nepārsniedz 3,2.

25. Lai izvairītos no acīmredzami toksiskām koncentrācijām, testa vajadzībām augstākās testējamās koncentrācijas noteikšanai pēc iespējas lielā mērā izmanto līdzšinējo abinieku pētījumu rezultātus. Šo koncentrāciju noteikt var palīdzēt informācija par struktūras un aktivitātes kvantitatīvajām sakarībām, informācija par analogiem un dati no līdzšinējiem abinieku pētījumiem, piem., abinieku metamorfozes testa (testēšanas metode C.38 (25)) un *Xenopus* varžu embriju teratoģenēzes testa (23) un/vai testiem ar zivīm, piem., testēšanas metodēm C.48, C.41 un C.49 (26) (27) (28). Pirms *LAGDA* var veikt diapazona noteikšanas eksperimentu. Ir ieteicams diapazona noteikšanas nolūkos veicamo ekspozīciju sākt 24 stundu laikā pēc apaugļošanas un turpināt 7–14 dienas (vai vairāk, ja nepieciešams), un testējamās koncentrācijas noteikt tādas, ka intervāli starp tām nepārsniedz koeficientu 10. Diapazona noteikšanas eksperimenta rezultāti būtu jāizmanto augstākās *LAGDA* testējamās koncentrācijas noteikšanai. Jāatzīmē, ka, ja nākas izmantot šķīdinātāju, diapazona noteikšanas pētījuma ietvaros var noskaidrot arī šķīdinātāja piemērotību (t. i., vai tas ietekmē pētījuma iznākumu).

Apstrādes grupu un kontroļu replikāti

26. Jāizmanto vismaz četras replikāttvertnes uz testa koncentrāciju un vismaz astoņi replikāti uz kontroli (un šķīdinātāja kontroli, ja tāda vajadzīga), proti, lai panāktu pienācīgu statistisko jaudu, replikātu skaitam kontrolē un šķīdinātāja kontrolē, ja tāda ir, jābūt divreiz lielākam par replikātu skaitu katrā apstrādes grupā. Katrā replikātā jābūt ne vairāk kā 20 dzīvniekiem. Minimālais dzīvnieku skaits būtu 15 (562. NF stadijas apakšparaugam un 10 mazuļi). Tomēr, lai ņemtu vērā mirstību un panāktu, ka dzīvnieku skaits nenoslīd zem kritiskā skaita 15, katram replikātam pievieno papildu dzīvniekus.

PROCEDŪRA

Testa pārskats

27. Testu sāk ar tikko iznērstiem embrijiem (8.–10. NF stadija) un turpina līdz mazuļu attīstībai. Dzīvniekus ik dienas apskata, lai konstatētu nāves gadījumus un anormālas uzvedības pazīmes. 62. NF stadijā savāc kāpuru apakšparaugu (līdz 5 dzīvniekiem uz replikātu) un noskaidro vairākus beigupunktus (1. tabula). Kad visi dzīvnieki sasnieguši 66. NF stadiju, proti, noslēgusies metamorfoze (vai aptuveni 70 dienas pēc testa sākšanas — atkarībā no tā, kura diena ir agrāka), veic nejaušinātu atlasi (bez apakšparaugošanas), lai dzīvnieku skaitu samazinātu (10 uz tvertni) (sk. 43. punktu), bet atlikušos dzīvniekus turpina eksponēt, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē. Testu beidzot (mazuļu paraugošana), veic papildu mērījumus (1. tabula).

Ekspozīcijas nosacījumi

28. Pilnīgs testa parametru kopsavilkums atrodams 3. papildinājumā. Ekspozīcijas periodā ik dienas mēra testa šķīdumos izšķīdušo skābekli, temperatūru un pH. Elektrovadītspēju, sārmainību un cietību mēra reizi mēnesī. Testa šķīdumu ūdens temperatūra dažādos replikātos un dažādās apstrādēs (vienas dienas ietvaros) nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 1,0 °C. Savukārt testa šķīdumu pH dažādos replikātos un dažādās apstrādēs nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 0,5.

29. Ekspozīcijas tvertnes ik dienas var iztīrīt ar sifonu, lai noņemtu neapēsto barību un ekskrementus, izvairoties no tvertņu krusteniskas kontaminācijas. Jāuzmanās dzīvniekiem neradīt stresu un tos netraumēt, it sevišķi pārvietošanas, akvārija tīrīšanas un manipulāciju laikā. Jāizvairās no stresu izraisošiem apstākļiem/darbībām, piem., skaļa un/vai nerimtīga trokšņa, klauvēšanas pa akvārijiem, tvertņu vibrācijām.

Ekspozīcijas ilgums

30. Ekspozīciju testējamajai ķimikālijai sāk ar jauniznērstiem embrijiem (8.–10. NF stadija) un turpina, līdz pagājušas desmit nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē (≤ 45 dienas pēc testa sākšanas). Parasti *LAGDA* ilgst 16 nedēļas (ne vairāk kā 17 nedēļas).

Testa sākšana

31. Testa sākšanai ņem tādus vecākdzīvniekus, par kuriem iepriekš pierādīts, ka to pēcnācējiem var noteikt ģenētisko dzimumu (5. papildinājums). Pēc pieaugušo dzīvnieku nārsta embrijus savāc, atgļoto ar cisteīnu un atlasa pēc dzīvotspējas (23). Ar cisteīnu apstrādātie embriji atlases laikā nelīp pie virsmām. Atlasi veic ar stereomikroskopu, izmantojot piemērota lieluma pipeti nedzīvo embriju izņemšanai. Ir vēlams testam izmantot viena nārsta ikrus, kuru dzīvotspēja pārsniedz 70 %. 8.–10. NF stadijas embrijus nejaušināti sadala ekspozīcijai pakļautajās apstrādes tvertnēs, kurās ir pietiekams atšķaidīšanas ūdens tilpumdaudzums, līdz katrā tvertnē ir 20 embriji. Pārvietošanas laikā ar embrijiem jāapietas uzmanīgi, lai mazinātu manipulāciju izraisīto stresu un izvairītos no ievainojumiem. 96 h pēc apaugļošanas kurkuļiem vajadzētu būt pārvietojušamies ūdens slānī uz augšu un piestiprinājušamies tvertnes sienām.

Barošanas režīms

32. Ļoti svarīgs *LAGDA* protokola aspekts ir barības un barošanas režīma izmaiņas dažādās *X. laevis* dzīves cikla stadijās. Pārbarošana kāpuru fāzē parasti palielina skoliozes incidenci un smagumu (8. papildinājums), tāpēc no tās būtu jāizvairās. Savukārt nepietiekama barošana kāpuru fāzē noved pie ļoti atšķirīgiem attīstības rādītājiem kontrolēs, kas potenciāli var kompromitēt statistisko jaudu vai novest pie maldīgiem testa rezultātiem. Caurplūdes apstākļiem ieteicamā *X. laevis* kāpuru un mazuļu diēta un barošanas režīms ir aprakstīti 4. papildinājumā, bet var izmantot arī alternatīvu pieeju, ja vien testa organismi aug un attīstās apmierinoši. Jāatzīmē, ka, ja tiek mērīti endokrīnajai sistēmai specifiski beigupunkti, barība nedrīkst saturēt endokrīni aktīvas vielas, piemēram, sojas miltus.

Kāpuru barošana

33. Kāpurus ieteicams barot ar foreļu starterbarību, spirulīnas aļģu diskiem un zelta zivtiņām domātām pārslām (piem., *TetraFin*® pārslām, *Tetra*, Vācija), kas sajauktas kultūras (vai atšķaidīšanas) ūdenī. Maisījumu dod trīs reizes dienā darbdienās un reizi dienā nedēļas nogalēs. No 8. dienas pēc apaugļošanas kurkuļus baro arī ar dzīviem 24 h veciem sāļūdens garneļu (*Artemia* spp.) nauplijiem — divreiz dienā darbdienās un reizi dienā nedēļas nogalēs. Kāpuru barošanai, kam katrā testa tvertnē jānorit vienādi, testa dzīvniekiem jāļauj pienācīgi augt un attīstīties, lai nodrošinātu testa rezultātu reproducējamību un pārnesamību: 1) medianālajam laikam līdz 62. NF stadijai kontrolēs vajadzētu būt ≤ 45 dienām un 2) ieteicams, lai vidējā masa kontrolēs 62. NF stadijā būtu 1,0 ± 0,2 g.

Mazuļu barošana

34. Kad metamorfoze ir beigusies, dzīvniekus baro ar pirmšķirīgu grimstošu varžu barību, piem., *Sinking Frog Food -3/32* (*Xenopus Express*, FL, ASV) (4. papildinājums). Vardulēnu (agrīno stadiju mazuļu) gadījumā granulas nedaudz sasmalcina kafijas dzirnaviņās vai blenderī vai saberž piestā. Kad mazuļi ir pietiekami lieli, lai varētu granulas ēst veselas, tās samalt vai saberzt vairs nav nepieciešams. Dzīvniekus baro reizi dienā. Mazuļi jābaro tā, lai tie varētu pienācīgi augt un attīstīties: kontrolēs mazuļu vidējai masai testa beigās ieteicams būt 11,5 ± 3 g.

Analītiskā ķīmija

35. Pirms testa sākšanas (piemēram, izmantojot pieejamo informāciju un zināšanas) jānoskaidro testējamās ķimikālijas stabilitāte (piem., šķīdība, noārdāmība un gaistamība) un visas vajadzīgās analītiskās metodes. Ja devu dod ar atšķaidīšanas ūdeni, ir ieteicams pirms testa sākšanas katras replikāttvertnes testa šķīdumu izanalizēt, lai pārliecinātos par sistēmas veiktspēju. Ekspozīcijas periodā pienācīgos intervālos nosaka testējamās ķimikālijas koncentrācijas, vēlams — reizi nedēļā vismaz vienā katras apstrādes grupas replikātā, katru nedēļu izvēloties citu tās pašas apstrādes grupas replikātu. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap nominālo koncentrāciju, rezultātu var balstīt kā uz izmērītajām, tā nominālajām vērtībām. Turklāt izmērīto testējamo koncentrāciju variācijas koeficientam (VK) visā testa periodā katrā apstrādē un katrā koncentrācijā vajadzētu pastāvīgi būt 20 % vai mazākam. Ja izmērītās koncentrācijas neturas diapazonā no 80 līdz 120 % no nominālās koncentrācijas (piem., testējot ļoti bionoārdāmas vai adsorbtīvas ķimikālijas), efektīvās koncentrācijas caurplūdes testiem būtu jānosaka un jāizsaka attiecībā pret aritmētisko vidējo koncentrāciju.

