II

(Ne teisėkūros procedūra priimami aktai)

REGLAMENTAI

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) 2019/1390

2019 m. liepos 31 d.

kuriuo, derinant prie technikos pažangos, iš dalies keičiamas Reglamento (EB) Nr. 440/2008, nustatančio bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), priedas

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantį Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantį Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB ([1]), ypač į jo 13 straipsnio 2 dalį,

kadangi:

(1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 440/2008 ([2]) pateikti pagal Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 taikytini bandymų metodai, skirti cheminių medžiagų fizikinėms ir cheminėms savybėms, taip pat toksiškumui ir ekotoksiškumui nustatyti;

(2) Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacija (EBPO) rengia suderintas ir tarptautiniu mastu sutartas cheminių medžiagų bandymų reglamentavimo tikslais gaires. EBPO reguliariai skelbia naujas ir peržiūrėtas bandymų gaires, kuriose atsižvelgiama į šios srities mokslo pažangą;

(3) siekiant atsižvelgti į technikos pažangą ir, kai tik įmanoma, sumažinti bandymams naudojamų gyvūnų skaičių, kaip numatyta Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 13 straipsnio 2 dalyje, priėmus atitinkamas EBPO bandymų gaires, reikėtų nustatyti du naujus ekotoksiškumo vertinimo ir devynis naujus toksiškumo žmonių sveikatai nustatymo bandymų metodus, o septynis bandymų metodus – atnaujinti. Vienuolika minėtų bandymų metodų yra susiję su odos ir akių dirginimo ir (arba) ėsdinimo, odos jautrinimo, genotoksiškumo ir endokrininio poveikio bandymais *in vitro*. Dėl siūlomo pakeitimo konsultuotasi su suinteresuotaisiais subjektais;

([1]) OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

([2]) 2008 m. gegužės 30 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH) (OL L 142, 2008 5 31, p. 1).

(4) todėl Reglamentas (EB) Nr. 440/2008 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;

(5) šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka pagal Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 133 straipsnį įsteigto komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja dvidešimtą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2019 m. liepos 31 d.

Komisijos vardu
Pirmininkas
Jean-Claude JUNCKER

PRIEDAS

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas taip:

(1) B dalies B.4. skyrius pakeičiamas taip:

„B.4 **ŪMUS ODOS DIRGINIMAS IR (ARBA) ĖSDINIMAS**

IEVADS

1. Ši testėšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testėšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 404 (2015) aprakstītajam. ESAO ķīmisko vielu testėšanas 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 testėšana 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 testėšanai un novērtėšanai attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju) (1), kurā testėšanai 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 testėšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testėšana (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 testėšanas metodes apraksta papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Tiklab zinātnes kā dzīvnieku labturības interesēs ir neveikt testėšanu *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 testėšanu un novērtėšanu), 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 testėšanu. 2. daļa nosaka, kā izdarāma *WoE* analīze. Ja *WoE* analīze joprojām nesniedz skaidrus rezultātus, jāveic 3. daļā aprakstītā papildu testėšana, sākot ar *in vitro* metodēm, bet *in vivo* testėšana jāizmanto kā pēdējā iespēja. Tātad šāda analīze mazina nepieciešamību veikt *in vivo* testėšanu 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 izvērtėšanai 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 papilddzīvniekus 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) B dalies B.17 skyrius pakeičiamas taip:

„B.17 **ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJOS BANDYMAS *IN VITRO* NAUDOJANT HPRT IR XPRT GENUS**

IEVADS

1. Ši testėšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testėšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 476 (2016) aprakstītajam. Testėšanas 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 testėšanas metožu sērijas. ESAO izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testėšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testėšanas 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 testėšanas 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 testėšanas 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 testėšanas 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);

— barotnė 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 priedėlis

CITOTOKSIŠKUMO IR MUTACIJŲ DAŽNIO VERTINIMO FORMULĖS

Citotoksiškumas įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą (CE), koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamų kontrolinių ėminių koreguotu klonavimo efektyvumu (priskirtas 100 % išgyvenamumas) (santykinio išgyvenamumo formulė pateikta toliau).

Bandomąja chemine medžiaga apdorotos kultūros koreguotas CE skaičiuojamas taip:

$$\text{Koreguotas CE} = \frac{\text{ląstelių skaičius po apdorojimo}}{\text{ląstelių skaičius prieš apdorojimą}}$$

Bandomąja chemine medžiaga apdorotos kultūros santykinis išgyvenamumas skaičiuojamas taip:

$$\text{Santykinis išgyvenamumas} = \frac{\text{koreguotas CE apdorotoje kultūroje}}{\text{koreguotas CE tirpiklio kultūroje}} \times 100$$

Mutacijų dažnis yra mutantinių kolonijų atrankiojoje terpėje klonavimo efektyvumas, padalytas iš klonavimo efektyvumo neatrankiojoje terpėje, išmatuoto tai pačiai kultūrai atrankos metu.

$$\text{Mutacijų dažnis} = \frac{\text{mutavusių kolonijų klonavimo efektyvumas atrankiojoje terpėje}}{\text{klonavimo efektyvumas neatrankiojoje terpėje}}$$

Jei klonavimo efektyvumui nustatyti naudojamos lėkštelės:

CE = kolonijų skaičius/pasėtų ląstelių skaičius.

Jei klonavimo efektyvumui nustatyti naudojamos mikrošulinėlių plokštelės:

Kolonijų skaičius vienam mikrošulinėlių plokštelės šulinėliui atitinka Puasono pasiskirstymą.

Klonavimo efektyvumas = -lnP(0)/viename šulinėlyje pasėtų ląstelių skaičius.

Čia: –lnP(0) yra tikėtino tuščių šulinėlių skaičiaus ir visų pasėtų šulinėlių skaičiaus santykio natūrinis logaritmas, kuris išreiškimas tokia formule:

lnP(0) = –ln (tuščių šulinėlių skaičius/pasėtų šulinėlių skaičius).“

3) B dalies B.22 skyrius pakeičiamas taip:

„B.22 **GRAUŽIKŲ DOMINANTINIO LETALUMO BANDYMAS**

IEVADS

1. Ši testėšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testėšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 478 (2016) aprakstītajam. Testėšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī modificētā testėšanas 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 testėšanas 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 testėšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testėšanas 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, turėšanas 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.

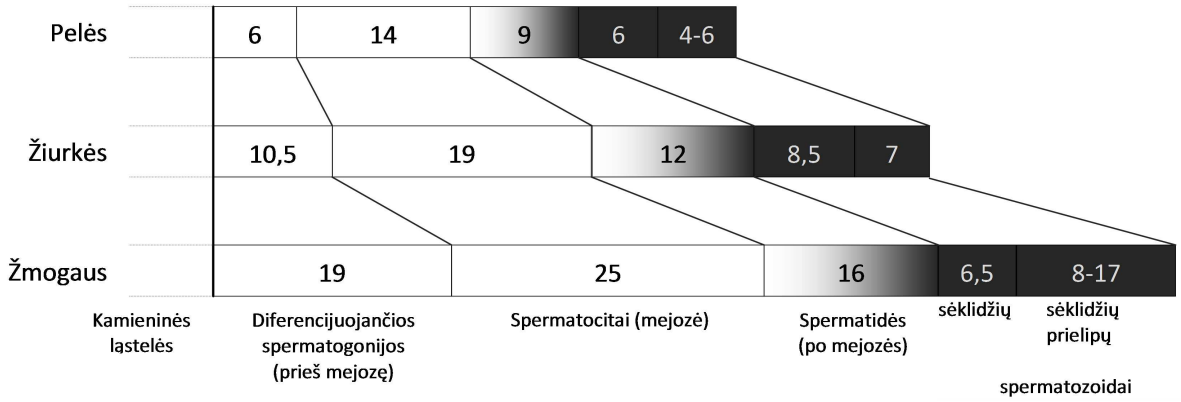
Pēcimplantācijas zudums: nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecība apstrādātajā grupā salīdzinājumā ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā.

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) B dalies B.23 skyrius pakeičiamas taip:

„B.23 **ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS TYRIMAS**

IEVADS

1. Ši testėšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testėšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 483 (2016) aprakstītajam. Testėšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šis modificētais testėšanas 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 testėšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testėšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testėšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO genotoksicitātes testėšanas 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 novērtėšanai 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 testėšanas 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.

TESTĖŠANAS 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. Testėjamās 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 $\leq 1{,}5\ \%$ 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.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneuploidija– vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Centromera– chromosomos regionas, su kuriuo ląstelės dalijimosi metu asocijuojasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Chromosomų įvairovė– chromosomų formų (pvz., metacentrinės, akrocentrinės ir kt.) ir dydžių įvairovė.

Chromatidinė aberacija– struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip vienos iš chromatidžių trūkis arba kaip chromatidžių trūkis ir susijungimas.

Chromosominė aberacija– struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip abiejų chromatidžių trūkis arba kaip trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

Klastogenas– cheminė medžiaga ar procesas, sukeliantys struktūrines chromosomų aberacijas ląstelių populiacijose ar organizmuose.

Plyšys– mažesnė nei vienos chromatidės plotis achromatinė spraga, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Genotoksinis– bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant trūkius, iškritas, aduktus, nukleotidų modifikacijas ir ryšius, pergrupavimus, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Mitozinis indeksas (MI)– metafazės ląstelių skaičiaus ir ląstelių populiacijos stebimų ląstelių suminio skaičiaus dalmuo, kuris rodo tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Mitozė– ląstelės branduolio dalijimasis, paprastai į profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę.

Mutageninis– sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Skaitinis nukrypimas– chromosomų skaičiaus pokytis palyginti su naudojamiems gyvūnams būdingu normaliu chromosomų skaičiumi.

Poliploidiškumas– haploidinio chromosomų skaičiaus (*n*), išskyrus diploidinį skaičių (t. y. 3*n*, 4*n* ir t. t.) kartotinis.

Struktūrinė aberacija– chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti metafazės stadijos ląstelių dalijimąsi tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip iškritos ir fragmentai, mainai.

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos.““

5) B dalies B.40 skyrius pakeičiamas taip:

„B.40 **ODOS ĖSDINIMAS *IN VITRO*. ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĖS VARŽOS (OSEV) BANDYMO METODAS**

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 430 (2015). Odos ėsdinimu vadinamas negrįžtamasis odos pažeidimas, kuris pasireiškia kaip matoma nekrozė per epidermį į dermį, po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo (kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1])). Šiam atnaujintam B.40 bandymo metodui pateikta *in vitro* procedūra, kurią taikant galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias medžiagas ir mišinius pagal JT GHS (1) ir CLP.

2. Odos ėsdinimo vertinimas paprastai yra susijęs su laboratorinių gyvūnų naudojimu (B.4 bandymo metodas, atitinkantis EBPO TG 404, pirmą kartą priimtas 1981 m., peržiūrėtas 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) (2). Be čia pateikiamo B.40 bandymo metodo, kiti cheminių medžiagų odos ėsdinimo potencialo tyrimo *in vitro* metodai yra patvirtinti ir priimti kaip B.40bis bandymo metodas (atitinka EBPO TG 431) (3) ir B.65 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 435) (4), kuriuos taikant taip pat galima nustatyti ėsdinančių cheminių medžiagų pakategores. Keli patvirtinti *in vitro* bandymo metodai, priimti kaip B.46 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 439 (5), kurie būtų taikomi odos dirginimui bandyti. EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami įvairūs informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (6).

3. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos ėsdinimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Jis pagrįstas odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymo metodu, naudojant odos diskus ėsdinančioms medžiagoms identifikuoti pagal jų gebėjimą sumažinti normalųjį *stratum corneum* vientisumą ir apsauginę funkciją. Atitinkamos EBPO bandymo gairės buvo pirmą kartą priimtos 2004 m. ir atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą.

4. Siekiant įvertinti *in vitro* odos ėsdinimo bandymus reglamentavimo tikslais, buvo atlikti žiurkių odos OSEV bandymo metodo parengiamieji patvirtinimo tyrimai (7) ir vėliau formaliojo patvirtinimo tyrimas odos ėsdinimui vertinti (8) (9) (10) (11). Kaip šių tyrimų rezultatas pateikta rekomendacija, kad OSEV bandymo metodas (vadinamas patvirtintu pamatiniu metodu (PPM), angl. *Validated Reference Method*) galėtų būti taikomas reglamentavimo tikslais *in vivo* odos ėsdinimui vertinti (12) (13) (14).

5. Prieš taip kaip reglamentavimo tikslais būtų galima taikyti kitą nei PPM, bet į jį panašų arba modifikuotą *in vitro* OSEV bandymo metodą, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, kad būtų užtikrintas jo panašumas į PPM pagal naudojimo charakteristikų standartų reikalavimus (15). EBPO abipusis duomenų pripažinimas (angl. *Mutual Acceptance of Data*) būtų užtikrintas tik po to, kai pagal naudojimo charakteristikų standartus pasiūlytas naujas arba atnaujintas bandymo metodas būtų peržiūrėtas ir įtrauktas į atitinkamas EBPO bandymo gaires.

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

7. Tinkamumo patvirtinimo tyrimo (10) ir kitų paskelbtų tyrimų (16) (17) ataskaitose teigiama, kad, taikant žiurkių odos OSEV bandymo metodą, galima patikimai atskirti duomenų bazės, kurią sudaro 122 cheminės medžiagos, žinomas odą ėsdinančias ir neėsdinančias chemines medžiagas, kai bendrasis jautris yra 94 % (51/54), specifiškumas – 71 % (48/68).

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

8. Šis bandymo metodas skirtas odos ėsdinimui *in vitro* tirti. Jį taikant galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas pagal JT GHS ir CLP. Kaip rodo patvirtinimo tyrimai (8) (9) (10) (11), šio bandymo metodo ribotumas yra tai, kad ėsdinančių medžiagų ir mišinių neįmanoma suskirstyti į JT GHS ir CLP pakategores. Kaip bus naudojamas bandymo metodas, priklausys nuo taikomos reglamentavimo sistemos. Nors taikant šį bandymo metodą negaunama tinkamos informacijos apie odos dirginimą, reikėtų pažymėti, kad B.46 bandymo metodas konkrečiai skirtas odos dirginimui *in vitro* tirti (5). Norint išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, reikėtų ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente dėl IATA (6).