36. Atšķaidīšanas ūdens un izejšķīduma caurplūdums visu ekspozīcijas laiku būtu piemērotos intervālos jāpārbauda (piem., trīs reizes nedēļā). Ja ķimikāliju kādā nominālajā koncentrācijā vai tajās visās nevar detektēt (piem., tāpēc, ka tā testa traukos ātri noārdās vai adsorbējas vai ievērojami uzkrājas eksponēto dzīvnieku organismā), ir ieteicams testa šķīduma atjaunināšanas rādītāju katrā kamerā koriģēt tā, lai testa koncentrācija būtu pēc iespējas nemainīga.

Novērojumi un beigupunktu mērījumi

37. Ekspozīcijas laikā izvērtē beigupunktus, kas liecina par toksicitāti (tostarp mirstība, anormāla uzvedība, piem., klīniskas slimības un/vai vispārējas toksicitātes pazīmes) un raksturo pieaugumu (garums un masa), kā arī patoloģiskos beigupunktus, kuri var reaģēt gan uz vispārējo toksicitāti, gan endokrīnajiem iedarbības veidiem, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera hormonu mediētiem ceļiem. Turklāt testa beigās pēc izvēles var izmērīt VTG koncentrāciju plazmā. VTG mērījumi var palīdzēt saprast pētījuma rezultātus domājamu EDĶ endokrīno iedarbības mehānismu kontekstā. Kopsavilkums par beigupunktiem un mērījumu grafiku ir sniegts 1. tabulā.

1. tabula

Pārskats par *LAGDA* beigupunktiem

Beigupunkti (*)	Ik dienu	Starpposma paraugošana (kāpuru paraugošana)	Testa beigas (mazuļu paraugošana)
Mirstība un anormālijas	X		
Laiks līdz 62. NF stadijai		X	
Histo(pato)loģija (vairogdziedzeris)		X	
Morfometrija (masas un garuma pieaugums)		X	X
Hepatosomatiskais indekss (HSI)			X
Ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības			X
Histopatoloģija (gonādas, reproduktīvie kanāli, nieres un aknas)			X
Vitelogenīns (VTG) (pēc izvēles)			X

(*) Visus beigupunktus analizē statistiski.

Mirstība un dienišķie novērojumi

38. Katru dienu pārbauda, vai testa tvertnēs nav mirušu dzīvnieku un katrā tvertnē konstatētos nāves gadījumus reģistrē. Mirušie dzīvnieki iespējami ātri no testa tvertnes jāizņem. Jānosaka mirušo dzīvnieku attīstības stadija — posms līdz 58. NF stadijai (pirms priekšējo ekstremitāšu parādīšanās), 58.–62. NF stadija, 63.–66. NF stadija (no 62. NF stadijas līdz pilnīgai astes absorbcijai) vai posms pēc 66. NF stadijas (pēckāpuru posms). Ja mirstība pārsniedz 20 %, tas var liecināt par nepienācīgiem testēšanas apstākļiem vai acīmredzami toksisku testējamās ķimikālijas ietekmi. Īpaši jutīgi pret neķīmiskiem nāves cēloņiem dzīvnieki mēdz būt pirmajās attīstības dienās pēc nārsta un metamorfozes klimaksa laikā. Šādai mirstībai vajadzētu būt novērojamai arī kontrolēs.

39. Jebkāda novērota anormāla uzvedība, acīmredzamas malformācijas (piem., skolioze) vai bojājumi jāreģistrē. Novērotie skoliozes gadījumi jāuzskaita (incidence) un jāizvērtē to smagums (piem., neizteikta — N, minimāla — 1, vidēja — 2, smaga — 3; 8. papildinājums). Jācenšas panākt, lai vidēja un smaga skolioze visā pētījuma laikā būtu maz izplatīta (piem., mazāk nekā 10 % kontrolēs), lai gan arī lielāka anormāliju prevalence kontrolēs ne vienmēr ir iemesls testu izbeigt. Normālai uzvedībai raksturīgi, ka ūdenī esošajiem kāpuriem aste atrodas augstāk par galvu, ir regulāras un ritmiskas astes spuras kustības, tie periodiski uznirst, tiem kustas operkulas, tie reaģē uz stimuliem. Par anormālu uzvedību liecina, piem., pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana un nereaģēšana uz stimuliem. Attiecībā uz postmetamorfiskiem dzīvniekiem līdzās norādītajai anormālajai uzvedībai jāreģistrē arī ievērojamas barības uzņēmšanas atšķirības dažādās apstrādēs. Smagas malformācijas un bojājumi var ietvert morfoloģiskas anormālijas (piem., deformētas ekstremitātes), hemorāģiskus bojājumus, vēdera uzpūšanos un bakteriālu infekciju vai sēnīšinfekciju. Mazuļu galvas bojājumi tieši aiz nāsīm var liecināt par nepietiekamu mitrumu. Šie konstatējumi ir kvalitatīvi, un tie būtu jāuztver kā klīniskas slimības/stresa pazīmes un jāskata salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem. Ja šo pazīmju biežums eksponētajās tvertnēs ir lielāks nekā kontrolēs, pieņem, ka tās liecina par acīmredzamu toksicitāti.

Kāpuru apakšparaugošana

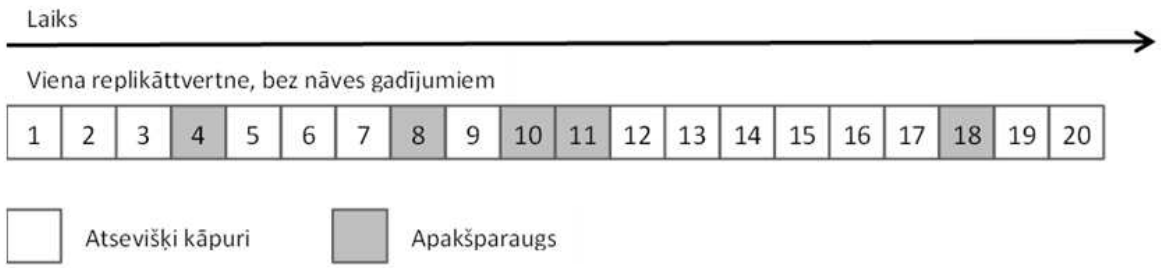
Kāpuru apakšparaugošanas kopapskats

40. Kurkuļus, kas sasnieguši 62. NF stadiju, vai nu no tvertnēm izņem un iekļauj paraugā vai pārvieto uz nākamo ekspozīcijas fāzi jaunā tvertnē, vai arī fiziski nošķir no pārējiem tās pašas tvertnes kurkuļiem ar atdalītāju. Kurkuļus ik dienas pārbauda, un reģistrē, kurā pētījuma dienā katrs kurkulis sasniedz 62. NF stadiju. Šajā novērtējumā izmantojamā pazīme ir galvas forma. Kad galva ir samazinājusies tiktāl, ka vizuāli izskatās tikpat plata kā kurkuļa torss, un priekšējās ekstremitātes ir sirds vidus līmenī, uzskata, ka īpatnis ir sasniedzis 62. NF stadiju.

41. Mērķis ir uz katru replikāttvertni paraugot kopā piecus 62. NF stadijas kurkuļus. Tas būtu jādara pilnīgi nejaušināti, bet jāizlemj jau iepriekš. Hipotētisks replikāttvertnes paraugs redzams **1. attēlā**. Ja tad, kad pirmais īpatnis sasniedz 62. NF stadiju, konkrētā tvertnē ir 20 dzīvi kurkuļi, pēc nejaušības principa izvēlas piecus skaitļus no 1 līdz 20. Pirmais īpatnis, kas sasniedz 62. NF stadiju, ir kurkulis #1, bet pēdējais, kas sasniedz 62. NF stadiju, ir kurkulis #20. Savukārt tad, ja tvertnē ir 18 dzīvi kurkuļi, piecus nejaušos skaitļus izvēlas no 1 līdz 18. Tā rīkojas ar katru replikāttvertni, kad pirmais īpatnis tajā sasniedz 62. NF stadiju. Ja NF 62. stadijas paraugojumā ir nāves gadījumi, atlikušos paraugus nejaušina vēlreiz atkarībā no tā, cik kāpuru palicis par 62. NF stadiju agrākās stadijās, un cik paraugi vēl vajadzīgi, lai būtu pieci paraugi no replikāta. Dienā, kad kurkulis sasniedz 62. NF stadiju, pēc sagatavotā paraugošanas grafika nosaka, vai kurkuli paraugo vai fiziski nošķir no pārējiem, lai turpinātu tā eksponēšanu. Sniegtajā piemērā (1. attēls) pirmo īpatni, kas sasniedz 62. NF stadiju (t. i., 1. lodziņš) fiziski nošķir no pārējiem kāpuriem, turpina tā eksponēšanu un atzīmē, kurā pētījuma dienā tas sasniedzis 62. NF stadiju. Pēc tam tāpat rīkojas ar 2. un 3. īpatni, savukārt 4. īpatni paraugo, nosakot tā pieaugumu un vairogdziedzera histoloģiju (pēc šā parauga). Procedūru turpina tik ilgi, līdz 20. īpatnis vai nu pievienojas pārējiem īpatņiem, kas sasnieguši 62. NF stadiju, vai tiek paraugots. Nejaušajai atlasei jānodrošina, ka visiem testa dzīvniekiem ir vienāda varbūtība tikt izraudzītiem. To var panākt ar jebkādu nejaušināšanas metodi, bet kādā 62. NF stadijas apakšparaugošanas perioda posmā jātiek notvertam katram kurkulim.