9. Atliekant šio bandymų metodo patvirtinimą, buvo išbandytos labai įvairios cheminės medžiagos (daugiausia pavienės), ir patvirtinimo tyrimo empirinę duomenų bazę sudarė 60 cheminių medžiagų, priskiriamų pačioms įvairiausioms cheminių medžiagų klasėms (8) (9). Atsižvelgiant į visus turimus duomenis, bandymo metodas tinka didelei cheminių medžiagų klasių grupei ir agregatinėms būsenoms, įskaitant skysčius, pusiau kietas medžiagas, kietąsias medžiagas ir vaškus, tirti. Tačiau, kadangi nėra lengva rasti specifinių agregatinių būsenų bandinių, aprašytų tinkamais etaloniniais duomenimis, reikėtų pažymėti, kad atliekant patvirtinimą buvo vertinamas palyginti mažas vaškų ir ėsdinančių kietųjų medžiagų skaičius. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Tais atvejais, kai galima pateikti įrodymų dėl bandymų metodo netinkamumo specifinių kategorijų medžiagoms, bandymų metodo nereikėtų taikyti tos specifinės kategorijos medžiagai tirti. Be to, daroma prielaida, kad šis bandymo metodas tinka ne tik medžiagoms, bet ir mišiniams. Tačiau atsižvelgiant į tą faktą, kad mišiniai gali būti įvairių kategorijų ir sudėčių ir šiuo metu informacijos apie mišinių bandymus yra labai nedaug, tais atvejais, kai galima įrodyti, kad bandymo metodas specifinei mišinių kategorijai netinka (pvz., taikant Eskes *et al.*, 2012, pasiūlytą strategiją) (18), tai specifinei mišinių kategorijai bandymo metodas neturėtų būti taikomas. Prieš bandymo metodą taikant mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima gauti tam tikslui tinkamus rezultatus ir, jei taip, kodėl. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Atliekant patvirtinimo tyrimus, dujos ir aerozoliai kol kas nebuvo vertinami (8) (9). Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant OSEV procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.

BANDYMO PRINCIPAS

10. Bandomoji cheminė medžiaga ne ilgiau kaip 24 h uždedama ant odos diskų epidermio paviršiaus, naudojant dviejų kamerų bandymo sistemą, kurioje odos diskai yra šių kamerų skiriamoji riba. Imami humaniškai numarintų 28–30 parų amžiaus žiurkių odos diskai. Ėsdinančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų sugebėjimą sumažinti normalųjį *stratum corneum* vientisumą ir apsauginę funkciją, matuojamą kaip OSEV sumažėjimas iki mažesnės nei slenkstinė vertės (16) (žr. 32 pastraipą). Kaip žiurkių OSEV buvo pasirinkta ribinė 5 kΩ vertė, pagrįsta plataus cheminių medžiagų spektro dideliu kiekiu duomenų, pagal kuriuos didžioji dauguma verčių buvo aiškiai didesnės (dažnai > 10 kΩ) arba gerokai mažesnės (dažnai < 3 kΩ) už šią vertę (16). Paprastai bandomosios cheminės medžiagos, kurios gyvūnams nėra ėsdinančios, bet yra dirginančios arba nedirginančios, nesumažina OSEV iki vertės, mažesnės už šią ribinę vertę. Be to, naudojant kitus odos preparatus arba kitą įrangą, ribinė vertė gali pasikeisti, todėl būtinas papildomas patvirtinimas.

11. Bandymo procedūros dalį sudaro dažiklio prijungimo pakopa, atliekant patvirtinamąjį OSEV teigiamų rezultatų bandymą, įskaitant vertes apie 5 kΩ. Dažiklio prijungimo pakopoje nustatoma, ar jonų pralaidumas padidėja dėl fizinio *stratum corneum* suardymo. Įrodyta, kad naudojant žiurkių odą OSEV metodu galima prognozuoti *in vivo* triušių odos ėsdinimą, įvertinamą pagal B.4 bandymo metodą (2).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

12. Prieš pradėdamos savo praktikoje taikyti šį bandymo metodą atitinkantį žiurkių odos OSEV bandymo metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją – teisingai suklasifikuoti dvylika kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje. Tais atvejais, kai sąraše nurodytos medžiagos nėra arba, jei pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (16)), su sąlyga, kad taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje.

1 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas [1]

Medžiaga	CASRN	Cheminės medžiagos klasė [2]	JT GHS ir CLP Kat. pagal *in vivo* rezultatus [3]	PPM Kat. pagal *in vitro* rezultatus	Agregatinė būsena	pH [4]
In vivo ėsdinančios						
N,N'-dimetildipropilentriaminas	10563-29-8	organinė bazė	1A	6 × Ė	L	8,3
1,2-diaminpropanas	78-90-0	organinė bazė	1A	6 × Ė	L	8,3
Sulfato rūgštis (10 %)	7664-93-9	neorganinė rūgštis	(1A/)1B/1C	5 × Ė 1 × NĖ	L	1,2
kalio hidroksidas (10 % vand.)	1310-58-3	neorganinė bazė	(1A/)1B/1C	6 × Ė	L	13,2
Oktano (kaprilo) rūgštis	124-07-2	organinė rūgštis	1B/1C	4 × Ė 2 × NĖ	L	3,6
2-*tret*−butilfenolis	88-18-6	fenolis	1B/1C	4 × Ė 2 × NĖ	L	3,9
In vivo neėsdinančios						
Izostearino rūgštis	2724-58-5	organinė rūgštis	NĖ	6 × NĖ	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazolas	584-13-4	organinė bazė	NĖ	6 × NĖ	S	5,5
Fenetilbromidas	103-63-9	elektrofilas	NĖ	6 × NĖ	L	3,6
4-(metiltio)-benzaldehidas	3446-89-7	elektrofilas	NĖ	6 × NĖ	L	6,8
1,9-dekadienas	1647-16-1	neutralusis organinis junginys	NĖ	6 × NĖ	L	3,9
Tetrachloretilenas	127-18-4	neutralusis organinis junginys	NĖ	6 × NĖ	L	4,5

Santrumpos: aq – vandeninis; CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; PPM – patvirtintas pamatinis metodas; Ė – ėsdinanti, NĖ – neėsdinanti.

(1) Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos, iš pradžių surūšiuotos į ėsdinančias ir neėsdinančias, toliau pagal ėsdinimo pakategorę ir galiausiai pagal cheminių medžiagų klasę, buvo pasirinktos iš medžiagų, kurios buvo naudojamos ECVAM atliekant žiurkių odos OSEV bandymo metodo patvirtinimo tyrimą (8) (9). Jei nenurodyta kitaip, medžiagos buvo bandomos tokio grynumo, koks buvo jas įsigijus (8). Į rinkinį įtrauktos, kiek tai buvo įmanoma, medžiagos, kurios: i) atitinka atsakų į ėsdinimą (pvz., neėsdinančios; nuo silpnai iki stipriai ėsdinančių) intervalą, kurį galima išmatuoti arba numatyti taikant PPM; ii) atitinka cheminių medžiagų klases, naudotas atliekant patvirtinimo tyrimą; iii) atspindi PPM naudojimo charakteristikas; iv) turi aiškiai apibrėžtą cheminę sandarą; v) duoda aiškius rezultatus taikant *in vivo* pamatinį bandymo metodą; vi) yra prekyboje ir vii) nėra susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

(2) Cheminių medžiagų klasė, priskirta Barratt *et al.* (8).

(3) Atitinkamos JT pakuotės grupės I, II ir III atitinka JT GHS ir CLP kategorijas 1A, 1B ir 1C.

(4) pH vertės buvo paimtos iš Fentem *et al.* (9) ir Barratt *et al.* (8).

PROCEDŪRA

13. Yra žiurkių odos OSEV ėsdinimo bandymo metodo standartinės veiklos procedūros (SVP) (angl. Standard Operating Procedures, SOP) (19). Į šį metodą įtraukti žiurkių odos OSEV bandymo metodai turėtų atitikti šias sąlygas:

Gyvūnai

14. Reikėtų naudoti žiurkes, nes jų odos jautrumas cheminėms medžiagoms šiuo bandymu buvo įrodytas anksčiau (12) ir tai yra vienintelis odos šaltinis, kuris yra oficialiai patvirtintas (8) (9). Amžius (kai imama oda) ir žiurkių veislė yra ypač svarbi užtikrinant, kad plaukų folikulai būtų ramybės būsenoje prieš suaugusių plaukų augimo pradžią.

15. Jaunų, maždaug 22 parų amžiaus patinų arba patelių (Wistar arba panašios veislės žiurkių) nugaros ir šonų plaukai atsargiai nukerpami žirklutėmis. Gyvūnai plaunami atsargiai trinant nukirptą plotą panardintą į antibiotikų tirpalą (pvz., streptomicino, penicilino, chloramfenikolio ir amfotericino, kurių koncentracijos pakaktų bakterijų augimui efektyviai slopinti). Trečią arba ketvirtą dieną po pirmojo plovimo gyvūnai dar kartą plaunami antibiotikais ir panaudojami per 3 dienas po antrojo plovimo, kai *stratum corneum* atsigavo po plaukų kirpimo.

Odos diskų ruošimas

16. Gyvūnai humaniškai numarinami, kai jie yra 28–30 parų amžiaus; šis amžius yra ribinis. Nudiriama kiekvieno gyvūno oda nuo gyvūno nugaros ir šonų ir pašalinami pertekliniai poodiniai riebalai, juos atsargiai nuskutant nuo odos. Išpjaunami odos diskai, kurių kiekvieno skersmuo maždaug 20 mm. Odą diskų gamybai galima panaudoti vėliau, jei įrodoma, kad teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenys atitinka duomenis, gautus su ką tik paruošta oda.

17. Kiekvienas odos diskas dedamas ant vieno PTFE (politetrafluoretileno) vamzdžio galo, žiūrint, kad su vamzdžiu liestųsi epidermio paviršius. Ant vamzdžio galo užspaudžiamas guminis žiedinis tarpiklis, kad oda negalėtų judėti, audinio perteklius nukerpamas. Guminis žiedinis tarpiklis ir PTFE vamzdžio galas kruopščiai sandarinami vazelinu. Spyruokliniu spaustuku vamzdis tvirtinamas rinktuvo kameroje su $MgSO_4$ tirpalu (154 mM) (1 paveikslas). Odos diskas turėtų būti visiškai panardintas į $MgSO_4$ tirpalą. Iš vienos žiurkės odos galima pagaminti 10–15 odos diskų. Vamzdžio ir žiedinio tarpiklio matmenys pateikti 2 paveiksle.

18. Prieš pradedant bandymą matuojama dviejų odos diskų elektrinė varža, kaip kiekvieno gyvūno odos kokybės kontrolės procedūros dalis. Abiejų diskų elektrinė varža turėtų būti didesnė kaip 10 kΩ, kad likusius diskus būtų galima naudoti bandymui. Jei varžos vertė yra mažesnė kaip 10 kΩ, kitus iš tos odos pagamintus diskus reikėtų išmesti.

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

19. Siekiant užtikrinti tinkamas bandymo modelio charakteristikas, kiekvienam atskiram bandymui reikėtų naudoti vienalaikius teigiamus ir neigiamus kontrolinius ėminius. Kiekvienam atskiram bandymui (eksperimentui) reikėtų naudoti vieno gyvūno odos diskus. Rekomenduojamos teigiamo ir neigiamo kontrolinių ėminių bandomosios cheminės medžiagos yra 10 M vandenilio chlorido rūgštis ir distiliuotas vanduo.

20. Skystosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (150 µl) tolygiai padengiamas epidermio sluoksnis vamzdžio viduje. Jei bandomos kietosios medžiagos, ant disko tolygiai uždedamas pakankamas kietos medžiagos kiekis, kad būtų padengtas visas epidermio paviršius. Ant kietosios medžiagos viršaus užpilama dejonizuoto vandens (150 µl) ir vamzdis nestipriai purtomas. Siekiant užtikrinti didžiausią įmanomą sąlytį su oda, kietąsias medžiagas gali tekti pašildyti iki 30 °C, kad bandomoji cheminė medžiaga išsilydytų arba suminkštėtų, arba sumalti į granules arba miltelius.

21. Kiekvienai bandomajai ir kontrolinei cheminei medžiagai naudojami trys odos diskai kiekvienam atskiram bandymui. Bandomosios cheminės medžiagos uždedamos 24 valandoms 20–23 °C temperatūroje. Bandomoji cheminė medžiaga pašalinama plaunant kambario temperatūros vandentiekio vandens srove tol, kol daugiau medžiagos nebeįmanoma pašalinti.

OSEV matavimai

22. Odos pilnutinė varža matuojama kaip OSEV, naudojant žemos įtampos, kintamosios srovės Vitstono tiltelį (18). Bendrosios tiltelio specifikacijos: 1–3 V darbinė įtampa, sinusinė arba stačiakampio formos kintamoji 50–1 000 Hz srovė ir bent 0,1–30 kΩ matavimo intervalas. Patvirtinimo tyrime naudojamas tiltelis matuoja induktyvumą, talpą ir varžą iki 2 000 H, 2 000 μF ir 2 MΩ, esant 100 Hz arba 1 kHz dažniui, ir naudojant nuoseklaus arba lygiagretaus jungimo vertes. Atliekant ėsdinimo savybių bandymo OSEV matavimus, registruojama varža, esant 100 Hz dažniui ir naudojant nuoseklaus jungimo vertes. Prieš matuojant elektrinę varžą odos paviršiaus įtemptis sumažinama įpilant epidermiui padengti pakankamą tūrį 70 % etanolio. Po kelių sekundžių etanolis iš vamzdžio išpilamas ir audinys drėkinamas įpilant 3 ml $MgSO_4$ tirpalo (154 mM). Tiltelio elektrodai dedami iš abiejų odos disko pusių jo varžai kΩ/diskui išmatuoti (1 paveikslas). Elektrodų matmenys ir elektrodų ilgiai žemiau dantytųjų spaustukų pateikti 2 paveiksle. Prie vidinio elektrodo prijungtas spaustukas matuojant varžą guli ant PTFE vamzdžio viršaus, siekiant užtikrinti, kad į $MgSO_4$ tirpalą būtų panardinta reikiama elektrodo dalis. Išorinis elektrodas įstatomas į rinktuvo kamerą taip, kad jis remtųsi į kameros dugną. Užtikrinamas nekintamas atstumas tarp spyruoklinio spaustuko ir PTFE vamzdžio dugno (2 paveikslas), kadangi šis atstumas turi įtakos gautai varžos vertei. Dėl tos pačios priežasties atstumas tarp vidinio elektrodo ir odos disko turėtų būti pastovus ir kiek įmanoma mažesnis (1–2 mm).

23. Jei išmatuota varžos vertė yra didesnė kaip 20 kΩ, tai gali būti dėl bandomosios cheminės medžiagos likučių, dengiančių odos disko epidermio paviršių. Galima mėginti dar kartą pašalinti šią dangą, pvz., užkimšti PTFE vamzdžio angą pirštinėtu nykščiu ir purtyti maždaug 10 s; $MgSO_4$ tirpalas išpilamas ir varža dar kartą matuojama, įpylus naujo $MgSO_4$ tirpalo.

24. Bandymo aparato savybės bei matmenys ir taikoma matavimo procedūra gali turėti įtakos gautoms OSEV vertėms. 5 kΩ ėsdinimo slenkstinė vertė buvo nustatyta pagal duomenis, gautus naudojant šiame metode aprašytą konkretų aparatą ir procedūrą. Gali būti taikomos kitos slenkstinės ir kontrolinės vertės, jei pakinta bandymo sąlygos arba naudojamas kitas aparatas. Taigi procedūrą ir varžos slenkstines vertes būtina kalibruoti, bandant kelias kvalifikacijai įrodyti skirtas chemines medžiagas, pasirinktas iš patvirtinimo tyrime naudotų cheminių medžiagų (8) (9), arba iš į tiriamas medžiagas panašių cheminių medžiagų klasių medžiagų. Kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų rinkinys nurodytas 1 lentelėje.

Dažiklio prijungimo metodai

25. Veikiant tam tikroms neėsdinančioms medžiagoms varža gali sumažėti iki mažesnės nei ribinė 5 kΩ vertė, todėl jonai galėtų skverbtis per *stratum corneum* ir dėl to sumažėtų elektrinė varža (9). Pavyzdžiui, neutraliosios organinės medžiagos ir paviršinio aktyvumo savybių turinčios medžiagos (įskaitant ploviklius, emulsiklius ir kitas paviršinio aktyvumo medžiagas) gali pašalinti odos riebalus, todėl užtvaras tampa pralaidesnis jonams. Taigi, jei nesant akimi matomų odos pažeidimų tokioms cheminėms medžiagoms gautos OSEV vertės yra mažesnės kaip 5 kΩ arba arti šios vertės, reikėtų įvertinti kontrolinių ir apdorotų audinių dažiklio prasiskverbimą, kad būtų galima nustatyti, ar gautos OSEV vertės buvo padidėjusio odos pralaidumo, ar odos ėsdinimo rezultatas (7) (9). Pastaruoju atveju, jei įtrūksta *stratum corneum*, ant odos paviršiaus uždėtas sulforodamino B dažiklis greitai prasiskverbia ir nudažo apačioje esantį audinį. Šis specialusis dažiklis yra atsparus daugeliui įvairių cheminių medžiagų, ir jam įtakos nedaro toliau aprašyta ekstrahavimo procedūra.

Sulforodamino B dažiklio uždėjimas ir pašalinimas

26. Po OSEV įvertinimo magnio sulfatas išpilamas iš vamzdžio ir oda kruopščiai apžiūrima, ieškant akivaizdžių jos pažeidimų. Jei nėra akivaizdžių didesnių pažeidimų (pvz., pradūrimo), sulforodamino B dažiklio (rūgščiojo raudonojo 52; C.I. 45100; CAS numeris 3520-42-1) 150 μl 10 % (m/V) tirpalo distiliuotame vandenyje užpilama ant kiekvieno disko epidermio paviršiaus 2 valandoms. Vėliau šie odos diskai maždaug 10 s plaunami kambario temperatūros vandentiekio vandeniu dažiklio pertekliui ar nesurištam dažikliui pašalinti. Kiekvienas odos diskas atsargiai nuimamas nuo PTFE vamzdžio ir įdedamas į buteliuką (pvz., į 20 ml scintiliacinį buteliuką)

su dejonizuotu vandeniu (8 ml). Buteliukai nestipriai purtomi 5 min, kad pasišalintų perteklinis nesurištas dažiklis. Plovimo procedūra kartojama, odos diskai išimami ir įdedami į buteliukus su 5 ml 30 % (m/V) natrio dodecilsulfato tirpalo distiliuotame vandenyje ir inkubuojami per naktį 60 °C temperatūroje.

27. Po inkubavimo kiekvienas diskas išimamas ir išmetamas, o likęs tirpalas centrifuguojamas (esant ~175 *g* pagreičiui) 8 min 21 °C temperatūroje. 1 ml tirpalo virš nuosėdų ėminys skiedžiamas santykiu 1:5 (V/V) (t. y. 1 ml + 4 ml) 30 % (m/V) natrio dodecilsulfato tirpalu distiliuotame vandenyje. Tirpalo optinis tankis matuojamas esant 565 nm bangos ilgiui.

Dažiklio kiekio skaičiavimas

28. Sulforodamino B dažiklio kiekis vienam diskui apskaičiuojamas pagal optinio tankio vertes (9) (sulforodamino B dažiklio molinis ekstinkcijos koeficientas = $8,7 \times l0^4$, esant 565 nm; molekulinė masė = 580). Dažiklio kiekis ant kiekvieno disko nustatomas, naudojant atitinkamą kalibravimo kreivę, ir apskaičiuojamas kartotinių ėminių vidutinis dažiklio kiekis.

Priimtinumo kriterijai

29. Vidutiniai OSEV rezultatai yra priimtini, jei vienalaikiams teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams gautos vertės patenka į bandymo laboratorijos metodui priimtinus intervalus. Priimtini varžos intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti šioje lentelėje:

Kontrolinis ėminys	Medžiaga	Varžos intervalas (kΩ)
Teigiamas	10 M vandenilio chlorido rūgštis	0,5–1,0
Neigiamas	Distiliuotas vanduo	10–25

30. Vidutiniai dažiklio prijungimo rezultatai yra priimtini, jei vienalaikių kontrolinių ėminių vertės patenka į metodui priimtinus intervalus. Rekomenduojami kontrolinėms medžiagoms priimtini dažiklio kiekio intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti šioje lentelėje:

Kontrolinis ėminys	Medžiaga	Dažiklio kiekio intervalas (μg/diskui)
Teigiamas	10 M vandenilio chlorido rūgštis	40–100
Neigiamas	Distiliuotas vanduo	15–35

Rezultatų aiškinimas

31. Ribinė OSEV vertė, skirianti ėsdinančias ir neėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, buvo nustatyta atliekant metodo optimizavimą, bandyta parengiamojo patvirtinimo etape ir patvirtinta atliekant formaliojo patvirtinimo tyrimą.

32. Toliau pateikiamas žiurkių odos OSEV ėsdinimo bandymo metodo prognozavimo modelis (9) (19), susijęs su JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema:

Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga neėsdina odos:

i) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra didesnė kaip (>) 5 kΩ, arba

ii) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra mažesnė kaip arba lygi (≤) 5 kΩ ir:

— nesimato akivaizdaus odos diskų pažeidimo (pvz., pradūrimo) ir

— vidutinis dažiklio ant disko kiekis yra mažesnis (<) nei vidutinis dažiklio ant disko kiekis, gautas 10 M HCl vienalaikiam kontroliniam ėminiui (teigiamų kontrolinių ėminių vertės nurodytos 30 pastraipoje).

Laikoma, kad bandomoji medžiaga ėsdina odą:

i) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra mažesnė arba lygi (≤) 5 kΩ ir yra akivaizdus odos diskų pažeidimas (pvz., pradūrimas), arba

ii) jei bandomosios cheminės medžiagos OSEV vidutinė vertė yra mažesnė kaip arba lygi (≤) 5 kΩ ir:

— nesimato akivaizdaus odos diskų pažeidimo (pvz., pradūrimo), bet

— vidutinis dažiklio ant disko kiekis yra didesnis arba lygus (≥) vidutiniam dažiklio ant disko kiekiui, gautam vienalaikiam teigiamam kontroliniam 10 M HCl ėminiui (teigiamų kontrolinių ėminių vertės pateiktos 30 pastraipoje).

33. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno atskiro ne mažiau kaip trijų kartotinių odos diskų bandinių bandymo. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė OSEV vertė lygi 5 ± 0,5 kΩ, reikėtų spręsti dėl antrojo nepriklausomo bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

34. Bandomajai cheminei medžiagai, be to, teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams gautas varžos vertes (kΩ) ir dažiklio kiekio vertes (μg/diskui), jei tinka, reikėtų pateikti lentelėse, įskaitant kiekvieno bandymo kiekvieno kartotinio disko bandinio duomenis, ir vidutinę vertę ± standartinį nuokrypį). Ataskaitoje turėtų būti pateikti visi kartotiniai bandymai. Ataskaitoje turėtų būti pateikti pastebėti odos diskų pažeidimai, susiję su kiekviena bandomąja chemine medžiaga.

Bandymo ataskaita

35. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

— Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

— daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes;

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— šaltinis, partijos numeris, jei yra;

— bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;

— laikymo sąlygos.

Bandymo gyvūnai:

— naudota rūšis ir lytis;

— gyvūnų amžius, kai naudojami odos donorais;

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.;

— išsami informacija apie odos ruošimą.

Bandymo sąlygos

— bandymo aparato kalibravimo kreivės;

— kalibravimo kreivės dažiklio prijungimo bandymui atlikti, optinio tankio verčių matavimo praleidimo dažnių juosta, matavimo prietaiso optinio tankio tiesiškumo intervalas (pvz., spektrofotometro), jei tinka;

— OSEV matavimams naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys;

— dažiklio prijungimo įvertinimui naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys; jei reikia;

— naudotos bandymo dozės, ekspozicijos laikotarpio (-ų) trukmė ir ekspozicijos temperatūra (-os);

— informacija apie plovimą pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui;

— vienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams) naudotų kartotinių odos diskų bandinių skaičius;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;

— nuoroda į modelio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:

i) teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių OSEV verčių (kΩ) priimtinumas, atsižvelgiant į teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsparumo intervalą,

ii) teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių dažiklio kiekio verčių (μg/diskui) priimtinumas, atsižvelgiant į teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių dažiklio kiekio intervalus,

iii) bandymo rezultatų priimtinumas, atsižvelgiant į istorinį odos disko kartotinių bandinių kintamumą;

— taikomų sprendimo priėmimo ir (arba) prognozavimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai:

— lentelėse pateikti kiekvieno bandymo rinkinio atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių OSEV bei dažiklio prijungimo bandymų (jei tinka) duomenys, kiekvieno kartotinio odos disko bandinio (atskirų gyvūnų ir atskirų odos ėminių) duomenys, vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir variacijos koeficientai (VK);

— visų pastebėtų reiškinių aprašymas;

— gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

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. Pateikta [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.

(3) Šio priedo B.40bis skyrius. *In Vitro* odos modelis.

(4) Šio priedo B.65 skyrius. *In Vitro* odos ėsdinimo naudojant membraninę pertvarą metodas.

(5) Šio priedo B.46 skyrius. *In Vitro* odos dirginimas. Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodas.

(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.

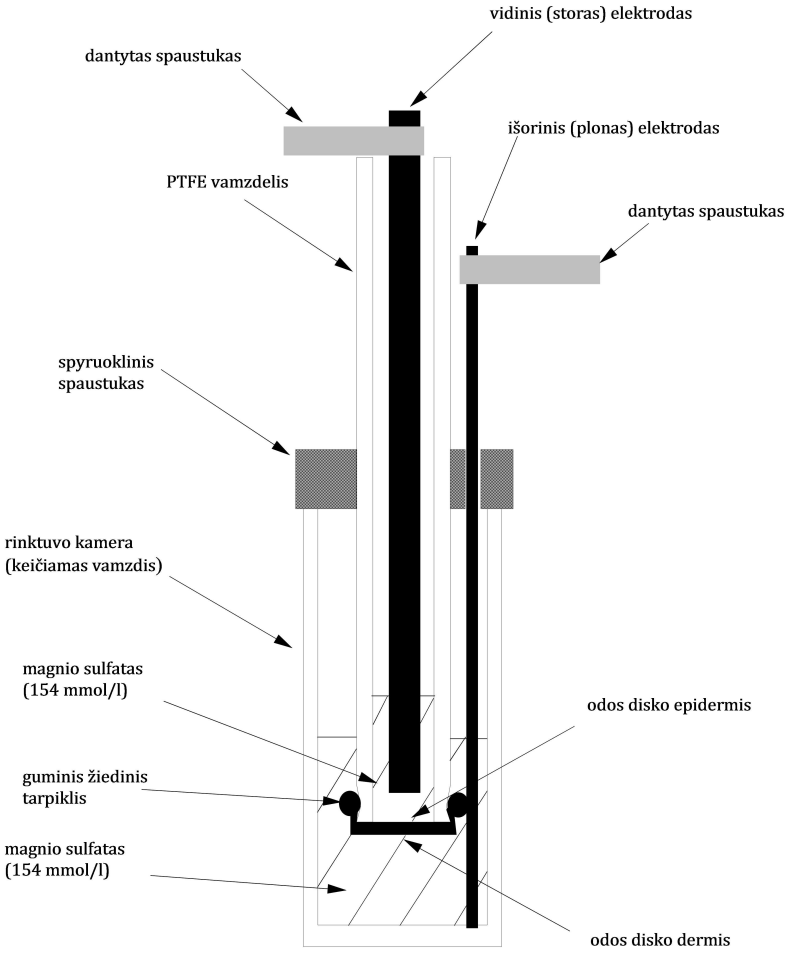
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher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

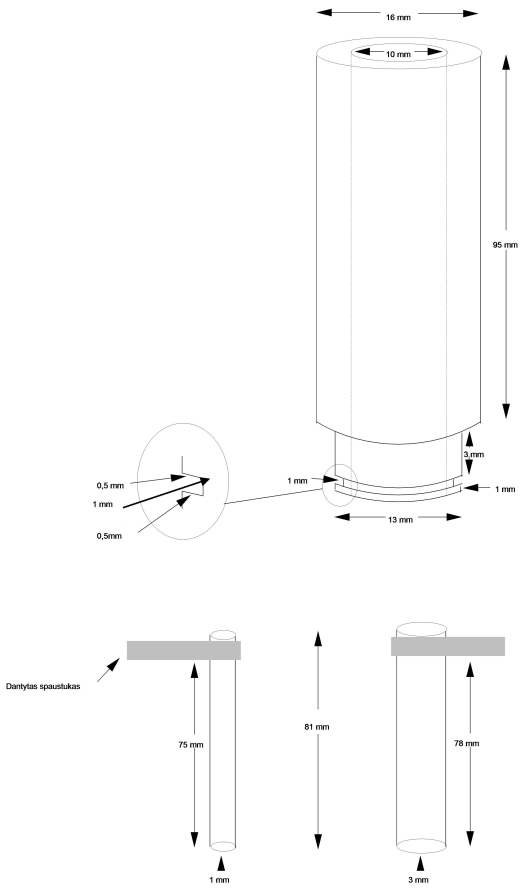
1 Paveikslas

Žiurkių Odos Osev Bandymo Aparatas



2 Paveikslas

Politetrafluoretileno (Ptfe) Ir Rinktuvo Vamzdžių Bei Naudojamų Elektrodų Matmenys



Viršuje pavaizduoto aparato svarbiausi parametrai:

— PTFE vamzdžio vidinis skersmuo,

— elektrodų ilgis PTFE bei rinktuvo vamzdžių atžvilgiu, kuris turėtų būti toks, kad elektrodai neliestų odos disko ir standartinio ilgio elektrodo atkarpa būtų panardinta į $MgSO_4$ tirpalą,

— $MgSO_4$ tirpalo tūris rinktuvo vamzdyje turėtų užtikrinti 1 paveiksle parodytą skysčio gylį atžvilgiu jo lygio PTFE vamzdyje, kaip pavaizduota 1 paveiksle,

— odos diskas turėtų būti gana gerai pritvirtintas prie PTFE vamzdžio, kad elektrinė varža būtų tikrasis odos savybių matas.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas– bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (20).