1. attēls

Hipotētisks piemērs: 62. NF stadijas paraugošanas režīms vienā replikāttvertnē



42. Kāpuru apakšparaugošanā noskaidro šādus beigupunktus: 1) laiks līdz 62. NF stadijai (t. i., no apaugļošanas līdz 62. NF stadijai apritējušo dienu skaits), 2) ārējas anormālijas, 3) morfometrija (piem., masa un garums) un 4) vairogdziedzera histoloģija.

Humāna kurkuļu nonāvēšana

43. 62. NF stadijas kurkuļu apakšparaugu (5 īpatņi uz replikātu) eitanazē, tos uz 30 min iegremdējot pietiekamā daudzumā (piem., 500 ml) anestētiska šķīduma (piem., MS-222, trikaīna metānsulfonāta, *CAS* Nr. 886-86-2, 0,3 % šķīdums). MS-222 šķīdums būtu ar nātrija bikarbonātu jābuferē, līdz tā pH sasniedz aptuveni 7,0, jo nebuferēts MS-222 šķīdums ir skābs un kairina varžu ādu, tāpēc vāji absorbējas un dzīvniekiem rada nevajadzīgu papildu stresu.

44. Izmantojot tīkliņu, kurkuli izņem no eksperimenta kameras un ievieto eitanāzijas šķīdumā. Dzīvnieks ir pienācīgi eitanazēts un gatavs nekropsijai, kad tas nereaģē uz ārējiem kairinājumiem, piem., pakaļējo ekstremitāšu saspiešanu ar pinceti.

Morfometrija (masa un garums)

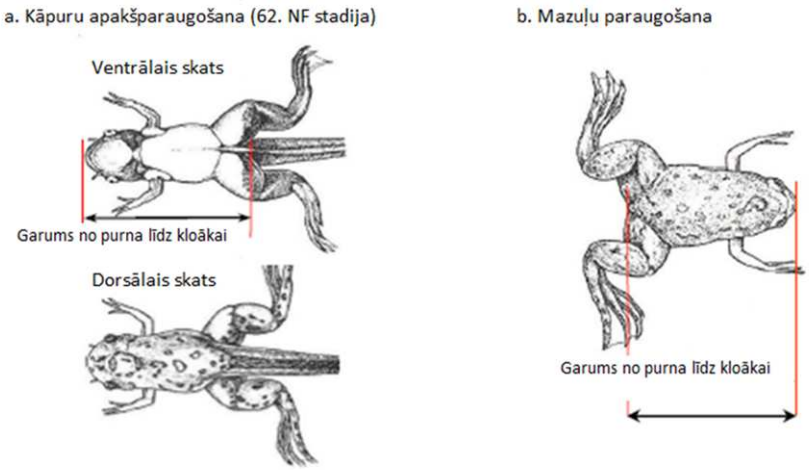
45. Tūlīt pēc tam, kad kurkulis anestēzijas ietekmē beidz reaģēt uz kairinājumiem, izmēra tā slapjmasu (līdz tuvākajam mg) un garumu no purna līdz kloākai (līdz tuvākajam 0,1 mm) (sk. 2.a attēlu). Izmantojot attēlu analīzes programmatūru, garumu no purna līdz kloākai var izmērīt no fotogrāfijas. Pirms svēršanas kurkuļi jānosusina, lai noņemtu lieko ūdeni. Pēc ķermeņa lieluma (masas un garuma no purna līdz kloākai) mērījumiem reģistrē vai piefiksē jebkādas smagas morfoloģiskas anormālijas un/vai klīniskas toksicitātes pazīmes, piem., skoliozi (sk. 8. papildinājumu), petehijas un asinsizplūdumus, un ieteicams šos datus dokumentēt digitāli. Petehijas ir nelieli sarkani vai violeti asinsizplūdumi ādas kapilāros.

Audu ievākšana un fiksācija

46. Novērtē kāpuru apakšparauga vairogdziedzeru histoloģiju. Torsa apakšdaļu aiz priekšējām ekstremitātēm noņem un izmet. Apgriezto ķermeni fiksē ar Deividsona fiksatoru. Tvertnē vajadzētu būt vismaz 10 reizes vairāk fiksatora nekā audu (aptuveni, pēc tilpuma). Lai interesējošos audus pienācīgi fiksētu, fiksators jāmaisa vai jāskalina riņķveidā. Visus audus Deividsona fiksatorā tur vismaz 48 h, bet ne ilgāk kā 96 h; tad tos noskalo ar dejonizētu ūdeni un glabā 10 % neitrālā buferētā formalīnā (1) (29).

Vairogdziedzera histoloģija

47. Katram kāpuru apakšparaugam (fiksētajiem audiem) histoloģiski novērtē vairogdziedzeri, t. i., nosaka diagnozi un bojājumu smagumu (29) (30).



2. attēls. Atskaites punkti, pēc kuriem testā *LAGDA* mēra 62. NF stadijas īpatņu (a) un varžu mazuļu (b) garumu no purna līdz kloākai. 62. NF stadijas īpatņu (a) pazīmes: galva tikpat plata kā torss, ožas nervs īsāks par ožas sīpola diametru (dorsālais skats) un priekšējās ekstremitātes sirds līmenī (ventrālais skats). Attēli adaptēti no *Nieuwkoop and Faber* (1994).

Kāpuru ekspozīcijas beigas

48. Ņemot vērā kurkuļu sākotnējo skaitu, gaidāms, ka neliela procentuālā to daļa neattīstīsies normāli un to metamorfoze pilnīgi nenoslēgsies (66. NF stadija) saprātīgā laikā. Kāpuru ekspozīcijai nevajadzētu pārsniegt 70 dienas. Kurkuļus, kuru metamorfoze līdz šā perioda beigām nav beigusies, eitanazē (sk. 43. punktu), izmēra to slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai, nosaka to stadiju pēc *Nieuwkoop and Faber* (1994) un atzīmē jebkādas konstatētas ontoģenētiskas anormālijas.

Atlase pēc 66. NF stadijas

49. Pēc 66. NF stadijas (pilnīga astes resorbcija) katrā tvertnē līdz ekspozīcijas beigām vajadzētu palikt desmit īpatņiem. Tāpēc, kad visi dzīvnieki sasnieguši 66. NF stadiju vai apritējušas 70 dienas (atkarībā no tā, kas notiek ātrāk), veic atlasi. Pēc 66. NF stadijas sasniegšanas nejaušināti izvēlas, kuru dzīvnieku ekspozīciju neturpināt.

50. Dzīvniekus, kuri nav atlasīti ekspozīcijas turpināšanai, eitanazē (sk. 43. punktu). Katram dzīvniekam nosaka ontoģenētisko stadiju, slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai (2.b attēls), kā arī veic makroskopisku nekropsiju. Atzīmē fenotipisko dzimumu (balstoties uz gonādu morfoloģiju): mātīte, tēviņš vai nav nosakāms.

Mazuļu paraugošana

Pārskats par mazuļu paraugošanu

51. Atlikušo dzīvnieku eksponēšanu turpina, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai atšķaidīšanas ūdens kontrolē (un/vai šķīdinātāja kontrolē, ja tāda ir). Ekspozīcijas perioda beigās atlikušos dzīvniekus (ne vairāk kā 10 vardes uz replikātu) eitanazē un izmēra vai izvērtē un reģistrē dažādos beigupunktus: 1) morfometrija (masa un garums), 2) fenotipisko/genotipisko dzimumu attiecības 3) aknu masa (hepatosomatiskais indekss), 4) histopatoloģija (gonādas, reproduktīvie kanāli, aknas un nieres) un (pēc izvēles) 5) VTG plazmā.

Humāna varžu nonāvēšana

52. Paraugotos mazuļus, postmetamorfiskās vardes, eitanazē, tām intraperitoneāli injicējot anestēzijas līdzekli, piem., 10 % MS-222 piemērotā fosfātbuferētā šķīdumā. Vardes var paraugot, kad tās vairs nereaģē uz kairinājumu (parasti aptuveni 2 min pēc injekcijas, ja 10 % MS-222 izmanto devā 0,01 ml uz vardes masas g). Lai gan varžu mazuļus varētu iegremdēt augstākas koncentrācijas anestēzijas līdzeklī (MS-222), pieredze rāda, ka ar tādu metodi anestēzija notiek vēlāk un ilgums var nebūt piemērots paraugošanai. Injekcija nodrošina efektīvu, ātru eitanāziju pirms paraugošanas. Paraugošanu nevajadzētu sākt, kamēr nav pārbaudīts, ka vardes nereaģē uz kairinājumu, tā pārliecinoties, ka dzīvnieki ir nedzīvi. Ja vardēm novērojamas ievērojamu ciešanu pazīmes (ļoti smagas, droši paredzama nāve) un tās uzskatāmas par mirstošām, tās anestezē un eitanazē, bet datu analīzes nolūkos uzskata par nāves gadījumiem. Ja vardi eitanazē tāpēc, ka tā mirst, tas jāatzīmē un jānorāda pārskatā. Atkarībā no tā, kurā pētījuma brīdī vardi eitanazē, var vardi paturēt, lai tai veiktu histopatoloģisko analīzi (vardi fiksēt iespējamas histopatoloģijas vajadzībām).

Morfometrija (masa un garums)

53. Slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai (2.b attēls) mēra tāpat kā kāpuru apakšparaugojuma gadījumā.

VTG plazmā (pēc izvēles)

54. VTG ir plaši atzīts biomarķieris, kas liecina par ekspozīciju estrogēniskām ķimikālijām. Testā *LAGDA* pēc izvēles var mērīt paraugoto mazuļu VTG līmeni plazmā (tas var būt īpaši relevanti, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija ir estrogēns).

55. Eitanazēto mazuļu pakaļējās ekstremitātes nogriež un asinis savāc pa heparinizētu kapilāru (lai gan piemērotas var būt arī citas asins savākšanas metodes, piem., sirds punkcija). Asinis izlaiž mikrocentrifūgas stobriņā (piem., ar tilpumu 1,5 ml) un centrifugē, lai iegūtu plazmu. Plazmas paraugus līdz VTG noteikšanai glabā -70 °C vai zemākā temperatūrā. VTG koncentrāciju plazmā var izmērīt ar imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*) (6. papildinājums) vai kādu citu metodi, piem., masspektrometriju (31). Lielāka jutīguma dēļ priekšroka dodama sugai specifiskām antivielām.