Ė– ėsdinanti.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Sutapimas– bandymo metodo, kuriuo gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (20).

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT))– sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

IATA– integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

Mišinys– dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga– medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga– medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NĖ– neėsdinanti.

OT– optinis tankis.

Teigiamas kontrolinis (PC) ėminys– kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS)– patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) panašūs tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą.

Tinkamumas– santykio tarp bandymo metodo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra bandymo metodo, taikomo tiriamam biologiniam poveikiui matuoti ar prognozuoti, tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (20).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (20).

Jautris– visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (20).

Odos ėsdinimas *in vivo*– negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma dermio nekrozė per epidermį, praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo. Atsakas į ėsdinimą yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, pasibaigus 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Specifiškumas– visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (20).

Medžiaga– natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

(Bandymo) rinkinys– viena bandomoji cheminė medžiaga vienu metu bandyta su ne mažiau kaip trimis kartotiniais odos diskų bandiniais.

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Odos sluoksnio elektrinė varža (OSEV)– odos pilnutinės elektrinės varžos matas, išreikštas varžos verte kiloomais. Paprastas ir patikimas apsauginės funkcijos vertinimo metodas, registruojant jonų judėjimą per odos sluoksnį Vitstono tiltelio prietaisu.

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.“

6) B dalies B.40bis skyrius pakeičiamas taip:

„B.40bis. ***IN VITRO* ODOS ĖSDINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO (RhE) BANDYMO METODAS**

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 431 (2016). Odos ėsdinimu vadinamas negrįžtamasis odos pažeidimas, kuris pasireiškia kaip matoma nekrozė per *epidermį* į *dermį*, po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo (kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP)) ([1])). Šiam atnaujintam B.40bis bandymo metodui pateikta *in vitro* procedūra, kurią taikant galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias medžiagas ir mišinius pagal JT GHS ir CLP. Jį taikant taip pat kažkiek galima skirstyti ėsdinančias medžiagas į pakategores.

2. Odos ėsdinimo potencialo vertinimas paprastai yra susijęs su laboratorinių gyvūnų naudojimu (B.4 bandymo metodas, atitinkantis EBPO TG 404, pirmą kartą priimtas 1981 m., peržiūrėtas 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) (2). Be šio B.40bis bandymo metodo, yra patvirtinti ir priimti du kiti cheminių medžiagų odos ėsdinimo potencialo bandymo *in vitro* metodai, kaip B.40 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 430) (3) ir B.65 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 435) (4). Be to, odos dirginimo potencialui bandyti yra priimtas B.46 *in vitro* bandymo metodas (atitinka EBPO TG 439) (5). EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (6).

3. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos ėsdinimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Atliekant bandymą naudojamas rekonstruotas žmogaus *epidermis* (angl. *Reconstructed human Epidermis*, santrumpa RhE) (gautas iš žmogaus odos netransformuotų epidermio keratinocitų), kuris labai tiksliai atkartoja histologines, morfologines, biochemines ir fiziologines viršutinių žmogaus odos dalių, t. y. *epidermio* savybes. Atitinkamos EBPO bandymo gairės buvo pirmą kartą priimtos 2004 m. ir atnaujintos 2013 m., įtraukiant papildomus, RhE modelį naudojančius bandymo metodus ir galimybę taikyti metodus, kurie pagrįstų ėsdinančių cheminių medžiagų skirstymą į pakategores, ir dar kartą atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą bei įtraukiant alternatyviąją gyvybingumo matavimo procedūrą.

4. Į šį bandymo metodą įtraukti keturi patvirtinti prekyboje esantys RhE modeliai. Buvo atlikti šių dviejų prekyboje esančių bandymo modelių, *EpiSkin™ Standard Model* (SM) ir *EpiDerm™ Skin Corrosivity Test* (SCT) (EPI-200) parengiamieji patvirtinimo tyrimai (7), ir vėliau atliktas formaliojo patvirtinimo tyrimas odos ėsdinimui vertinti (8) (9) (10) (11) (12) (nurodyti toliau tekste kaip patvirtinti pamatiniai metodai, PPM). Atsižvelgiant į šių tyrimų rezultatus pateikiama rekomendacija, kad du pirmiau nurodyti PPM gali būti naudojami reglamentavimo tikslais ėsdinančioms medžiagoms (Ė) atskirti nuo neėsdinančių (NĖ) medžiagų ir, be to, EpiSkin ™ galėtų būti naudojamas ėsdinančių medžiagų skirstymui į pakategores pagrįsti (13) (14) (15). Du kiti prekyboje esantys *in vitro* odos ėsdinimo RhE bandymo modeliai parodė panašius į EpiDerm™ PPM gautus rezultatus pagal naudojimo charakteristikų standartais pagrįstą patvirtinimą (16) (17) (18). Tai yra SkinEthic™ RHE ([2]) ir epiCS® (ankstesnis pavadinimas EST-1000), kurie taip pat gali būti naudojami reglamentavimo tikslais ėsdinančioms ir neėsdinančioms medžiagoms atskirti (19) (20). Tyrimai po patvirtinimo, kuriuos nuo 2012 m. iki 2014 m. atliko RhE modelio gamintojai, naudodami patikslintą protokolą, taikantį pataisą dėl trukdžių, susijusių su nespecifine MTT redukcija bandomosiomis cheminėmis medžiagomis, pagerino ėsdinančių atskyrimo nuo neėsdinančių ir ėsdinančių medžiagų skirstymo į pakategores pagrindimo charakteristikas (21) (22). Buvo atlikta po patvirtinimo su EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir EpiCS® gautų duomenų papildoma statistinė analizė, kad būtų galima identifikuoti alternatyvius prognozavimo modelius, kurie pagerino skirstymo į pakategores prognozavimo gebą (23).

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

([2]) Santrumpa RhE (rekonstruotas žmogaus epidermis, angl. *Reconstructed human Epidermis*) naudojama visiems modeliams, pagrįstiems RhE technologija. Santrumpa RHE, naudojama su SkinEthic™ modeliu, reiškia tą patį, bet kaip šio specifinio bandymo metodo prekinio pavadinimo dalis rašoma visomis didžiosiomis raidėmis.

5. Prieš tai, kaip reglamentavimo tikslais būtų galima taikyti kitą nei PPM, bet į jį panašų arba modifikuotą *in vitro* odos ėsdinimo RhE bandymo metodą, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, kad būtų užtikrintas jo panašumas į PPM pagal naudojimo charakteristikų standartų reikalavimus (24), nustatytus atsižvelgiant į EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 34 principus (25). Abipusis duomenų pripažinimas būtų užtikrintas tik po to, kai pagal PS pasiūlytas naujas arba atnaujintas bandymo metodas būtų peržiūrėtas ir įtrauktas į atitinkamas bandymo gaires. Į tas bandymo gaires įtraukti bandymo modeliai gali būti naudojami sprendžiant klausimus, susijusius su šalies reikalavimais *in vitro* odos ėsdinimo bandymo metodo bandymo rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

7. Taikant šį bandymo metodą galima identifikuoti neėsdinančias ir ėsdinančias medžiagas bei mišinius pagal JT GHS ir CLP. Šiuo bandymo metodu galima papildomai skirstyti ėsdinančias medžiagas ir mišinius į pagal JT GHS (1) neprivalomą pakategorę 1A, taip pat į pakategorių 1B ir 1C derinį (21) (22) (23). Šio bandymo metodo ribotumas – jį taikant negalima atskirti odos ėsdinimo pakategorių 1B ir 1C pagal JT GHS ir CLP dėl riboto gerai žinomų *in vivo* 1C pakategorės ėsdinančių cheminių medžiagų rinkinio. Taikant EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS® bandymo modelius, galima skirstyti į pakategores (t. y. 1A *versus* 1B ir 1C *versus* NĖ).

8. Atliekant į šį bandymo metodą įtrauktų bandymo modelių, kai jie naudojami neėsdinančioms ir ėsdinančioms medžiagoms identifikuoti, patvirtinimo tyrimą, bandyta didelė cheminių medžiagų grupė, kurią daugiausia sudarė atskiros cheminės medžiagos; empirinę duomenų bazę sudarė 60 cheminių medžiagų, aprėpiančių didelę cheminių medžiagų klasių grupę (8) (9) (10). Bandymo metodo kūrėjai atliko bandymus, kurie įrodo skirstymo į pakategores jautrį, specifiškumą, tikslumą ir vidinį laboratorijos atkuriamumą, ir rezultatus peržiūrėjo EBPO (21) (22) (23). Atsižvelgiant į visus turimus duomenis, bandymo metodas taikomas didelei cheminių medžiagų klasių grupei ir agregatinėms būsenoms, įskaitant skysčius, pusiau kietas medžiagas, kietąsias medžiagas ir vaškus. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas prieš bandymą reikėtų sumalti; jokio kito ėminio parengiamojo apdorojimo atlikti nereikia. Jei galima pateikti įrodymų dėl į šį bandymo metodą įtrauktų bandymo modelių netinkamumo specifinei cheminių medžiagų kategorijai, jų nereikėtų naudoti tai specifinei bandomųjų cheminių medžiagų kategorijai. Be to, daroma prielaida, kad šis bandymo metodas tinka ne tik medžiagoms, bet ir mišiniams. Tačiau atsižvelgiant į tą faktą, kad mišiniai aprėpia daug kategorijų ir sudėčių ir šiuo metu yra labai nedaug informacijos apie mišinių bandymus tais atvejais, kai galima įrodyti bandymo metodo netinkamumą specifinei mišinių kategorijai (pvz., taikant (26) pasiūlytą strategiją), bandymo metodas neturėtų būti taikomas tai specifinei mišinių kategorijai. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Atliekant patvirtinimo tyrimus, dujos ir aerozoliai kol kas nebuvo vertinami (8) (9) (10). Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant RhE procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.

9. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių šviesos absorbcijos sritis sutampa su MTT formazano, ir bandomosios cheminės medžiagos, kurios gali tiesiogiai redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT (į MTT formazaną), gali trukdyti matuoti audinių gyvybingumą, todėl pataisoms daryti turi būti naudojami pritaikyti kontroliniai ėminiai. Pritaikytų kontrolinių ėminių, kurių gali prireikti, tipas skirsis priklausomai nuo cheminės medžiagos sukeliamų trukdžių ir nuo MTT formazano matavimo procedūros (žr. 25–31 pastraipas).

10. Nors taikant šį bandymo metodą negaunama reikiamos informacijos apie odos dirginimą, reikėtų pažymėti, kad B.46 bandymo metodas konkrečiai tiria odos dirginimo *in vitro* poveikį sveikatai ir yra pagrįstas ta pačia RhE bandymo sistema, bet naudojamas kitas protokolas (5). Siekiant išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente dėl integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (6). Šį IATA metodą sudaro *in vitro* odos ėsdinimo bandymai (aprašyti šiame bandymo metode) ir odos dirginimo bandymai prieš sprendžiant klausimą dėl bandymų su gyvais gyvūnais. Pripažįstama, kad žmogaus odos bandymams taikomi nacionaliniai ir tarptautiniai etikos principai bei sąlygos.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trimačio RhE modelio, sudaryto iš netransformuotų žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo auginami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai diferencijuotas žmogaus *epidermio* modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelinių žvynelių pavidalo lipidų sluoksnių, reprezentuojančių pagrindines lipidų klases, analogiškas randamoms *in vivo*.

12. RhE bandymo metodas pagrįstas prielaida, kad ėsdinančios cheminės medžiagos gali įsiskverbti į *stratum corneum* difuzijos arba erozijos būdu ir yra citotoksiškos apatinių sluoksnių ląstelėms. Ląstelių gyvybingumas matuojamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido, tiazolilo mėlynojo, tetrazolinio bromido, CAS Nr. 298-93-1), fermentinį virsmą į mėlynos spalvos formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš audinių (27). Ėsdinančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų gebėjimą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnių nei nustatyti slenkstinių lygių (žr. 35 ir 36 pastraipas). Įrodyta, kad taikant RhE pagrįstą odos ėsdinimo bandymo metodą galima prognozuoti *in vivo* triušių odos ėsdinimą, įvertinamą pagal B.4 bandymo metodą (2).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

13. Prieš pradėdamos naudoti šį bandymo metodą atitinkančius keturis patvirtintus RhE modelius įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, teisingai klasifikuodamos dvylika kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Jei metodas taikomas klasifikavimui į pakategores, taip pat reikėtų įrodyti gebėjimą teisingai skirstyti į pakategores. Tais atvejais, kai sąraše nurodytos medžiagos nėra arba, jei būtų pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (24)), jei taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje.