Ģenētiskā dzimuma noteikšana

56. Katram varžu mazulim nosaka ģenētisko dzimumu, balstoties uz *Yoshimoto et al.* (11) izstrādātajiem marķieriem. Lai noteiktu ģenētisko dzimumu, disekcijas laikā ņem vienas pakaļējās ekstremitātes daļu (vai to visu, vai jebkādus citus audus) un to ievieto mikrocentrifūgas stobriņā (varžu audu paraugus var ņemt no jebkādiem audiem). Līdz dezoksiribonukleīnskābes (DNS) izolēšanai audus var glabāt -20 °C vai zemākā temperatūrā. DNS izolēšanu no audiem var veikt ar komerciāli pieejamiem piederumu komplektiem, un analīzi uz marķiera esību vai neesību veic ar polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodi (5. papildinājums). Parasti kontrolgrupu dzīvnieku histoloģiskais dzimums un genotips mazuļu paraugošanas laikā sakrīt par vairāk nekā 95 %.

Audu ņemšana un fiksēšana histopatoloģijas vajadzībām

57. Histoloģiskajai analīzei galīgās paraugošanas laikā ņem gonādas, reproduktīvos kanālus, nieres un aknas. Atver vēdera dobumu, disektējot izņem aknas un tās nosver. Tad no vēdera apakšdaļas izņem gremošanas orgānus (piem., kuņģi, zarnas), atklājot gonādas, nieres un reproduktīvos kanālus. Jāatzīmē jebkādas smagas morfoloģiskas anormālijas gonādās. Beigās noņem pakaļējās ekstremitātes, ja tās nav jau iepriekš noņemtas asiņu savākšanai. Izņemtās aknas un ķermeni ar gonādām vēl *in situ* nekavējoties ievieto Deividsona fiksatorā. Tvertnē vajadzētu būt vismaz 10 reizes vairāk fiksatora nekā audu (aptuveni, pēc tilpuma). Visus audus Deividsona fiksatorā tur vismaz 48 h, bet ne ilgāk kā 96 h; tad tos noskalo ar dejonizētu ūdeni un glabā 10 % neitrālā buferētā formalīnā (1) (29).

Histopatoloģija

58. Katru paraugoto mazuli histoloģiski izvērtē uz gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu audu patoloģijām, t. i., nosaka diagnozi un piešķir smaguma atzīmi (32). No šā izvērtējuma iegūst arī gonādu fenotipu (piem., olnīcas, sēklinieki, hermafrodītisms), un kopā ar īpatņa ģenētiskā dzimuma raksturojumu šos novērojumus var izmantot fenotipisko/genotipisko dzimumu attiecību aprēķināšanai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

59. Testā *LAGDA* iegūst trīs veidu statistiski analizējamus datus: 1) kvantitatīvi nepārtrauktu beigupunktu dati (masa, garums no purna līdz kloākai, HSI, VTG), 2) "laiks līdz notikumam" tipa dati, kas raksturo attīstības gaitu laika griezumā (t. i., dienas līdz 62. NF stadijai no testa sākšanas) un 3) ordināli dati, kas ir smaguma atzīmes vai ontoģenētiskās stadijas no histopatoloģiskajiem izvērtējumiem.

60. Ir ieteicams, lai testa plāns un statistisko testu atlase dotu pietiekamu jaudu noteikt bioloģiski svarīgas izmaiņas beigupunktos gadījumos, kad jāziņo *NOEC* vai ECx. Veicot datu statistisko analīzi (parasti — balstoties uz replikātu vidējām vērtībām), vēlams ievērot procedūras, kas aprakstītas dokumentā *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* ["Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi"] (33). Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi, un norādījumi, kā datus apstrādāt un kā izvēlēties testam *LAGDA* vispiemērotāko statistisko testu vai modeli, ir sniegti 7. papildinājumā.

61. Tā kā visām vardēm nosaka genotipisko dzimumu, mazuļu paraugojuma dati (piem., pieaugums, HSI) analizējami par katra genotipiskā dzimuma dzīvniekiem atsevišķi.

Ar datu analīzi saistītie apsvērumi

Kompromitētu replikātu un apstrāžu izmantošana

62. Replikātus un apstrādes var kompromitēt pārmērīga mirstība acīmredzamas toksicitātes, slimības vai tehniskas kļūdas dēļ. Ja apstrāde ir kompromitēta slimības vai tehniskas kļūdas dēļ, analīzei jābūt pieejamām trim nekompromitētām apstrādēm ar trim nekompromitētiem replikātiem. Ja acīmredzama toksicitāte konstatējama augsto līmeņu apstrādēs, ir vēlams, lai analīzei būtu pieejami vismaz trīs apstrādes līmeņi ar trim nekompromitētiem replikātiem (atbilstoši maksimālās pieļaujamās koncentrācijas pieejai, ko izmanto ESAO testēšanas vadlīnijās (34)). Līdzās nāves gadījumiem acīmredzamas toksicitātes pazīmes ietver uzvedības īpatnības (piem., pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana), morfoloģiskus bojājumus (piem., hemorāģiski bojājumi, vēdera uzpūšanās) vai normālas barošanās inhibēšanos kvalitatīvā salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem.

Šķīdinātāja kontrole

63. Testu beidzot, izvērtē potenciālo šķīdinātāja ietekmi (ja tāds izmantots). To dara, šķīdinātāja kontrolgrupu statistiski salīdzinot ar atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Visrelevantākie šajā analīzē izskatāmie beigupunkti ir pieauguma determinanti (masa un garums), jo tos var ietekmēt vispārēja toksicitāte. Ja šajos beigupunktos konstatē statistiski nozīmīgas atšķirības starp atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, tas, vai ir kompromitēts testa derīgums, rūpīgi jāizvērtē speciālistam. Ja abu kontroļu rezultāti ir atšķirīgi, ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama atšķaidīšanas ūdens kontrolei. Ja statistiski nozīmīgu atšķirību starp abām kontrolgrupām nav, ir ieteicams testējamajai ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzināt ar abām grupām (šķīdinātāja un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupām) kopā, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama tikai šķīdinātāja vai tikai atšķaidījuma ūdens kontrolgrupai.

Testēšanas pārskats

64. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības;

— vienkomponenta viela:

izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (ciktāl vajadzīgs un iespējams) u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs);

— daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga:

— zinātniskais nosaukums, celms (ja zināms), avots un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmākas manipulācijas;

— skoliozes incidence izmantotās izejkultūras vēsturiskajās kontrolēs.

Testa apstākļi:

— fotoperiodi;

— testa plāns (piem., kameru lielums, materiāls un ūdens tilpums, testa kameru un replikātu skaits, testa organismu skaits uz replikātu);

— izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjauninašanas biežums (ja tādu izmanto, norāda šķīdināšanas aģentu un tā koncentrāciju);

— testējamās ķimikālijas dozēšanas metode (piem., sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);

— metodei raksturīgā atgūstamība un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko tās iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, hlora atlikuma līmeņi (ja mērīti), kopējais jods, kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās cietvielas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;

— nominālās testējamās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie un to standartnovirzes;

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, temperatūra (katru dienu) un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

— sīka informācija par barošanu (piem., barības veidi, avots, dotais daudzums un došanas biežums).

Rezultāti:

— pierādījumi, ka kontroles atbilst derīguma kritērijiem;

— šādi dati par kontroli (un šķīdinātāja kontroli, ja tāda ir) un apstrādes grupām: novērotā mirstība un anormālijas, laiks līdz 62. NF stadijai, vairogdziedzera histoloģiskais novērtējums (tikai paraugotajiem kāpuriem), pieaugums (masa un garums), HSI (tikai paraugotajiem mazuļiem), ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības (tikai paraugotajiem mazuļiem), gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu histopatoloģiskā novērtējuma rezultāti (tikai paraugotajiem mazuļiem) un VTG plazmā (tikai paraugotajiem mazuļiem un tikai tad, ja šo mērījumu veic);

— statistiskās analīzes pieeja un datu apstrāde (izmantotais statistiskais tests vai modelis);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) (α=0,05); katrai novērtētajai atbildreakcijai — ECx (attiecīgā gadījumā) un ticamības intervāli (piem., 95 %) un ECx aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficients, regresijas modeļa formula, aplēstie modeļa parametri un to standartkļūdas;

— jebkādas novirzes no testēšanas metodes un novirzes no pieņemamības kritērijiem, kā arī apsvērumi par iespējamo ietekmi uz testa iznākumu.

65. Attiecībā uz beigupunktu mērījumiem jānorāda vidējās vērtības un to standartnovirzes (ja iespējams, gan uz replikātu, gan uz koncentrāciju).

66. Jāaprēķina medianālais laiks līdz 62. NF stadijai kontrolēs un tas jāattēlo kā replikātu mediānu vidējā vērtība ar standartnovirzi. Šis medianālais laiks jāaprēķina arī apstrādēs un jāattēlo kā replikātu mediānu vidējā vērtība ar standartnovirzi.

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.4. nodaļa. Bionoārdāmības viegluma tests.

(18) Šā pielikuma C.29. nodaļa. Vieglas bionoārdīšanās spēja: CO_2 hermētiski noslēgtos traukos (brīvā tilpuma tests).

(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) Šā pielikuma C.38. nodaļa. Abinieku metamorfozes tests.

(26) Šā pielikuma C.48. nodaļa. Īsais zivju vairošanās tests.

(27) Šā pielikuma C.41. nodaļa. Zivju dzimumattīstības tests.
(28) Šā pielikuma C.49. nodaļa. Zivju embriju akūtās toksicitātes (*FET*) tests.
(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.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Apikālais beigupunkts: beigupunkts ar ietekmi populācijas līmenī.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

ECx: (efektīvā koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, pie kuras ietekme uz testa organismiem konkrētā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontroli ir x %. Piemēram, EC_{50} ir koncentrācija, kas pēc aplēsēm konkrētā ekspozīcijas periodā ietekmē kādu testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

dpa: dienas pēc apaugļošanas.

Caurplūdes tests: tests, kurā testa šķīdumi visā ekspozīcijas laikā nepārtraukti plūst caur testa sistēmu.