1 lentelė

Kvalifikacijai irodyti skirtu cheminiu mediagu saraas ([1])

Mediaga	CASRN	Chemines mediagos klase ([2])	JT GHS ir CLP Kat., pagrista *in vivo* rezultatais ([3])	PPM Kat., pagrista *in vitro* rezultatais ([4])	MTT reduktorius ([5])	Agregatine busena
Pakategores 1A *in vivo* esdinancios mediagos						
Bromacto rugtis	79-08-3	Organinė rūgštis	1A	(3) 1A	—	K
Boro trifluorido dihidratas	13319-75-0	Neorganinė rūgštis	1A	(3) 1A	—	S
Fenolis	108-95-2	Fenolis	1A	(3) 1A	—	K
Dichloracetilchloridas	79-36-7	Elektrofilinė medžiaga	1A	(3) 1A	—	S
Pakategorių 1B ir 1C derinio *in vivo* esdinancios mediagos						
Glioksilo rūgšties monohidratas	563-96-2	Organinė rūgštis	1B ir 1C	(3) 1B ir 1C	—	K

Mediaga	CASRN	Chemines mediagos klase ([2])	JT GHS ir CLP Kat., pagrista *in vivo* rezultatais ([3])	PPM Kat., pagrista *in vitro* rezultatais ([4])	MTT reduktorius ([5])	Agregatine busena
Pakategores 1A *in vivo* esdinancios mediagos						
Pieno rugtis	598-82-3	Organinė rūgštis	1B ir 1C	(3) 1B ir 1C	—	S
Etanolaminas	141-43-5	Organine baze	1B	(3) 1B ir 1C	T	Klampi
Vandenilio chlorido rugtis (14,4 %)	7647-01-0	Neorganine rugtis	1B ir 1C	(3) 1B ir 1C	—	S
In vivo neesdinancios mediagos						
Fenetilbromidas	103-63-9	Elektrofilinė mediaga	NĖ	(3) NĖ	T	S
4-amino-1,2,4-triazolas	584-13-4	Organinė bazė	NĖ	(3) NĖ	—	K
4-(metiltio)-benzaldehidas	3446-89-7	Elektrofilinė mediaga	NĖ	(3) NĖ	T	S
Lauro rugtis	143-07-7	Organine rugtis	NĖ	(3) NĖ	—	K

Santrumpos: CASRN – Cheminiu mediagu santrumpu tarnybos registro numeris. PPM – patvirtintas pamatinis metodas; NE – neesdinanti, T – taip, K – kieta, S – skysta.

([1]) Kvalifikacijai irodyti skirtos mediagos, i pradiu skirstomos i esdinancias ir neesdinancias, toliau pagal esdinimo pakategore ir galiausiai pagal cheminiu mediagu klase, buvo pasirinktos i mediagu, kurios buvo naudojamos ECVAM atliekant EpiSkin™ ir EpiDerm™ (8) (9) (10) patvirtinimo tyrima ir tyrimus po patvirtinimo, pagristus EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ ir epiCS® kureju pateiktais duomenimis (23). Jei nenurodyta kitaip, mediagos buvo bandomos tokio grynumo, koks buvo jas isigijus (8) (10). I rinkini itrauktos, kiek tai buvo imanoma, mediagos, kurios: i) atitinka atsaku i esdinima (pvz., neesdinancios; nuo silpnai iki stipriai esdinanciu) intervala, kuri taikant PPM galima imatuoti arba numatyti; ii) atitinka cheminiu mediagu klases, naudojamas atliekant patvirtinimo tyrima; iii) turi tinkamai apibudinta chemine sandara; iv) duoda atkuriamus rezultatus taikant PPM; v) duoda nustatytus rezultatus taikant *in vivo* pamatini bandymo metoda; vi) yra prekyboje; ir vii) nera susijusios su labai didelemis alinimo ilaidomis.

([2]) Cheminiu mediagu klase, priskirta Barratt *et al.* (8).

([3]) Atitinkamos JT pakuotes grupes I, II ir III atitinka JT GHS ir CLP pakategores 1A, 1B ir 1C.

([4]) ioje lenteleje pateiktos PPM *in vitro* prognozuojamos vertes buvo gautos naudojant EpiSkin™ ir EpiDerm™ bandymo modelius (PPM) bandymo metodo kurejams atliekant bandymus po patvirtinimo.

([5]) Gyvybingumo vertems, gautoms atliekant ECVAM odos esdinimo patvirtinimo tyrimus, nebuvo daroma pataisa del tiesiogines MTT redukcijos (atliekant patvirtinimo tyrimus negyvu audiniu eminiai nebuvo bandomi). Taciau ioje lenteleje pateikti metodo kureju po patvirtinimo sukurti duomenys buvo gauti naudojant pritaikytus kontrolinius eminius (23).

14. Rekomenduojama, kad atlikdamas kvalifikacijos tikrinimo pratimus, naudotojas patikrintų gautų audinių apsaugines savybes, nurodytas RhE modelio gamintojo. Tai ypač svarbu, jei audiniai gabenami dideliais atstumais ir (arba) ilgą laiką. Kai bandymo metodas sėkmingai sukurtas ir jo taikymo kvalifikacija įrodyta, vėliau tokio tikrinimo reguliariai daryti nebūtina. Tačiau, jei bandymo metodas taikomas nuolat, apsaugines savybes rekomenduojama ir toliau vertinti reguliariais laiko tarpais.

PROCEDŪRA

15. Toliau pateikiamas odos ėsdinimo vertinimo pagal šį bandymo metodą RhE bandymo modelių komponentų ir procedūrų bendrasis aprašymas. RhE modelius, patvirtintus kaip moksliškai pagrįstus juos taikant šiam bandymo metodui, t. y. EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE ir epiCS® modeliai (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), galima nusipirkti. Yra šių keturių RhE modelių standartinės veiklos procedūros (34) (35) (36) (37) ir jų pagrindiniai bandymo metodo komponentai apibendrinti 2 priedėlyje. Rekomenduojama atsižvelgti į atitinkamas standartines veiklos procedūras, kai laboratorijoje įdiegiamas ir naudojamas vienas šių modelių. Bandymai naudojant keturis šio bandymo metodo RhE bandymo modelius turėtų atitikti šiuos dalykus:

RHE BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Bendrosios sąlygos

16. Epiteliui rekonstruoti turėtų būti naudojami netransformuoti žmogaus odos keratinocitai. Po funkciniu *stratum corneum* turėtų būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* turėtų būti daugiasluoksnis ir turėti pagrindinių lipidų profilį, kad būtų gautas patvarus veiksmingas barjeras, kuris būtų atsparus citotoksinių palyginamųjų cheminių medžiagų, pvz., natrio dodecilsulfato (SDS) arba Triton X-100, greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija turėtų būti įrodyta ir gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant palyginamoji cheminė medžiaga per tam tikrą ekspozicijos laiką sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC_{50}), arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamosios cheminės medžiagos ekspozicijos trukmę, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET_{50}) (žr. 18 pastraipą). RhE modelio sulaikymo savybės turėtų apsaugoti nuo medžiagos patekimo prie gyvojo audinio apeinant *stratum corneum*, nes taip būtų blogai modeliuojama odos ekspozicija. RhE modelis neturėtų būti užkrėstas bakterijomis, virusais, mikoplazmomis ar grybeliais.

Veikimo sąlygos

Gyvybingumas

17. Kiekybinio audinių gyvybingumo nustatymo bandymas yra MTT bandymas (27). Gyvybingos RhE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas, kurios ekstrahuojamos iš audinio izopropanoliu (arba panašiu tirpikliu). Paties ekstrakcijai naudojamo tirpiklio OT turėtų būti pakankamai mažas, t. y. OT < 0,1. Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (38). RhE modelio naudotojai turėtų užtikrinti, kad kiekviena naudoto RhE modelio partija atitiktų neigiamiems kontroliniams ėminiams nustatytus kriterijus. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) turėtų nustatyti RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Į šį bandymo metodą įtrauktų patvirtintų RhE bandymo modelių neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalai pateikti 2 lentelėje. Taikantys HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos metodą, turėtų naudoti 2 lentelėje pateiktų neigiamų kontrolinių ėminių OT intervalus kaip neigiamo kontrolinio ėminio priimtinumo kriterijų. Reikėtų dokumentuoti, kad neigiamu kontroliniu ėminiu apdorotų audinių kultūra yra stabili (gaunami panašūs optinio tankio matavimo rezultatai) visą ekspozicijos laikotarpį.

2 lentelė

Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalai partijos kokybei kontroliuoti

	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Apsauginė funkcija

18. *Stratum corneum* ir jo lipidų sudėtis turėtų būti pakankama, kad atitinkamos citotoksinės etaloninės medžiagos neprasiskverbtų pernelyg greitai (pvz., SDS arba Triton X-100) prasiskverbimo, įvertinamo pagal IC_{50} arba ET_{50} (3 lentelė). Kiekvienos naudojamo RhE modelio partijos barjero funkciją turėtų įrodyti RhE modelio kūrėjas arba pardavėjas, kai audiniai pristatomi galutiniam naudotojui (žr. 21 pastraipą).

Morfologija

19. Reikėtų atlikti RhE modelio histologinį tyrimą, kuris įrodytų į žmogaus *epidermį* panašią daugiasluoksnę struktūrą, turinčią *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* ir *stratum corneum* ir lipidų profilį, panašų į žmogaus epidermio lipidų profilį. Kiekvienos naudojamo RhE modelio partijos histologinį tyrimą, įrodantį reikiamą audinių morfologiją, turėtų atlikti RhE modelio kūrėjas arba pardavėjas, kai audiniai tiekiami galutiniam naudotojui (žr. 21 pastraipą).

Atkuriamumas

20. Bandymo metodo naudotojai turėtų įrodyti bandymo metodų atkuriamumą per ilgą laiką, naudodami teigiamus ir neigiamus kontrolinius ėminius. Be to, bandymo metodas turėtų būti taikomas tik tokiu atveju, jei RhE modelio kūrėjas arba pardavėjas pateikia duomenų, įrodančių atkuriamumą per ilgą laiką ėsdinančioms ir neėsdinančioms cheminėms medžiagoms, pvz., iš kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašo (1 lentelė). Jei bandymo metodas taikomas klasifikavimui į pakategores, taip pat reikėtų įrodyti skirstymo į pakategores atkuriamumą.

Kokybės kontrolė

21. RhE modelis turėtų būti naudojamas tik tokiu atveju, jei kūrėjas arba tiekėjas įrodo, kad kiekviena naudojamo RhE modelio partija atitinka nustatytus gaminių išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra *gyvybingumo* (17 pastraipa), *apsauginės funkcijos* (18 pastraipa) ir *morfologijos* (19 pastraipa) kriterijai. Šie duomenys pateikiami taikantiems metodą, kad jie galėtų įtraukti šią informaciją į bandymo ataskaitą. Tik kokybės kontrolę praėję audinių partijų rezultatai yra priimtini patikimam ėsdinančių medžiagų prognozavimui. IC_{50} arba ET_{50} verčių priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) nustato RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Keturių patvirtintų RhE bandymo modelių priimtinumo intervalai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė

Partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijai

	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiSkin™ (SM) (18 h trukmės apdorojimas SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCTs (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 10,0 h
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET_{50} = 2,0 h	ET_{50} = 7,0 h

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

22. Kiekvienu ekspozicijos laikotarpiu reikėtų naudoti ne mažiau kaip du kartotinius audinio bandinius kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms. Tiriant skystąsias ir kietąsias chemines medžiagas, reikėtų uždėti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, kurio pakaktų epidermio paviršiui tolygiai padengti, bet vengiant neribotos dozės, t. y. reikėtų naudoti ne mažiau kaip 70 µl/cm^2 arba 30 mg/cm^2. Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų uždėjimą epidermio paviršių reikia suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, priklausomai nuo modelio, kad būtų geresnis bandomosios cheminės medžiagos sąlytis su

epidermio paviršiumi (34) (35) (36) (37). Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Uždėjimo metodas turėtų būti tinkamas bandomajai cheminei medžiagai tirti (žr., pvz., 34–37 nuorodas). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti kruopščiai nuplauta nuo *epidermio* paviršiaus vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Priklausomai nuo to, kuris iš keturių patvirtintų RhE bandymo modelių naudojamas, bandomajai cheminei medžiagai naudojami du arba trys ekspozicijos laikotarpiai (visiems keturiems patvirtintiems RhE modeliams: 3 min ir 1 h; EpiSkin™ – papildomas 4 h ekspozicijos laikotarpis). Priklausomai nuo naudojamo RhE bandymo modelio ir nuo vertinamo ekspozicijos laikotarpio, inkubavimo temperatūra ekspozicijos metu gali būti nuo kambario temperatūros iki 37 °C.

23. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, reikėtų naudoti vienalaikius neigiamus ir teigiamus kontrolinius ėminius, siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (naudojant neigiamus kontrolinius ėminius), apsauginė funkcija ir gaunamas audinių jautris (naudojant teigiamus kontrolinius ėminius) atitinka nustatytą istorinį priimtinumo intervalą. Priklausomai nuo naudojamo RhE bandymo modelio, rekomenduojamos teigiamos kontrolinės (PC) medžiagos yra ledinė acto rūgštis arba 8 M KOH. Reikėtų pažymėti, kad 8 M KOH yra tiesioginis MTT reduktorius, kuriam gali prireikti pritaikytų kontrolinių medžiagų, kaip aprašyta 25 ir 26 pastraipose. Rekomenduojamos neigiamos kontrolinės medžiagos yra 0,9 % (m/V) NaCl arba vanduo.

Ląstelių gyvybingumo matavimai

24. Ląstelių gyvybingumui pagal šį bandymo metodą matuoti reikėtų naudoti MTT bandymą, kuris yra kiekybinis bandymas. Audinio bandinys 3 h laikomas reikiamos koncentracijos MTT tirpale (0,3 arba 1 mg/ml). Į nuosėdas iškritęs mėlynos spalvos formazano reakcijos produktas ekstrahuojamas iš audinio tirpikliu (pvz., izopropanoliu, parūgštintu izopropanoliu), ir formazano koncentracija matuojama nustatant optinį tankį, kai bangos ilgis – 570 nm, filtro juostos plotis – ne didesnis kaip ±30 nm, arba taikant HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 30 ir 31 pastraipas) (38).

25. Bandomosios cheminės medžiagos gali trukdyti atlikti MTT bandymą, tiesiogiai redukuodamos MTT į mėlynos spalvos formazaną, ir (arba) dėl spalvos trukdžių, jei bandomoji cheminė medžiaga natūraliai arba dėl apdorojimo procedūrų absorbuoja šviesą formazano optinio tankio nustatymo (570 ± 30) nm srityje, dažniausiai mėlynos ir violetinės spalvos cheminės medžiagos). Reikėtų naudoti papildomus kontrolinius ėminius, kad būtų galima aptikti galimus šių bandomųjų cheminių medžiagų trukdžius ir juos koreguoti, pvz., nespecifinės MTT redukcijos (NSMTT) kontrolinį ėminį ir nespecifinės spalvos (NSS) kontrolinį ėminį (žr. 26–30 pastraipas). Tai ypač svarbu, kai konkreti bandomoji cheminė medžiaga ne visiškai pašalinama iš audinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į *epidermį*, todėl yra audiniuose atliekant MTT gyvybingumo bandymą. Tiesioginės MTT redukcijos ir spalvotų medžiagų trukdžių koregavimo išsamus aprašymas pateiktas bandymo modelių SVP (34) (35) (36) (37).

26. Kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą reikėtų įdėti į tik ką paruoštą MTT terpę, kad būtų galima identifikuoti tiesioginius MTT reduktorius (34) (35) (36) (37). Jei MTT mišinys, kuriame yra bandomoji cheminė medžiaga, nusidažo mėlyna arba violetine spalva, daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT ir reikėtų atlikti papildomą veikimo tikrinimą su negyvu epidermiu, nepriklausomai nuo to, ar naudojama standartinė optinio tankio (OT) matavimo, ar HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūra. Šiam papildomam veikimo tikrinimui naudojami negyvi audiniai, kurie turi tik liekamąjį metabolinį aktyvumą, bet absorbuoja panašų bandomosios cheminės medžiagos kiekį kaip gyvieji audiniai. Kiekviena MTT redukuojanti cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų vienai ekspozicijos trukmei negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekamas visas odos ėsdinimo bandymas. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta MTT reduktoriaus veikiamiems gyviesiems audiniams, minus nespecifinės MTT redukcijos procentinė vertė, gauta to paties MTT reduktoriaus veikiamiems negyviems audiniams ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSMTT).

27. Siekiant nustatyti galimus trukdžius, kuriuos kelia spalvotos bandomosios cheminės medžiagos arba tapusios spalvotomis dėl sąlyčio su vandeniu arba izopropanoliu, ir nuspręsti, ar būtini papildomi kontroliniai ėminiai, reikėtų atlikti bandomosios cheminės medžiagos tirpalo vandenyje (aplinkoje ekspozicijos metu) ir (arba) izopropanolyje (ekstrahavimo tirpale) spektrinę analizę. Jei vandenyje ir (arba) izopropanolyje ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga absorbuoja šviesą 570 ± 30 nm srityje, reikėtų atlikti papildomus spalvotų kontrolinių ėminių bandymus arba naudoti HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą, ir tokiu atveju šių kontrolinių ėminių nereikia (žr. 30 ir 31 pastraipas). Kai atliekamas standartinis optinio tankio matavimas, kiekviena trukdžius kelianti spalvota bandomoji cheminė medžiaga vienu ekspozicijos laikotarpiu dedama ant ne mažiau

kaip dviejų gyvųjų audinių kartotinių bandinių, su kuriais atliekamas visas odos ėsdinimo bandymas, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoj MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje, kad būtų gautas nespecifinės spalvos (NSS_{gyv}) kontrolinis ėminys. Vienalaikis NSS_{gyv} kontrolinis bandymas turi būti atliekamas kiekvienai ekspozicijos trukmei ir (atskiro bandymo) spalvotai bandomajai cheminei medžiagai dėl gyviesiems audiniams būdingos biologinės įvairovės. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems MTT tirpale, minus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir bandomiems vienu metu su koreguojamu bandymu (% NSS_{gyv}).

28. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios identifikuojamos kaip tiesioginiai MTT reduktoriai (žr. 26 pastraipą) ir kelia spalvos trukdžius (žr. 27 pastraipą) be NSMTT ir NSS_{gyv} kontrolinių ėminių, aprašytų pirmiau pateiktose pastraipose, reikės trečiojo kontrolinių ėminių rinkinio, kai atliekamas standartinis optinio tankio matavimas. Paprastai atlikti MTT bandymą trukdo tamsios spalvos (pvz., mėlynos, violetinės, juodos) bandomosios cheminės medžiagos, nes jų pačių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 26 pastraipoje. Šios bandomosios cheminės medžiagos gali jungtis prie gyvųjų ir negyvų audinių, todėl naudojant NSMTT kontrolinį ėminį gali būti koreguojama ne tik galima tiesioginė MTT redukcija, bet ir spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos prisijungimo prie negyvų audinių. Todėl gali būti dvigubas spalvos trukdžių koregavimas, nes NSS_{gyv} kontrolinis ėminys jau koreguoja spalvos trukdžius dėl bandomosios cheminės medžiagos prisijungimo prie gyvųjų audinių. Siekiant išvengti galimo dvigubo spalvos trukdžių koregavimo, reikia atlikti trečiąjį negyvų audinių nespecifinės spalvos (NSS_{negyv}) kontrolinį bandymą. Naudojant šį papildomą kontrolinį ėminį, bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų vienai ekspozicijos trukmei negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoje MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje. Pakanka vieno NSS_{negyv} kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių, bet jis turėtų būti atliekamas vienu metu su NSMTT kontroliniu bandymu ir, jei įmanoma, su ta pačia audinio partija. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus % NSS_{gyv}, plius nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems negyviems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSS_{negyv}).

29. Svarbu pažymėti, kad dėl nespecifinės MTT redukcijos ir nespecifinės spalvos trukdžių audinio ekstraktui gauti rodmenys gali būti didesni nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas. Atsižvelgdama į tai, kiekviena laboratorija prieš pradėdama bandyti bandomąsias chemines medžiagas reglamentavimo tikslais, turėtų nustatyti savo spektrofotometro tiesiškumo intervalą, naudodama prekyboje esantį MTT formazaną (CAS Nr. 57360-69-7). Visų pirma, atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą spektrofotometru, galima įvertinti tiesioginius MTT reduktorius ir spalvos trukdžius sukeliančias bandomąsias chemines medžiagas, jei audinių ekstraktų OT, gauti bandomajai cheminei medžiagai be koregavimo dėl tiesioginės MTT redukcijos ir (arba) spalvos trukdžių, yra spektrofotometro tiesiškumo intervale arba jei nekoreguota gyvybingumo procentinė dalis yra gauta bandomajai cheminei medžiagai, kuri jau yra nustatyta kaip ėsdinanti (žr. 35 ir 36 pastraipas). Vis dėlto, į bandomosioms cheminėms medžiagoms gautus neigiamų kontrolinių ėminių % NSMTT ir (arba) % NSS_{gyv} > 50 % rezultatus reikėtų žiūrėti atsargiai.

30. Spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios nesuderinamos su standartiniu optinio tankio matavimu dėl per didelių trukdžių MTT bandymui, galima naudoti alternatyvią HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą MTT formazanui nustatyti (žr. 31 pastraipą) (37). Naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemą, MTT formazaną galima atskirti nuo bandomosios cheminės medžiagos prieš jo kiekybinį nustatymą (38). Dėl šios priežasties NSS_{gyv} arba NSS_{negyv} kontrolinių ėminių niekuomet nereikia, kai naudojama HPLC/UPLC ir spektrofotometrija, nepriklausomai nuo bandomos cheminės medžiagos. Vis dėlto NSMTT kontrolinius ėminius reikėtų naudoti, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT arba jos spalva trukdo vertinti jos gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT (kaip aprašyta 26 pastraipoje). Jei MTT formazanui matuoti naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamiems gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Jei bandomosios cheminės medžiagos gali tiesiogiai redukuoti MTT, tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės

medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus % NSMTT. Pagaliau reikėtų pažymėti, kad negalima vertinti tiesioginių MTT reduktorių, kurie taip pat gali kelti spalvos trukdžius ir kurie po apdorojimo lieka audiniuose ir taip stipriai redukuoja MTT, kad gauti bandomų audinių ekstraktų OT (atliekant standartinį OT matavimą) arba smailių plotai (naudojant UPLC arba HPLC ir spektrofotometriją) nepatenka į spektrofotometro tiesiškumo intervalą, nors tikimasi, kad tai būtų tik labai retas reiškinys.

31. HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją MTT formazano matavimams taip pat galima naudoti visų tipų bandomosioms cheminėms medžiagoms (spalvotoms, nespalvotoms, MTT reduktoriams ir ne reduktoriams) (38). Dėl HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemų įvairovės HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumą reikėtų įrodyti prieš pradedant sistemą naudoti audinių ekstraktų MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir ji turi atitikti standartinių tinkamumo parametrų rinkinio priimtinumo kriterijus, pagrįstus aprašytais JAV maisto ir vaistų administracijos rekomendacijose pramonei dėl biologinės analizės metodo patvirtinimo (38) (39). Šie pagrindiniai parametrai ir priimtinumo kriterijai patekti 4 priedėlyje. Jei HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistema atitinka 4 priedėlyje nustatytus priimtinumo kriterijus, ji laikoma tinkama ir paruošta MTT formazanui matuoti šiame bandymo metode aprašytomis bandymo sąlygomis.

Priimtinumo kriterijai

32. Taikant kiekvieną patvirtintus RhE modelius naudojantį bandymo metodą, neigiamu kontroliniu ėminiu apdorotiems ėminiams turėtų būti gautos audinių kokybę rodančios OT vertės, kaip aprašyta 2 lentelėje, ir jos neturėtų būti mažesnės nei istoriškai nustatytos ribos. PC medžiaga, t. y. ledine acto rūgštimi arba 8 M KOH, apdoroti audiniai turėtų rodyti audinių gebėjimą reaguoti į ėsdinančią cheminę medžiagą bandymo modelio sąlygomis (žr. 2 priedėlį). Kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai ir (arba) kontrolinėms cheminėms medžiagoms, turėtų atitikti priimtas ribas pagal kiekvieno patvirtinto RhE modelio reikalavimus (žr. 2 priedėlį) (pvz., dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %). Jei į atskirą bandymą įtrauktas neigiamas ar teigiamas kontrolinis ėminys nepatenka į priimtus intervalus, atskiras bandymas laikomas nepavykusiu ir turėtų būti pakartotas. Jei bandomosios cheminės medžiagos kintamumas neatitinka nustatyto intervalo, jos bandymas turėtų būti pakartotas.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

33. Kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai gautos OT vertės turėtų būti naudojamos gyvybingumo procentinei daliai apskaičiuoti neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, kurio gyvybingumas prilygintas 100 %. Jei naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamiems gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Į šį bandymo metodą įtraukto kiekvieno bandymo modelio ribinės ląstelių gyvybingumo procentinės vertės, pagal kurias ėsdinanti bandomoji cheminė medžiaga atskiriama nuo neėsdinančios (arba ėsdinančios medžiagos skirstomos į pakategores), nurodytos toliau 35 ir 36 pastraipose ir jas reikėtų naudoti aiškinant rezultatus.

34. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno ne mažiau kaip dviejų kartotinių audinio bandinių atskiro bandymo. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa, reikėtų spręsti dėl antrojo atskiro bandymo, taip pat trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.

35. EpiSkin™ odos ėsdinimo bandymo metodo prognozavimo modelis (9) (34) (22), susijęs su JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema, pateiktas 4 lentelėje.

4 lentelė

EpiSkin™ prognozavimo modelis

Gyvybingumas, išmatuotas ekspozicijos trukmės taškuose (t = 3, 60 ir 240 min)	Prognozė, į kurią turi būti atsižvelgta
< 35 % po 3 min ekspozicijos	**Ėsdinanti:** •neprivaloma pakategorė 1A (*)
≥ 35 % po 3 min ekspozicijos **IR** < 35 % po 60 min ekspozicijos **ARBA** ≥ 35 % po 60 min ekspozicijos **IR** < 35 % po 240 min ekspozicijos	**Ėsdinanti:** •neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys
≥ 35 % po 240 min ekspozicijos	**Neėsdinanti**

(*) Atsižvelgiant į duomenis, gautus vertinant pakategorėms patvirtinti skirtų RhE bandymo modelių naudingumą, buvo parodyta, kad maždaug 22 % EpiSkin ™ bandymo modelio 1A pakategorės rezultatų iš tikrųjų gali būti 1B ar 1C pakategorės medžiagos ir (arba) mišiniai (t. y. priskirta per didelė pakategorė) (žr. 3 priedėlį).

36. EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) ir epiCS® (16) (23) (37) odos ėsdinimo bandymo metodo prognozavimo modeliai, susiję su JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema, pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS®

Gyvybingumas, išmatuotas ekspozicijos trukmės taškuose (t = 3 ir 60 min)	Prognozė, į kurią turi būti atsižvelgta
EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS® 1 PAKOPA	
< 50 % po 3 min ekspozicijos	**Ėsdinanti**
≥ 50 % po 3 min ekspozicijos **IR** < 15 % po 60 min ekspozicijos	**Ėsdinanti**
≥ 50 % po 3 min ekspozicijos **IR** ≥ 15 % po 60 min ekspozicijos	**Neėsdinanti**
EpiDerm™ SCT 2 PAKOPA, medžiagų ir (arba) mišinių, pagal 1 pakopą identifikuotų kaip ėsdinantys	
< 25 % po 3 min ekspozicijos	Neprivaloma pakategorė 1A*

Gyvybingumas, išmatuotas ekspozicijos trukmės taškuose (t = 3 ir 60 min)	Prognozė, į kurią turi būti atsižvelgta
EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ir epiCS® 1 PAKOPA	
≥ 25 % po 3 min ekspozicijos	Neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys
SkinEthic™ RHE 2 PAKOPA, medžiagų ir (arba) mišinių, pagal 1 pakopą identifikuotų kaip ėsdinantys	
< 18 % po 3 min ekspozicijos	Neprivaloma pakategorė 1A*
≥ 18 % po 3 min ekspozicijos	Neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys
epiCS® 2 PAKOPA, medžiagų ir (arba) mišinių, pagal 1 pakopą identifikuotų kaip ėsdinantys	
< 15 % po 3 min ekspozicijos	Neprivaloma pakategorė 1A*
≥ 15 % po 3 min ekspozicijos	Neprivalomų pakategorių 1B ir 1C derinys

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

37. Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvieno atskirų audinio kartotinių bandinių bandymo duomenys (pvz., OT vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įtraukiant kartotinių bandymų duomenis, jei reikia. Be to, ataskaitoje turėtų būti pateikti kiekvieno bandymo gyvybingumo vidurkiai bei intervalai ir audinio kartotinių bandinių variacijos koeficientai (VK). Ataskaitoje reikėtų nurodyti kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai stebimas tiesioginių MTT reduktorių arba spalvotų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

Bandymo ataskaita

38. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

— Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

— daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— šaltinis, partijos numeris, jei yra;

— bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;

— laikymo sąlygos.

naudotas RhE modelis ir protokolas bei jo pagrindimas (jei tinka)

Bandymo sąlygos

— naudotas RhE modelis (įskaitant partijos numerį);

— informacija apie matavimo prietaiso (pvz., spektrofotometro) kalibravimą, bangos ilgį ir dažnių juostos plotį (jei tinka), naudojamą MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir matavimo prietaiso tiesiškumo intervalą;

— MTT formazano kiekybinio nustatymo metodo aprašymas;

— HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumo įvertinimo aprašymas, jei tinka;

— visa su konkrečiu RhE modeliu susijusi pagalbinė informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:

i) gyvybingumas;

ii) apsauginė funkcija;

iii) morfologija;

iv) atkuriamumas ir prognozavimo geba;

v) modelio kokybės kontrolei naudojamos medžiagos;

— nuoroda į modelio istorinius duomenis. Tai, be kita ko, apima kokybės kontrolės duomenų priimtinumą, atsižvelgiant į istorinius partijos duomenis;

— bandymo metodo taikymo kvalifikacijos įrodymas prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas.