HHG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (*LOEC*): ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$). Pie visām testa koncentrācijām, kas augstākas par *LOEC*, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie *LOEC*. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā *LOEC* (un līdz ar to arī *NOEC*) izraudzīta. Norādījumi sniegti 7. papildinājumā.

Medianālā letālā koncentrācija (LC_{50}): testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas pēc aplēsēm testa laikā ir letāla 50 % testa organismu.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*): testa koncentrācija, kura ir tieši zem *LOEC* un kurai, salīdzinot ar kontroli, noteiktā ekspozīcijas periodā nav nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

VTG: vitelogenīns, olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas tādu seksuāli aktīvu mātīšu organismā, kuras dēj olas / nērš ikrus.

2. papildinājums

DAŽI PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI

Viela	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmijs	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

3. papildinājums

TESTA LAGDA NOSACĪJUMI

1. Testa suga	*Xenopus laevis*
2. Testa veids	Pastāvīgas caurplūdes
3. Ūdens temperatūra	Nominālā temperatūra ir 21 °C. Vidējā temperatūra testa laikā ir 21 ± 1 °C (atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 1,0 °C)
4. Apgaismojuma kvalitāte	Fluorescējošās spuldzes (plaša spektra), 600–2000 lx (lm/m^2) uz ūdens virsmas
5. Fotoperiods	12 h gaismas, 12 h tumsas
6. Testa šķīduma tilpumdaudzums un testa trauks (tvertne)	4–10 l (ūdens dziļums: vismaz 10–15 cm) Stikla vai nerūsošā tērauda tvertne
7. Testa šķīdumu tilpumapmaiņa	Nemainīga, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ekspozīciju ķimikālijai (piem., 5 tvertnes tilpumapmaiņas dienā)
8. Testa organismu vecums iniciēšanas laikā	8.–10. Nivkopa un Fabera (NF) stadija
9. Organismu skaits uz replikātu	20 dzīvnieki (embriji) uz tvertni (replikātu), kad ekspozīcija tiek sākta, un 10 dzīvnieki (mazuļi) uz tvertni (replikātu) no 66. NF stadijas līdz ekspozīcijas beigām
10. Apstrāžu skaits	Vismaz 4 apstrādes ar testējamo ķimikāliju un attiecīga kontrole vai kontroles
11. Replikātu skaits uz vienu apstrādi	4 replikāti uz apstrādi ar testējamo ķimikāliju un 8 replikāti kontrolei vai kontrolēm
12. Organismu skaits uz testējamo koncentrāciju	Vismaz 80 dzīvnieki uz apstrādi ar testējamo ķimikāliju un 160 dzīvnieki kontrolei vai kontrolēm
13. Atšķaidīšanas ūdens	Jebkāds ūdens, kurā *X. laevis* var normāli augt un attīstīties (piem., avota ūdens vai caur ogli izfiltrēts krāna ūdens)
14. Aerācija	Nav obligāta, bet tvertnes var būt jāaerē, ja izšķīdušā skābekļa līmenis nokrītas zem ieteicamās robežvērtības un tiek maksimalizēts testa šķīduma caurplūdums.
15. Testa šķīdumā izšķīdušais skābeklis	Izšķīdušais skābeklis: ≥ 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības vai ≥ 3,5 mg/l

16. Testa šķīduma pH	6,5–8,5 (atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 0,5)
17. Testa šķīduma cietība un sārmainība	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Barošanas režīms	(Sk. 4. papildinājumu)
19. Ekspozīcijas periods	No 8.–10. NF stadijas līdz laikam, kad aprit desmit nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai ūdens un/vai šķīdinātāja kontrolgrupā (ne vairāk kā 17 nedēļas)
20. Bioloģiskie beigupunkti	Mirstība (un novērotās anormālijas), laiks līdz 62. NF stadijai (paraugotie kāpuri), vairogdziedzera histoloģiskais novērtējums (paraugotajiem kāpuriem), pieaugums (masa un garums), hepatosomatiskais indekss (paraugotajiem mazuļiem), ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības (paraugotajiem mazuļiem), gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu histopatoloģija (paraugotajiem mazuļiem) un vitelogenīna līmenis plazmā (paraugotajiem mazuļiem, pēc izvēles)
21. Testa derīguma kritēriji	Izšķīdušais skābeklis > 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības; ūdens temperatūra 21 ± 1 °C diapazonā un atšķirības starp replikātiem un apstrādēm < 1,0 °C; testa šķīduma pH no 6,5 līdz 8,5; mirstība kontrolē ≤ 20 % katrā replikātā, un vidējais laiks līdz 62. NF stadijai kontrolē ≤ 45 dienas; kontrolēs un testa kontrolēs (ja tādas izmanto) testa organismu vidējā masa 62. NF stadijā un testa beigās attiecīgi 1,0 ± 0,2 un 11,5 ± 3 g; pieejamas liecības, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

4. papildinājums

BAROŠANAS REŽĪMS

Jāatzīmē, ka, lai gan ieteicams izmantot šo barošanas režīmu, ir pieļaujami izmantot arī citus, ja vien testa organismi aug un attīstās pienācīgi raiti.

Kāpuru barošana

Kāpuru barības sagatavošana

A. 1:1 (tilp./tilp.) foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents);

1. foreļu starterbarība: 50 g foreļu starterbarības (smalkas granulas vai pulveris) sajauc ar 300 ml piemērota filtrēta ūdens, to 20 s jaucot blenderī augstas intensitātes režīmā;

2. aļģu/*TetraFin*® (vai ekvivalenta) maisījums: 12 g spirulīnas aļģu disku sajauc ar 500 ml filtrēta ūdens, tos 40 s jaucot blenderī augstas intensitātes režīmā, 12 g *TetraFin*® (vai ekvivalenta) sajauc ar 500 ml filtrēta ūdens un tad abus sajauc kopā, lai iegūtu 1 l 12 g/l spirulīnas aļģu un 12 g/l *TetraFin*® (vai ekvivalenta);

3. sajaukto foreļu starterbarību un aļģu/*TetraFin*® (vai ekvivalenta) maisījumu sajauc vienādos tilpumdaudzumos

B. Sāļūdens garneles:

15 ml sāļūdens garneļu ikru izšķildina 1 l sālsūdens (ko sagatavo, 1 l dejonizēta ūdens pievienojot 20 ml NaCl). Tos 24 h aerē istabas temperatūrā pastāvīgā gaismā un tad ievāc sāļūdens garneles. Aerēšanu izbeidz un sāļūdens garnelēm 30 min ļauj nosēsties. Cistas, kas paceļas trauka augšā, izlej un izmet, bet garneles pienācīgi izfiltrē un tilpumu ar filtrētu ūdeni palielina līdz 30 ml.

Barošanas protokols

1. tabulā norādīts, kāda veida barību un cik daudz dod, veicot ekspozīciju, kamēr dzīvnieki ir kāpura stadijās. Dzīvniekus baro trīs reizes dienā no pirmdienas līdz piektdienai un reizi dienā nedēļas nogalēs.

1. tabula.

***X. laevis* kāpuru barošanas režīms caurplūdes apstākļos**

Laiks (*) (pēc apaugļošanas)	Foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents)		Sāļūdens garneles	
	Darbdiena (3 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)	Darbdiena (2 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)
4.–14. diena (0.–1. nedēļa)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8.–15. dienā) 1 ml (no 16. dienas)	0,5 ml (8.–15. dienā) 1 ml (no 16. dienas)
2. nedēļa	0,67 ml	2,4 ml		
3. nedēļa	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. nedēļa	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Laiks (*) (pēc apaugļošanas)	Foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents)		Sāļūdens garneles	
	Darbdiena (3 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)	Darbdiena (2 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)
5. nedēļa	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. nedēļa	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. nedēļa	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(8.–10. nedēļa)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) 0. diena ir tā, kurā injicē *hCG*.

Pāreja no kāpuru diētas uz mazuļu diētu

Kāpuru metamorfozei noslēdzoties, to diētu maina uz mazuļu diētu, kā aprakstīts tālāk. Šīs pārejas laikā būtu jāsamazina kāpuru barības daudzums, vienlaikus palielinot mazuļu barības daudzumu. To var panākt, kāpuru barības daudzumu proporcionāli samazinot un tajā pašā laikā proporcionāli palielinot mazuļu barības daudzumu, katrai piecu kurkuļu grupai pārsniedzot 62. NF stadiju un tuvojoties metamorfozes beigām — 66 NF stadijai.

Mazuļu barošana

Mazuļu diēta

Kad metamorfoze ir beigusies (66. stadija), barošanā pāriet tikai uz 3/32 ″ pirmšķirīgu grimstošu varžu barību (*Xenopus Express*^{TM}, FL, ASV) vai ekvivalentu.

Sasmalcinātu granulu sagatavošana pārejai no kāpuru diētas uz mazuļu diētu

Grimstošās varžu barības granulas nedaudz sasmalcina kafijas dzirnaviņās, blenderī vai piestā tā, lai granulu lielums samazinātos par aptuveni 1/3. Apstrādi turpinot pārāk ilgi, iegūst pulveri, un tas nav vēlami.

Barošanas protokols

2. tabulā norādīts, kāda veida barību un cik daudz dod mazuļiem un pieaugušiem īpatņiem. Dzīvniekus baro reizi dienā. Jāatzīmē, ka, dzīvniekiem metamorfozējoties, tie joprojām saņem daļu sāļūdens garneļu, kamēr metamorfoze nav noslēgusies > 95 % dzīvnieku.

Dzīvniekus nevajadzētu barot testa beigu dienā, lai barība neietekmētu masas mērījumus.

2. tabula

X. *laevis* mazuļu barošanas režīms caurplūdes apstākļos. Jāatzīmē, ka nemetamorfozējušies dzīvnieki, arī tādi, kuru metamorfoze aizkavējusies sakarā ar apstrādi ar ķimikāliju, nesasmalcinātas granulas ēst nevar.

Laiks (*) (Nedēļas pēc medianālās metamorfozes dienas)	Sasmalcinātās granulas (mg uz vardulēnu)	Veselās granulas (mg uz vardulēnu)
Beidzoties dzīvnieku metamorfozei	25	0
0.–1. nedēļa	25	28
2.–3. nedēļa	0	110
4.–5. nedēļa	0	165
6.–9. nedēļa	0	220

(*) 0. nedēļas pirmā diena ir kontroles dzīvnieku medianālā metamorfozes diena.

5. papildinājums

ĢENĒTISKĀ DZIMUMA NOTEIKŠANA

Xenopus laevis ģenētiskā dzimuma noteikšanas pamatā ir *Yoshimoto et al.*, 2008. Detalizētas genotipēšanas procedūras vajadzības gadījumā var atrast minētajā publikācijā. Var izmantot arī citas metodes (piem., augsta caurlaiduma kvantitatīvo *PCR*), ja tās uzskata par piemērotām.

X. *laevis* praimeri

Marķieris DM-W

Tiešais:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Atgriezeniskais:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitīvā kontrole

Tiešais:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Atgriezeniskais:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNS attīrīšana

Attīriet DNS no muskuļu vai ādas audiem ar, piem., *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506)* vai līdzīgu produktu, ievērojot attiecīgā piederumu komplekta instrukcijas. DNS var eluēt no rotācijas stobriņiem, izmantojot mazāk buferšķīduma, lai paraugi būtu koncentrētāki, ja tas šķiet nepieciešams *PCR*. Jāatzīmē, ka DNS ir diezgan stabila, tāpēc jāizvairās no krusteniskās kontaminācijas, kuras iespaidā tēviņus varētu identificēt kā mātītes vai otrādi.

PCR

Paraugprotokols ar *Sigma JumpStart*^{TM}*Taq* ir sniegts **1. tabulā**.

1. tabula.

Paraugprotokols ar *Sigma JumpStart*^{TM} *Taq*

Pamatmaisījums [*master mix*]	1x (µl)	[Final]
NFW ([1])	11	—
10x buferis	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTF (10 mM katrs)	0,4	200 µM
Praimera marķieris (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marķieris, atgriezeniskais praimeris (8 µM)	0,8	0,3 µM
Praimera kontrole (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrole, atgriezeniskais praimeris (8 µM)	0,8	0,3 µM

Pamatmaisījums [*master mix*]	1x (µl)	[Final]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 vienības/µl
DNS veidne	1,0	~200 pg/µl

([1]) Beznukleāzu ūdens.Piezīme. Gatavojot pamatmaisījumus, sagatavojiet lielāku daudzumu, lai kompensētu pipetēšanā radušos zudumus (piemērs: 25x būtu izmantojams tikai 24 reakcijām).

Reakcija

Pamatmaisījums	19,0 µl
Veidne	1,0 µl
Kopā	20,0 µl

Termociklera profils:

1. etaps.	94 °C	1 min
2. etaps.	94 °C	30 s
3. etaps.	60 °C	30 s
4. etaps.	72 °C	1 min
5. etaps.	Atgriezties uz 2. etapu.	35 cikli
6. etaps.	72 °C	1 min
7. etaps.	Turēt 4 °C	

PCR produktus var nekavējoties ievietot gēlā vai glabāt 4 °C.**Agarozes gēla elektroforēze (3 %) (paraugprotokols)**

50X TAE

Tris	24,2 g
Ledus etiķskābe	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Pievieno ūdeni, līdz tilpums sasniedz 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 agaroze

3 daļas *NuSieve™ GTG™* agarozes

1 daļa Fišera agarozes (ar zemu elektroendoosmozi (EEO))

Metode

1. Sagatavo 3 % gēlu, 1,2 g agarozes maisījuma pievienojot 43 ml 1X TAE. Saskalina, lai sadalītu lielus sakopojumus.

2. Agarozes maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī līdz pilnīgai izšķīšanai (neļaujot iet pāri). Ļauj mazliet atdzist.

3. Pievieno 1,0 µl etīdija bromīda (10 mg/ml). Kolbu saskalina. Jāatzīmē, ka etīdija bromīds ir mutagēnisks, tāpēc, ciktāl tas tehniski iespējams, šim solim vajadzētu izmantot citas ķimikālijas, lai mazinātu riskus darba ņēmēju veselībai ([2]).

4. Gēlu ielej veidnē ar ķemmīti. To pilnīgi atdzesē.

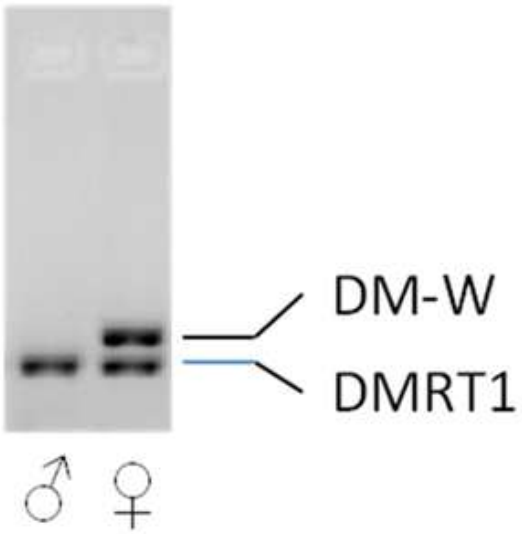
5. Gēlu ievieto aparātā. Gēlu pārklāj ar 1X TAE.

6. Katriem 10 µl *PCR* produkta pievieno 1 µl 6x uznešanas krāsas.

7. Paraugus ar pipeti ievieto iedobēs.

8. Veic elektroforēzi (konstanti 160 volti) ~20 min.

Agarozes gēla attēlu, kurā redzami tēviņiem un mātītēm raksturīgie raksti, sk. **1. attēlā**.



1. attēls. Agarozes gēla attēls, kurā redzami tēviņam (♂) (viena josla, ~203 bp: DMRT1) un mātītei (♀) (divas joslas, ~259 bp: DM-W un 203 bp:DMRT1) raksturīgie raksti.

LITERATŪRA

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: 2 469-2 474.

([2]) Saskaņā ar 4. panta 1. punktu Eiropas Parlamenta un Padomes 2004. gada 29. aprīļa Direktīvā 2004/37/EK par darba ņēmēju aizsardzību pret risku, kas saistīts ar kancerogēnu vai mutagēnu iedarbību darbā (Sestā atsevišķā direktīva Padomes Direktīvas 89/391/EEK 16. panta 1. punkta nozīmē) (OV L 158, 30.4.2004., 50. lpp.).

6. papildinājums

VITELOGENĪNA MĒRĪŠANA

Vitelogenīnu (VTG) mēra, izmantojot imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*), kas sākotnēji izstrādāta melngalvas mailītes VTG mērīšanai (*Parks et al.*, 1999). Pašlaik *X. laevis* nav pieejamas nekādas komerciāli pieejamas antivielas. Tomēr, ņemot vērā, cik daudz ir informācijas par šo proteīnu un cik viegli pieejami ir izmaksefektīvi komerciāli antivielu ieguves pakalpojumi, ir pamats domāt, ka laboratorijas varētu viegli izstrādāt *ELISA* šim mērījumam (*Olmstead et al.*, 2009). *Olmstead et al.* (2009) turklāt aprakstīts testa variants, kas pielāgots VTG mērīšanai *X. tropicalis* (sk. tālāk). Šajā metodē tiek izmantota antiviela pret *X. tropicalis* VTG, bet ir zināms, ka tā darbojas arī ar *X. laevis* VTG. Jāatzīmē, ka var izmantot arī nekonkurējošu *ELISA* un ka tai var būt mazāka noteikšanas robeža nekā tālāk aprakstītajai metodei.

Materiāli un reaģenti

— Iepriekš adsorbētas 1. antivielas (Av) serums

— 1 daļu seruma, kas satur 1. antivielu pret *X. tropicalis* VTG, sajauc ar 2 daļām tēviņu plazmas un atstāj istabas temperatūrā ~75 min, novieto uz ledus uz 30 min, 1 h centrifugē ar > 20 K x G 4 °C temperatūrā, nolej supernatantu, alikvotē un glabā -20 °C.

— 2. antiviela

— kazu prettrušu IgG-HRP konjugāts (piem., *Bio-Rad* 172-1019)

— VTG etalons

— attīrīts *X. laevis* VTG 3,3 mg/ml

— TMB (3,3′,5,5′-tetrametilbenzidīns) (piem., KPL 50-76-00 vai *Sigma* T0440)

— normālais kazu serums (*NGS*)(piem., *Chemicon*® S26-100 ml)

— 96 iedobju EIA polistirola mikrotitrēšanas plates (piem., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— 37 °C hibridizācijas krāsns (vai ātras ekvilibrācijas gaisinkubators) platēm, ūdens vanna stobriņiem

— Cits parasts laboratorijas aprīkojums, ķimikālijas un piederumi.

Receptes

Klājbuferis (50 mM karbonātbuferis, pH 9,6)

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
ūdens	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfāta, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
ūdens	810 ml

Skalošanas buferis (PBST):

10X PBS	100 ml
ūdens	900 ml

Koriģēt pH līdz 7,3 ar 1 M HCl, tad pievienot 0,5 ml *Tween-20*

Testa buferis:

normālais kazu serums (*NGS*)	3,75 ml
Skalošanas buferis	146,25 ml

Paraugu ņemšana

Ar heparinizētu mikrohematokrītu caurulīti paņem asinis un liek uz ledus. Pēc 3 min ilgas centrifugēšanas caurulīti atzīmē, atlauž un plazmu izspiež 0,6 ml mikrocentrifūgas stobriņos, kas satur 0,13 vienības liofilizēta aprotinīna. (Šos stobriņus sagatavo iepriekš, tajos ievietojot pienācīgu aprotinīna daudzumu, tos sasaldējot un nelielā karstumā liofilizējot vakuumkoncentratorā, līdz tie ir sausi.) Līdz analizēšanai plazmu glabā -80 °C.

Procedūra vienai platei

Plates pārklāšana

20 µl attīrīta VTG sajauc ar 22 ml karbonātbufera (galīgā koncentrācija: 3 µg/ml). Uz katru 96 iedobju plates iedobi pārnes 200 µl maisījuma. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 2 h (vai 4 °C uz nakti).

Plates bloķēšana

2 ml normālā kazu seruma (*NGS*) pievienojot 38 ml karbonātbufera, sagatavo bloķējošo šķīdumu. Noņem pārklājšķīdumu un plati nokrata sausu. Uz katru iedobi pārnes 350 µl bloķējošā šķīduma. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 2 h (vai 4 °C uz nakti).