Bandymo procedūra:

— naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys (įskaitant plovimo procedūras, atliekamas pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui);

— bandomosios cheminės medžiagos ir naudojamų kontrolinių cheminių medžiagų dozės;

— ekspozicijos laikotarpio (-ų) trukmė ir ekspozicijos temperatūra (-os);

— su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudojamų kontrolinių medžiagų nuoroda,

— audinių kartotinių bandinių, naudojamų bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamam, neigiamam kontroliniams ėminiams, NSMTT, NSS_{gyv} ir NSS_{negyv}, jei tinka), skaičius vienai ekspozicijos trukmei;

— taikomų sprendimo priėmimo ir (arba) prognozavimo kriterijų, pagrįstų RhE modeliu, aprašymas;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas (įskaitant plovimo procedūras).

Atskiro bandymo ir bandymo priimtinumo kriterijai:

— Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vidutinės vertės bei priimtinumo intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis;

— priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams;

— priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai.

Rezultatai:

— lentelėse pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių kiekvieno ekspozicijos laikotarpio, kiekvieno atskiro bandymo ir kiekvieno kartotinio bandinio matavimų duomenys, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, audinio gyvybingumo procentinę dalį, vidutinę audinio gyvybingumo procentinę dalį, skirtumus tarp kartotinių bandinių, standartinius nuokrypius ir (arba) VK, jei tinka;

— jei tinka, kontrolinių ėminių, naudotų tiesioginiams MTT reduktoriams ir (arba) spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, rezultatai, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, % NSMTT, % NSS_{gyv}, % NSS_{negyv}, skirtumus tarp adinio kartotinių bandinių, SN ir (arba) VK (jei tinka) ir galutinę tikslią audinio gyvybingumo procentinę dalį;

— rezultatai gauti bandomajai (-ioms) cheminei (-ėms) medžiagai (-oms) ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms, atsižvelgiant į nustatytus atskiro bandymo ir bandymo priimtinumo kriterijus;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;

— gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

LITERATŪRA

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

(2) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.

(3) Šio priedo B.40 skyrius. Odos suardymas *in vitro*.

(4) Šio priedo B.65 skyrius. *In Vitro* odos ėsdinimo naudojant membraninę pertvarą metodas.

(5) Šio priedo B.46 skyrius, *In Vitro* odos dirginimas. Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. 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 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

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

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas: bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (25).

Ląstelių gyvybingumas: bendrojo ląstelių populiacijos aktyvumo, *pvz.*, ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių gebėjimo redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlynąjį), matavimo parametras, kuris, atsižvelgiant į matuojamą vertinamąją baigtį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių gyvųjų ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Sutapimas: bandymo metodo, kuriuo gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (25).

ET_{50}: gali būti įvertinta kaip ekspozicijos trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamąja chemine medžiaga, taip pat žr. IC_{50}.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema): sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

HPLC: efektyvioji skysčių chromatografija.

IATA: integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

IC_{50}: gali būti įvertinta nustatant palyginamosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuriai esant audinių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC_{50}) po tam tikros ekspozicijos trukmės, taip pat žr. ET_{50}.

Neribota dozė: ant *epidermio* dedamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai padengti *epidermio* paviršių. **Mišinys** – dviejų arba daugiau medžiagų mišinys arba tirpalas, kuriuose jos nereaguoja.

Vienkomponentė medžiaga: medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Daugiakomponentė medžiaga: medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NĖ: neėsdinanti.

NSS_{negyv} kontrolinis ėminys: nespecifinės negyvų audinių spalvos kontrolinis ėminys.

NSS_{gyv} kontrolinis ėminys: nespecifinės gyvųjų audinių spalvos kontrolinis ėminys.

NSMTT: nespecifinė MTT redukcija.

OT: optinis tankis.

Teigiamas kontrolinis (PC) ėminys: kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. Performance Standards (PS)): patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) panašūs tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (25).

Tinkamumas: santykio tarp bandymo metodo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra bandymo metodo, taikomo tiriamam biologiniam poveikiui matuoti ar prognozuoti, tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (25).

Patikimumas: pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (25).

Atskiras bandymas: vienos arba daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas vienu metu su neigiamu kontroliniu ėminiu ir teigiamu kontroliniu ėminiu.

Jautris: visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (25).

Odos ėsdinimas*in vivo*: negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma dermio nekrozė per *epidermį*, praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo. Atsakas į ėsdinimą yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, pasibaigus 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Specifiškumas: visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (25).

Medžiaga: natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties. **Bandomoji cheminė medžiaga** – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UPLC: ypač efektyvi skysčių chromatografija.

UVCB: nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

2 priedėlis

ODOS ĖSDINIMO BANDYMUI PATVIRTINTŲ RHE BANDYMO MODELIŲ PAGRINDINIAI KOMPONENTAI

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modelio paviršiaus plotas	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Audinio kartotinių bandinių skaičius	Ne mažiau kaip 2 vienai ekspozicijos trukmei	2–3 vienai ekspozicijos trukmei	Ne mažiau kaip 2 vienai ekspozicijos trukmei	Ne mažiau kaip 2 vienai ekspozicijos trukmei
Apdorojimo dozės ir uždėjimo būdas	Skysčiai ir klampios medžiagos: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Kietosios medžiagos: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl NaCl tirpalo (9 g/l) Vaškinga/lipni: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) su nailono tinkleliu	Skysčiai: 50 µl (79,4 µl/cm^2) su nailono tinkleliu ar be jo *Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo su nailono tinkleliu tikrinimas prieš bandymą* Pusiau kietos: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Kietosios medžiagos: 25 µl H_2O (arba daugiau, jei būtina) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vaškai: plokščias disko formos daiktas maždaug 8 mm skersmens, dedamas ant 15 µl H_2O suvilgyto audinio viršaus.	Skysčiai ir klampios medžiagos: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) naudojant nailono tinklelį *Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo su nailono tinkleliu tikrinimas prieš bandymą* Kietosios medžiagos: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vaškinga/lipni: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) naudojant nailono tinklelį	Skysčiai: 50 µl (83,3 µl/cm^2) naudojant nailono tinklelį *Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo su nailono tinkleliu tikrinimas prieš bandymą* Pusiau kietos: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Kietosios medžiagos: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (arba daugiau, jei būtina) Vaškai: plokščias sausainio formos daiktas maždaug 8 mm skersmens, dedamas ant 15 µl H_2O suvilgyto audinio viršaus.

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pradinis tikrinimas dėl tiesioginės MTT redukcijos	50 µl (skysčio) arba 20 mg (kietosios medžiagos)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml tirpalo, 180 ±5 min esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos)+ 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 60 min esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti šaltyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	40 µl (skysčio) arba 20 mg (kietosios medžiagos) + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 180± 15 min esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti šaltyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 60 min esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti šaltyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą
Pradinis tikrinimas dėl spalvos trukdžių	10 µl (skysčio) arba 10 mg (kietosios medžiagos) + 90 µl H_2O, maišoma 15 min kambario temperatūroje → jei tirpalas įgyja spalvą, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 300 µl H_2O 60 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jei tirpalas įgyja spalvą, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	40 µl (skysčio) arba 20 mg (kietosios medžiagos) + 300 µl H_2O, maišoma 60 min kambario temperatūroje → jei bandomoji cheminė medžiaga yra spalvota, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	50 µl (skysčio) arba 25 mg (kietosios medžiagos) + 300 µl H_2O 60 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jei tirpalas įgyja spalvą, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą
Ekspozicijos trukmė ir temperatūra	3 min, 60 min (± 5 min) ir 240 min (± 10 min) Vėdinamoje kameroje Kambario temperatūra (KT, 18–28 °C)	3 min, esant KT ir 60 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min, esant KT ir 60 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min, esant KT ir 60 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Skalavimas	25 ml 1x PBS (2 ml/kartui)	20 kartų pastovia nestipria 1x PBS srove	20 kartų pastovia nestipria srove	20 kartų pastovia nestipria 1x PBS srove

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Neigiamas kontrolinis ėminys	50 µl NaCl tirpalo (9 g/l) Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	50 µl H_2O Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	40 µl H_2O Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	50 µl H_2O Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei
Teigiamas kontrolinis ėminys	50 µl ledinės acto rūgšties Bandoma tik 4 h ekspozicijai	50 µl 8N KOH Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei	40 µl 8N KOH Bandoma tik 1 h ekspozicijai	50 µl 8N KOH Bandoma kiekvienai ekspozicijos trukmei
MTT tirpalas	2 ml, 0,3 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml
MTT inkubavimo trukmė ir temperatūra	180 min (± 15 min), esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Ekstrahavimo tirpiklis	500 µl parūgštinto izopropanolio (0,04 M HCl izopropanolyje) (atskirtas audinys visiškai įmerktas)	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)	1,5 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)
Ekstrahavimo trukmė ir temperatūra	Per naktį, esant KT, apsaugotas nuo šviesos	Per naktį kambario temperatūroje, jei nepurtoma, arba 120 min purtant (~120 aps/min) kambario temperatūroje	Per naktį kambario temperatūroje, jei nepurtoma, arba 120 min purtant (~120 aps/min) kambario temperatūroje	Per naktį kambario temperatūroje, jei nepurtoma, arba 120 min purtant (~120 aps/min) kambario temperatūroje

Bandymo modelio komponentai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
OT rodmenys	570 nm (545–595 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (arba 540 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (540–600 nm) be palyginamojo filtro	540–570 nm be palyginamojo filtro
Audinių kokybės kontrolė	18 h apdorojimas SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Apdorojimas 1 % Triton X-100 4,08 h ≤ ET_{50} ≤ 8,7 h	Apdorojimas 1 % Triton X-100 4,0 h ≤ ET_{50} ≤ 10,0 h	Apdorojimas 1 % Triton X-100 2,0 h ≤ ET_{50} ≤ 7,0 h
Priimtinumo kriterijai	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (NaCl), vidutinis OT turėtų būti ≥ 0,6 ir ≤ 1,5 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 4 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (ledinė acto rūgštis), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti ≤ 20 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui ir OT ≥ 0,3, dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (H_2O), vidutinis OT turėtų būti ≥ 0,8 ir ≤ 2,8 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 1 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (8 M KOH), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti < 15 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui kartotinių audinio bandinių variacijos koeficientas (VK) turėtų būti ≤ 30 %	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (H_2O), vidutinis OT turėtų būti ≥ 0,8 ir ≤ 3,0 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 1 h (ir 4 h, jei tinka) veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (8 M KOH), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti < 15 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui ir OT ≥ 0,3, dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu (H_2O), vidutinis OT turėtų būti ≥ 0,8 ir ≤ 2,8 kiekvienai ekspozicijos trukmei 2. Audinio kartotinių bandinių, 1 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu (8 M KOH), vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti < 20 % 3. 20–100 % gyvybingumo intervalui ir OT ≥ 0,3, dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas neturėtų būti didesnis kaip 30 %

3 priedėlis

KLASIFIKAVIMO Į PAKATEGORES NAUDOJANT BANDYMO MODELIUS CHARAKTERISTIKOS

Toliau pateiktoje lentelėje nurodytos keturių bandymo modelių naudojimo charakteristikos, pagrįstos keturių bandymų kūrėjų 80 cheminių medžiagų rinkinio bandymu. Skaičiavimus atliko EBPO sekretoriatas, juos peržiūrėjo ir pritarė ekspertų pogrupis (21) (23).

Taikant EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ ir epiCS® bandymo modelius, galima skirstyti į pakategores (t. y. 1A *versus* 1B ir 1C *versus* NĖ).

Keturių bandymo modelių naudojimo charakteristikos, priskyrimo aukštesnei kategorijai procentinė dalis, priskyrimo žemesnei kategorijai procentinė dalis ir tikslumas (prognozavimo geba), pagrįstas 80 cheminių medžiagų rinkiniu, kai visos medžiagos buvo bandomos atliekant 2 ar 3 atskirus bandymus kiekvienam bandymo modeliui.

PROGNOZAVIMO STATISTINIAI DUOMENYS, GAUTI VISAM CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ RINKINIUI

(n = 80 cheminių medžiagų, bandytų atliekant 2 nepriklausomus bandymus, naudojant epiCS®, arba 3 nepriklausomus bandymus, naudojant EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ ir SkinEthic™ RHE, t. y. 159 (*) arba 240 klasifikavimo rezultatų).

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Priskyrimas aukštesnei kategorijai:				
1B ir 1C priskirta aukštesnė 1A kategorija	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NĖ priskirta aukštesnė 1B ir 1C kategorija	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NĖ priskirta aukštesnė 1A kategorija	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Neteisingai priskirtos ėsdinančioms	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Bendroji priskyrimo aukštesnei kategorijai procentinė dalis (visų kategorijų)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Priskyrimas žemesnei kategorijai:				
1A priskirta žemesnė 1B ir 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A priskirta žemesnė NĖ	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B ir 1C priskirta žemesnė NĖ	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Bendroji priskyrimo žemesnei kategorijai procentinė dalis (visų kategorijų)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Teisingas klasifikavimas:				
Teisingai priskirta 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Teisingai priskirta 1B ir 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Teisingai priskirta NĖ	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Bendrasis tikslumas	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NĖ – neėsdinanti.