Etalonu sagatavošana

5,8 µl attīrīta VTG etalona vienreizlietojamā 12 x 75 mm borsilikāta stikla mēģenē sajauc ar 1,5 ml testa buferšķīduma. Tā iegūst 12 760 ng/ml. Tad veic sērijveida atšķaidīšanu, 750 µl testa buferšķīduma pievienojot 750 µl iepriekšējā atšķaidījuma, lai iegūtu šādas galīgās koncentrācijas: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 un 50 ng/ml.

Paraugu sagatavošana

Sāk ar plazmas šķīdumu testa buferšķīdumā attiecībā 1:300 (piem., 1 µl plazmas sajauc ar 299 µ testa buferšķīduma) vai 1:30. Ja paredzams liels daudzums VTG, var būt vajadzīga papildu atšķaidīšana vai atšķaidīšana lielākā daudzumā. Jācenšas B/B_o noturēt etalondiapazonā. Ja paraugā VTG nav manāms, piem., kontroles tēviņu un mātīšu (kas visi ir nenobrieduši) gadījumā, izmanto šķīdumu 1:30. Mazāk atšķaidīti paraugi var uzrādīt nevēlamu matricas ietekmi.

Ir ieteicams katrā platē veikt analīzi pozitīvam kontrolparaugam. To ņem no plazmas sakopojuma, kurā ir inducēts augsts VTG līmenis. Šo sakopojumu sākotnēji izšķīdina *NGS*, sadala alikvotās un glabā -80 °C. Katrai platei atkausē vienu alikvotu, to tālāk izšķīdina testa buferšķīdumā un analizē tāpat kā testējamo paraugu.

Inkubēšana ar 1. antivielu

1. Av sagatavo, iepriekš adsorbētas 1. Av serumu atšķaidot ar testa buferšķīdumu attiecībā 1:2000 (piem., 8 µl uz 16 ml testa buferšķīduma). 300 µl 1. Av šķīduma stikla stobriņā sajauc ar 300 µl parauga/etalona. Līdzīgi sagatavo B_o stobriņu: 300 µl testa buferšķīduma un 300 µl antivielas. Un, izmantojot 600 µl testa buferšķīduma (tikai buferšķīdumu, bez Av), sagatavo NSB stobriņu. Stobriņus pārklāj ar parafilmu un uzmanīgi vorteksē, lai sajauktu. Uz 1 h inkubē 37 °C ūdens vannā.

Plates noskalošana

Tieši pirms 1. Av inkubācijas beigām plati noskalo. To izdara, izkratot saturu un nosusinot ar absorbējošu papīru. Tad iedobes piepilda ar 350 µl skalošanas šķīduma, to izlej un nosusina. Te noder daudzkanālu atkārtojumpipete vai plašu skalotājs. Skalošanas posmu atkārto vēl divas reizes (kopā skalo trīs reizes).

Plates uzpildīšana

Kad plate izskalota, stobriņus izņem no ūdens vannas un viegli vorteksē. Pievieno 200 µl no katra parauga, etalona, B_o un NSB, katru divām plates iedobēm. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 1 h.

Inkubēšana ar 2. antivielu

Kad beigusies iepriekšējā posmā aprakstītā inkubācija, plati atkal trīs reizes izskalo, kā aprakstīts iepriekš. Atšķaidīto 2. Av sagatavo, 2,5 µl 2. Av sajaucot ar 50 ml testa buferšķīduma. Uz katru iedobi pārnes 200 µl atšķaidītas 2. Av, noslēdz kā iepriekš un atstāj inkubēties 37 °C 1 h.

Substrāta pievienošana

Kad inkubācija ar 2. Av ir pabeigta, plati trīs reizes izskalo, kā aprakstīts iepriekš. Tad uz katru iedobi pārnes 100 µl TMB substrāta. Reakcijai ļauj turpināties 10 min, vēlams, ne spilgtā gaismā. Reakciju izbeidz, pievienojot 100 µl 1 M fosforskābes. Krāsai jāmainās no zilas uz koši dzeltenu. Ar mikroplašu lasītāju izmēra absorbciju pie 450 nm.

B/B_o aprēķināšana

No visiem mērījumiem atskaita vidējo NSB vērtību. Katra parauga un etalona B/B_o aprēķina, absorbcijas vērtību (B) dalot ar vidējo absorbciju paraugā B_o.

Standartlīknes iegūšana un nezināmo noskaidrošana

Ar grafiku datorprogrammatūru (piem., *Slidewrite*™ vai *Sigma Plot*®) iegūst standartlīkni, kas parauga B/B_o ekstrapolē, balstoties uz etalonu B/B_o. Parasti daudzumu atliek uz logaritmiskas skalas un līkne ir sigmoīda. Tomēr, ja izmanto šauru etalonu diapazonu, tā var izskatīties lineāra. Paraugu daudzumus koriģē pēc atšķaidījuma koeficienta un pārskatā norāda kā mg VTG uz ml plazmas.

Minimālo noteikšanas robežu noteikšana

Bieži vien (it sevišķi normālu tēviņu gadījumā) var nebūt skaidrs, kā norādīt rezultātus, kas iegūti no zemām vērtībām. Šādos gadījumos to, vai vērtība norādāma kā nulle vai cits skaitlis, nosaka ar 95 % ticamības intervālu. Ja parauga rezultāts ir nulles etalona (B_o) ticamības intervāla robežās, rezultāts norādāms kā nulle. Minimālais noteikšanas līmenis ir zemākais etalons, kas pastāvīgi atšķiras no nulles etalona; t. i., abi ticamības intervāli nepārklājas. Ja parauga rezultāts ir minimālās noteikšanas līmeņa ticamības intervāla robežās vai to pārsniedz, ziņo aprēķināto vērtību. Ja paraugs ir starp nulles standarta un minimālā noteikšanas līmeņa ticamības intervāliem, kā parauga vērtību ziņo pusi no minimālā noteikšanas līmeņa.

LITERATŪRA

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.

7. papildinājums

STATISTISKĀ ANALĪZE

Testā *LAGDA* iegūst trīs veidu statistiski analizējamus datus: 1) kvantitatīvi nepārtrauktu beigupunktu dati, 2) "laiks līdz notikumam" tipa dati, kas raksturo attīstības gaitu laika griezumā (laiks līdz 62. NF stadijai) un 3) ordināli dati, kas ir smaguma atzīmes vai ontoģenētiskās stadijas no histopatoloģiskajiem izvērtējumiem. Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi testam *LAGDA*, ir sniegta 1. attēlā. Turklāt tālāk sniegtas dažas piezīmes, kas var noderēt, veicot *LAGDA* mērījumu statistisko analīzi. Mirstības, pieauguma (masa un garums) un hepatosomatiskā indeksa (HSI) mērījumu rezultāti diagrammā, pēc kuras pieņem lēmumu par analīzi, būtu jāanalizē pēc diagrammas atzara "Citi beigupunkti".

Nepārtrauktu beigupunktu dati

Vispirms jāpārbauda, vai nepārtrauktu beigupunktu dati ir monotoni, tos hierarhizējot, piemeklējot *ANOVA* modeli un salīdzinot lineāros un kvadrātiskos kontrastus. Ja dati ir monotoni, veic descendentu Džonkhīra–Terpstras trenda testu ar replikātu mediānām un nekādu tālāku analīzi neveic. Normālsadalītiem datiem ar homogēnām dispersijām var izmantot arī descendento Viljamsa testu. Ja dati nav monotoni (kvadrātiskais kontrasts nozīmīgs un lineārais nenozīmīgs), tie jāanalizē, izmantojot jaukto efektu *ANOVA* modeli. Tad jāpārbauda datu normalitāte (vēlams, ar Šapiro–Vilka vai Andersona–Dārlinga testu) un dispersijas homogenitāte (vēlams, ar Levīna testu). Abus testus veic ar jaukto efektu *ANOVA* modeļa atlikumiem. Formālo normalitātes un dispersijas homogenitātes testu vietā var izmantot ekspertu atzinumus, bet priekšroka dodama formālajiem testiem. Ja dati ir normālsadalīti un dispersija ir homogēna, ir izpildīti jaukto efektu *ANOVA* pieņēmumi un nozīmīgu apstrādes ietekmi var noteikt ar Daneta testu. Ja tiek konstatēta nenormalitāte vai dispersijas heterogenitāte, ir pārkāpti Daneta testa pieņēmumi un ir jāveic normalizējoša, dispersiju stabilizējoša transformācija. Ja šādu transformāciju atrast neizdodas, nozīmīgu apstrādes ietekmi nosaka ar Dannas testu. Kad vien iespējams, veic vienpusēju, nevis abpusēju testu, bet tas, kurš tests konkrētam beigupunktam ir piemērots, ir jāizspriež speciālistam.

Mirstība

Dati par mirstību jāanalizē par laiku, kas aptver visu testu, un izsakāmi kā procentuālā daļa dzīvnieku, kas konkrētā tvertnē miruši. Kurkuļi, kuru metamorfoze nenoslēdzas dotajā laikposmā, kurkuļi, kas ir kāpuru apakšparauga kohortā, atlasē atmestie varžu mazuļi un visi dzīvnieki, kas mirst eksperimentatora kļūdas dēļ, ietverami cenzētajos datos, un procentu aprēķina saucējā tos neiekļauj. Pirms jebkādu statistisko analīžu veikšanas mirstības proporcijām jāveic arksinusa–kvadrātsaknes transformācija. Alternatīva ir izmantot descendentu Kohrana–Ārmitidža testu, vēlams, ar Rao–Skota korekciju, ja izkliede ir pārmērīga.

Masa un garums (pieauguma dati)

Tēviņi un mātītes metamorfozes laikā nav dzimumdimorfi, tāpēc kāpuru apakšparaugojuma pieauguma datus analizē neatkarīgi no dzimuma. Savukārt mazuļu pieauguma datus analizē atsevišķi pēc ģenētiskā dzimuma. Šiem beigupunktiem var būt jāveic logaritmiska transformācija, jo dati par lielumu bieži vien ir lognormāli.

Hepatosomatiskais indekss (HSI)

Aknu masu normalizē kā visa ķermeņa masas proporciju (t. i., HSI) un analizē atsevišķi pēc ģenētiskā dzimuma.

Laiks līdz 62. NF stadijai

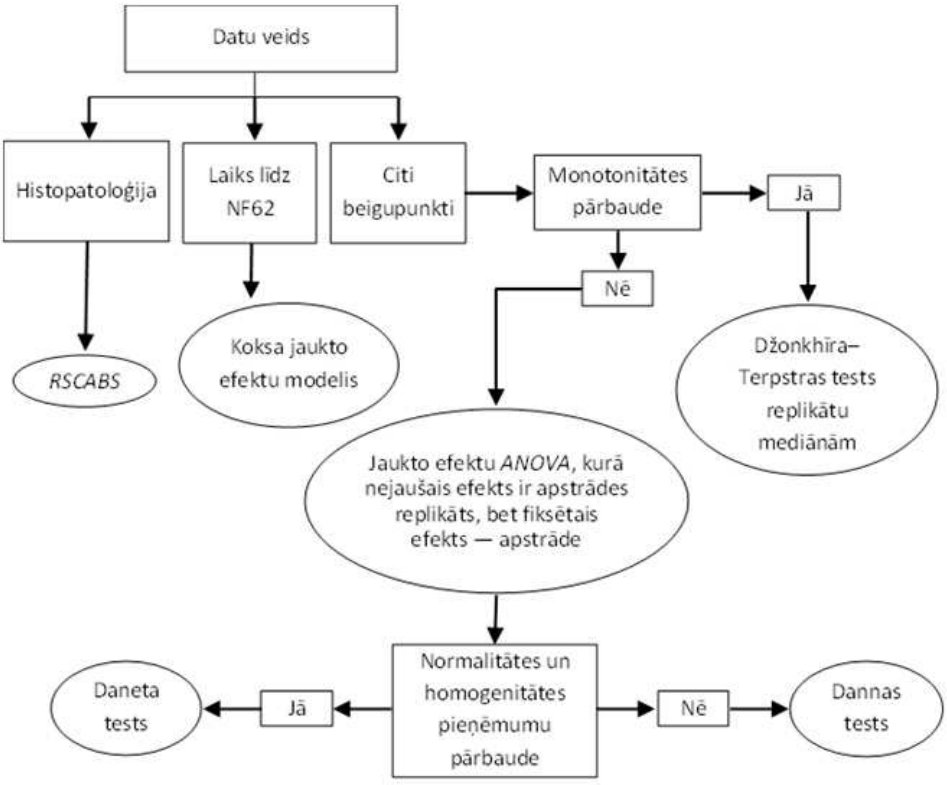
Dati par laiku līdz metamorfozei apstrādājami kā dati par laiku līdz notikumam, un nāves gadījumi vai tas, ka īpatnis nesasniedz 62. NF stadiju 70 dienās, jāuztver kā labēji cenzēti dati (t. i., patiesā vērtība pārsniedz 70 dienas, bet pētījums beidzas, pirms dzīvnieki 70 dienās sasnieguši 62. NF stadiju). Testa beigu dienu nosaka pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai (metamorfozes beigas) atšķaidīšanas ūdens kontrolēs. Medianālo laiku līdz metamorfozes beigām var noteikt ar Kaplana–Meiera reizinājuma robežas novērtētājiem. Šis beigupunkts jāanalizē, izmantojot jaukto efektu Koksa proporcionālo apdraudējumu modeli, kurā ņem vērā pētījuma replikātu struktūru.

Histopatoloģiskie dati (smaguma atzīmes un ontoģenētiskās stadijas)

Histopatoloģiskie dati tiek iegūti smaguma atzīmju vai ontoģenētisko stadiju formā. Testā *RSCABS* (*Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices*) katram histopatoloģiskās atbildreakcijas smaguma līmenim tiek izmantots descendents Kohrana–Ārmitidža trenda tests ar Rao–Skota korekciju (*Green et al.*, 2014). Rao–Skota korekcija testā ļauj ņemt vērā eksperimenta plānu ar replikāttraukiem. Procedūra *by Slices* ietver bioloģisko ekspektāciju, ka ietekmes smagums pieaugs, palielinoties devai vai koncentrācijai, vienlaikus saglabājot īpatņu atzīmes un atspoguļojot konstatētās ietekmes smagumu. Procedūra *RSCABS* ne vien nosaka, kuras apstrādes statistiski atšķiras no kontrolēm (t. i., kurām novērojamas smagākas patoloģijas nekā kontrolēm), bet arī nosaka, pie kādas smaguma atzīmes atšķirība konstatējama, tā analīzei dodot vajadzīgo kontekstu. Kas attiecas uz gonādu un reproduktīvo kanālu ontoģenētiskās stadijas noteikšanu, ar datiem jāveic papildu manipulācijas, jo viens no *RSCABS* pieņēmumiem ir: ietekmes smagums pieaug līdz ar devas palielināšanos. Novērotā ietekme var būt attīstības aizkavēšanās vai paātrināšanās. Tāpēc dati par ontoģenētiskajām stadijām būtu jāanalizē tādi, kādi norādīti, lai noteiktu attīstības paātrinājumu, bet tad manuāli jāinvertē pirms otrās analīzes, ar kuru nosaka attīstības palēninājumu.

1. attēls.

Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi testa *LAGDA* datiem.



LITERATŪRA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108-1116.

8. papildinājums

APSVĒRUMI, KAS SAISTĪTI AR SKOLIOZES GADĪJUMU APSEKOŠANU UN MINIMALIZĒŠANU

Testa populācijās morfoloģiskos un uzvedības novērojumus var apgrūtināt idiopātiska skolioze, kas *Xenopus laevis* kurkuļos parasti izpaužas kā saliekta aste. Jācenšas skoliozes incidenci minimalizēt vai pavisam novērst — gan krājumā, gan testa apstākļos. Galīgajā testā ieteicams panākt, ka vidējas un smagas skoliozes prevalence nesasniedz 10 %, lai palielinātu ticamību, ka ar testu var detektēt ar apstrādi saistītu ontoģenētisko ietekmi uz citādi veseliem abinieku kāpuriem.

Dienišķajos novērojumos galīgā testa laikā jāreģistrē gan skoliozes incidence (īpatņu skaits), gan smagums, ja tā novērojama. Jāraksturo anormālijas vieta (piem., pirms kloākas vai aiz tās) un izliekuma virziens (piem., laterāls vai dorsoventrāls — virzienā no muguras uz vēderu). Skoliozes smagumu var vērtēt ar šādām atzīmēm:

N (neizteikta) — izliekuma nav;

(1) *minimāla:* viegls laterāls izliekums aiz kloākas, novērojams tikai miera stāvoklī;

(2) *vidēja:* laterāls izliekums aiz kloākas, novērojams pastāvīgi, bet kustības netraucē;

(3) *smaga:* laterāls izliekums pirms kloākas VAI jebkāds izliekums, kas traucē kustēties, VAI jebkāds dorsoventrāls izliekums.

ASV VAA *FIFRA* zinātniskā konsultatīvā paneļgrupa (*FIFRA SAP 2013*) izskatīja datu kopsavilkumu par skoliozi piecpadsmit abinieku metamorfozes testos ar *X. laevis* (no 51. NF stadijas līdz posmam pēc 60. stadijas) un sniedza vispārīgus ieteikumus, kā testa populācijās šīs anormālijas prevalenci mazināt. Lai gan *LAGDA* ontoģenētiskais laika griezums ir plašāks, tie ir relevanti arī šim testam.

Vēsturiskie nārsta rādītāji

Par vaislas pāriem principā jāizmanto kvalitatīvi, veseli pieauguši īpatņi; atsakoties no vaislas pāriem, kuru pēcnācējiem ir skolioze, tās gadījumu skaitu laika gaitā var mazināt. Konkrētāk, var būt lietderīgi minimalizēt savvaļā sagūstītu nārsta baru izmantošanu. Testā *LAGDA* ekspozīcijas periodu sāk ar 8.–10. NF stadiju sasniegušiem embrijiem, un nav iespējams testa sākumā noteikt, vai konkrētiem īpatņiem parādīsies skolioze. Tāpēc līdzās skoliozes incidences apsekošanai testa dzīvniekos būtu jādokumentē vēsturiskie ikru kamolu rādītāji (arī skoliozes prevalence kāpuros, kam ļauj attīstīties). Var būt lietderīgi turpināt monitorēt to katra kamola ikru daļu, ko konkrētā pētījumā neizmanto, un novērojumus iekļaut pārskatā (*FIFRA SAP 2013*).

Ūdens kvalitāte

Ir svarīgi gan laboratorijas krājumā, gan testā nodrošināt pietiekamu ūdens kvalitāti. Līdzās ūdens kvalitātes kritērijiem, ko tipiski izvērtē ūdenstoksiskuma testos, var būt lietderīgi monitorējot sekot līdzi, vai nav konstatējama barības vielu nepietiekamība (piem., C vitamīna, kalcija, fosfora nepietiekamība) vai selēna vai vara pārdaudzums, un to izlabot; ir ziņas ka šie apstākļi dažādos apmēros izraisa skoliozi laboratorijā audzētos *Rana* sp. un *Xenopus* sp. dzīvniekos (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; pēc *FIFRA SAP 2013* ziņām). Ūdens kvalitāti un testa īpatņu veselību parasti uzlabo piemērots dietārais režīms (sk. 4. papildinājumu) un regulāra tvertnes tīrīšana.

Diēta

Konkrēti ieteikumi attiecībā uz dietāro režīmu (par kuriem zināms, ka tie labi der testam *LAGDA*) sniegti 4. papildinājumā. Ieteicams barības avotus pārbaudīt uz bioloģiskiem toksīniem, herbicīdiem un citiem pesticīdiem, par kuriem zināms, ka tie *X. laevis* vai citos ūdensdzīvniekos izraisa skoliozi (Schlenk and Jenkins 2013). Piemēram, ar skoliozi zivīs (Schultz *et al.* 1985) un vardēs (Bacchetta *et al.* 2008) ir asociēta eksponētība dažiem holīnesterāzes inhibitoriem.

LITERATŪRA

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.”