(*) Viena cheminė medžiaga buvo bandoma epiCS® tik vieną kartą, nes jos daugiau nebuvo (23)

4 priedėlis

HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos, skirtos iš RhE audinio ekstrahuotam MTT formazanui matuoti, tinkamumo įvertinimo pagrindiniai parametrai ir priimtinumo kriterijai

Parametras	Protokolas, parengtas pagal FDA rekomendacijas (37) (38)	Priimtinumo kriterijai
Atrankumas	Izopropanolio, gyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų gyvųjų audinių izopropanolio ekstrakto), negyvų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų negyvų audinių izopropanolio ekstrakto) analizė	$Plotas_{trukdžių} \leq 20\ \% Plotas_{LLOQ}$ [1]
Preciziškumas	Kokybės kontrolės ėminiai (t. y. MTT formazano 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ir 160 µg/ml tirpalas) izopropanolyje (n = 5)	VK ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Tikslumas	Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	% Nuokr. ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Matricos efektas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 5)	85 % ≤ matricos efektas % ≤ 115 %
Pernaša	Izopropanolio analizė po $ULOQ^2$ etaloninio tirpalo [2]	$Plotas_{trukdžių} \leq 20\ \% Plotas_{LLOQ}$
Atkuriamumas (vienos dienos)	3 nepriklausomos kalibravimo kreivės (gautos nuosekliai skiedžiant 6 kartus MTT formazaną izopropanolyje santykiu 1/3, pradedant ULOQ, t.y. 200 µg/ml); Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	Kalibravimo kreivės: % Nuokr. ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ Kokybės kontrolės ėminiai: % Nuokr. ≤ 15 % ir VK ≤ 15 %
Atkuriamumas (tarp dienų)	1 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 2 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 3 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3)	
MTT formazano RhE audinio ekstrakte trumpalaikis stabilumas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po 24 h laikymo kambario temperatūroje	% Nuokr. ≤ 15 %
MTT formazano RhE audinio ekstrakte ilgalaikis stabilumas, jei reikia	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po kelių laikymo tam tikroje temperatūroje (pvz., 4 °C, –20 °C, –80 °C) dienų	% Nuokr. ≤ 15 %“

[1] LLOQ – apatinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip sudaranti 1–2 % audinio gyvybingumo, t. y. 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ – viršutinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip koncentracija, ne mažiau kaip du kartus didesnė nei didžiausia tikėtina MTT formazano koncentracija neigiamų kontrolinių ėminių izopropanolio ekstraktuose, t. y. 200 µg/ml.

7) B dalies B.46 skyrius pakeičiamas taip:

„B.46 **ODOS DIRGINIMAS *IN VITRO*. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO BANDYMO METODAS**

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 439 (2015). Odos dirginimu vadinamas grįžtamasis odos pažeidimas po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip 4 h (kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP)) ([1]). Šiame bandymo metode pateikiama *in vitro* procedūra, kurią galima naudoti 2 kategorijos dirginančiųjų cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) pagal JT GHS ir CLP pavojui identifikuoti (2). Regionuose, kuriuose netaikoma neprivaloma JT GHS 3-ioji kategorija (švelnūs dirgikliai), šis bandymo metodas taip pat gali būti taikomas neklasifikuojamoms cheminėms medžiagoms identifikuoti. Todėl priklausomai nuo galiojančios reglamentavimo sistemos ir klasifikavimo sistemos šis bandymo metodas gali būti taikomas cheminių medžiagų sukeliamam odos dirginamumui nustatyti kaip atskiras pakaitinis bandymas *in vivo* odos dirginimui bandyti arba kaip nuosekliųjų bandymų strategijos dalinis pakaitinis bandymas (3).

2. Odos dirginimo vertinimas paprastai yra susijęs su laboratorinių gyvūnų naudojimu (B.4 bandymo metodas, atitinkantis EBPO TG 404, pirmą kartą priimtas 1981 m., peržiūrėtas 1992 m., 2002 m. ir 2015 m.) (4). Ėsdinimui bandyti buvo priimti trys patvirtinti *in vitro* bandymo metodai – ES B.40 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 430), B.40bis bandymo metodas (atitinka EBPO TG 431) ir B.65 bandymo metodas (atitinka EBPO TG 435) (5) (6) (7). EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei pateikiami nurodymai, kaip (i) integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai (3).

3. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos dirginimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Jis pagrįstas rekonstruoto žmogaus *epidermio* (RhE), kuris labai tiksliai atkartoja biochemines ir fiziologines viršutinių žmogaus odos dalių, t. y. *epidermio*, savybes, *in vitro* bandymo sistema. Kaip ląstelių šaltinį epidermio modeliui su reprezentatyviąja histologija ir ląstelių architektūra rekonstruoti RhE bandymo sistema naudoja žmogaus odos keratinocitus. Yra naudojimo charakteristikų standartai, kurie padėtų atlikti panašių ir modifikuotų RhE pagrįstų bandymo metodų patvirtinimą ir vertinimą, atsižvelgiant į EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 34 principus (8) (9). Atitinkamos bandymo gairės buvo pirmą kartą priimtos 2010 m. ir atnaujintos 2013 m., įtraukiant papildomus RhE modelius, ir dar kartą atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą bei įtraukiant alternatyviąją gyvybingumo matavimo procedūrą.

4. Atlikti keturių prekyboje esančių *in vitro* bandymo modelių (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), pagrįstų RhE bandymo sistema (jautris – 80 %, specifiškumas – 70 % ir tikslumas 75 %) parengiamojo patvirtinimo, optimizavimo ir patvirtinimo tyrimai. Šie keturi bandymo modeliai yra įtraukti į šį bandymo metodą ir išvardyti 2 priedėlyje, kurioje taip pat pateikiama informacija apie patvirtinimo tyrimo tipą, naudotą atitinkamiems bandymo metodams patvirtinti. Kaip pažymėta 2 priedėlyje, patvirtintas pamatinis metodas (PPM) buvo taikomas šiam bandymo metodui ir naudojimo charakteristikų standartams sukurti (8).

5. EBPO abipusis duomenų pripažinimas būtų užtikrintas tik bandymo modeliams, patvirtintiems pagal naudojimo charakteristikų standartus (8), jei šiuos bandymo modelius peržiūrėjo ir priėmė EBPO. Į šį bandymo metodą ir atitinkamas EBPO bandymo gaires įtraukti bandymo modeliai gali būti naudojami sprendžiant be skirtumo klausimus, susijusius su šalies reikalavimais odos dirginimo *in vitro* bandymo metodų rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

6. Šiame dokumente vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

7. Bandymo metodo ribotumas, kaip rodo išsamus perspektyvusis patvirtinimo tyrimas vertinant ir apibūdinant RhE bandymo metodus (16), yra tai, jį taikant cheminių medžiagų neįmanoma priskirti neprivalomai JT GHS 3-iajai kategorijai (švelnūs dirgikliai) (1). Todėl valstybių narių reglamentavimo sistema turės priimti sprendimą, kaip reikėtų taikyti šį bandymo metodą. Į ES CLP 3-ioji kategorija nėra įtraukta. Siekiant išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente dėl integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (3). Pripažįstama, kad žmogaus odos bandymams taikomi nacionaliniai ir tarptautiniai etikos principai bei sąlygos.

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

8. Šis bandymo metodas skirtas tirti odos dirginimą kaip žmogaus sveikatos vertinamąją baigtį. Nors taikant šį bandymo metodą negaunama reikiamos informacijos apie odos ėsdinimą, reikėtų pažymėti, kad odos ėsdinimui skirtas B.40bis (atitinka EBPO TG 431) yra pagrįstas ta pačia RhE bandymo sistema, bet naudojamas kitas protokolas (6). Šis bandymo metodas pagrįstas RhE modeliais, kuriems naudojami žmogaus keratinocitai, kurie *in vitro* reprezentuoja tiriamos rūšies tikslinį organą. Be to, jis tiesiogiai aprėpia uždegiminių procesų ir (arba) veikimo mechanizmo pakopų pradinę pakopą (ląstelių ir audinio pažeidimą, gaunant vietinę traumą), kuri vyksta *in vivo* dirginimo metu. Atliekant šio bandymo metodo patvirtinimą buvo bandoma didelė cheminių medžiagų grupė ir į patvirtinimo tyrimo duomenų bazę iš viso įtrauktos 58 cheminės medžiagos (16) (18) (23). Bandymo metodas taikomas kietosioms medžiagoms, skysčiams, pusiau kietoms medžiagoms ir vaškams. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas prieš bandymą reikėtų sumalti; jokio kito ėminio parengiamojo apdorojimo atlikti nereikia. Atliekant patvirtinimo tyrimą, dujos ir aerozoliai kol kas nebuvo vertinami (29). Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant RhE procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.

9. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Tačiau atsižvelgiant į tą faktą, kad mišiniai aprėpia daug kategorijų ir sudėčių ir šiuo metu yra labai nedaug informacijos apie mišinių bandymus tais atvejais, kai galima įrodyti bandymo metodo netinkamumą specifinei mišinių kategorijai (pvz., taikant Eskes *et al.* 2012, pasiūlytą strategiją (30)), bandymo metodas neturėtų būti taikomas tai specifinei mišinių kategorijai. Panašiai reikėtų elgtis atsargiai, jei būtų nustatyta, kad tam tikroms cheminių medžiagų klasėms ar fizikocheminėms savybėms šis bandymo metodas netinka.

10. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių šviesos absorbcijos sritis sutampa su MTT formazano, ir bandomosios cheminės medžiagos, kurios gali tiesiogiai redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT (į MTT formazaną), gali trukdyti matuoti ląstelių gyvybingumą, todėl pataisoms daryti turi būti naudojami pritaikyti kontroliniai ėminiai (žr. 28–34 pastraipas).

11. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno ne mažiau kaip trijų kartotinių audinio bandinių atskiro bandymo. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė procentinė gyvybingumo vertė lygi 50 ± 5 %, reikėtų spręsti dėl antrojo nepriklausomo atskiro bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.

BANDYMO PRINCIPAS

12. Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trimačio RhE modelio, sudaryto iš netransformuotų žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo auginami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai diferencijuotas žmogaus *epidermio* modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelinių žvynelių pavidalo lipidų sluoksnių, reprezentuojančių pagrindines lipidų klases, analogiškas randamoms *in vivo*.

13. Cheminių medžiagų sukeltas odos dirginimas, daugiausia pasireiškiantis kaip eritema ir edema, yra įvykių sekos, prasidedančios cheminių medžiagų prasiskverbimu pro *stratum corneum*, kai jos gali pažeisti po juo esančius keratinocitų sluoksnius ir kitas odos ląsteles, rezultatas. Pažeistos ląstelės gali išskirti uždegiminius mediatorius arba sukelti uždegiminių procesų seką, veikiančią *dermio* ląsteles, pirmiausia kraujagyslių stromos ir endotelio ląsteles. Matomą eritemą ir edemą sukelia endotelio ląstelių išsiplėtimas ir padidėjęs pralaidumas (29). Būtent, jei *in vitro* bandymo sistemoje nėra vaskuliarizacijos, RhE pagrįstais bandymo metodais matuojami pradiniai sekos įvykiai, pvz., ląstelių ir (arba) audinio pažeidimas (16) (17), kaip rodmenį naudojant ląstelių gyvybingumą.

14. Ląstelių gyvybingumas naudojant RhE modelius matuojamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido, tiazolilo mėlynojo, CAS Nr. 298-93-1), fermentinį virsmą į mėlynos spalvos formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš audinių (31). Dirginančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų gebėjimą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnių nei nustatyti slenkstinių lygių (t. y. ≤ 50 % JT GHS ir CLP 2-ajai kategorijai). Priklausomai nuo reglamentavimo sistemos ir šio bandymo metodo tinkamumo, bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunamas ląstelių gyvybingumas yra didesnis nei nustatytas slenkstinis lygis, gali būti laikomos nedirginančiomis (t. y. > 50 %, be kategorijos).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

15. Prieš pradėdamos naudoti šį bandymo metodą atitinkančius keturis patvirtintus RhE modelius (2 priedėlis) įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Tais atvejais, kai, pvz., sąraše nurodytos medžiagos nėra, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (8)), jei taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje. Jei naudojama kita kvalifikacijai įrodyti skirta medžiaga, naudojimą reikėtų pagrįsti.

16. Atliekant kvalifikacijos įrodymo bandymus, naudotojams taip pat rekomenduojama patikrinti po audinių gavimo jų apsaugines savybes, nurodytas RhE modelio gamintojo. Tai ypač svarbu, jei audiniai gabenami dideliais atstumais ir (arba) ilgą laiką. Kai bandymo metodas sėkmingai sukurtas ir jo taikymo kvalifikacija yra įgyta ir įrodyta, vėliau tokio tikrinimo reguliariai daryti nebūtina. Tačiau, jei bandymo metodas taikomas nuolat, apsaugines savybes rekomenduojama ir toliau vertinti reguliariais laiko tarpais.

1 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos ([1])

Medžiaga	CAS NR	*In vivo* balas ([2])	Agregatinė būsena	JT GHS kategorija
NEKLASIFIKUOTOS MEDŽIAGOS (JT GHS be kategorijos)				
naftalenacto rūgštis	86-87-3	0	Kietoji medžiaga	Be kategorijos
izopropanolis	67-63-0	0,3	Skystis	Be kategorijos
metilstearatas	112-61-8	1	Kietoji medžiaga	Be kategorijos
heptilbutiratas	5870-93-9	1,7	Skystis	Be kategorijos (*neprivaloma 3-ioji kat.*) ([3])
heksilsalicilatas	6259-76-3	2	Skystis	Be kategorijos (*neprivaloma 3-ioji kat.*) ([3])
KLASIFIKUOTOS MEDŽIAGOS (JT GHS 2-oji kategorija)				
ciklamenaldehidas	103-95-7	2,3	Skystis	2 kategorija
1-bromheksanas	111-25-1	2,7	Skystis	2 kategorija
kalio hidroksidas (5 % vand.)	1310-58-3	3	Skystis	2 kategorija
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5271-27-2	3,3	Kietoji medžiaga	2 kategorija
heptanalis	111-71-7	3,4	Skystis	2 kategorija

([1]) Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos sudaro patvirtinimo tyrime naudojamų medžiagų rinkinio dalį ir jų atranka pagrįsta šiais kriterijais: i) cheminės medžiagos yra prekyboje; ii) jos reprezentuoja visą Draize dirginimo balų intervalą (nuo nedirginančių iki stipriai dirginančių); iii) jos turi tinkamai nustatytą cheminę struktūrą; iv) jos reprezentuoja patvirtinimo procese naudotų cheminių medžiagų funkcines grupes; v) joms gautas *in vitro* rezultatų atkuriamumas, dideliam laboratorijų skaičiui atliekant kartotinius bandymus; vi) buvo tinkamai numatytos *in vitro* ir vii) jos nėra susijusios su didelio toksiškumo parametrais (pvz., kancerogeniškumu arba toksiškumu reprodukcijos sistemai) ir nėra susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

([2]) *In vivo* balas pagal B.4 bandymo metodą (4).

([3]) Pagal šį bandymo metodą, neprivaloma JT GHS 3-ioji kategorija (švelnūs dirgikliai) (1) laikoma *be kategorijos*.

PROCEDŪRA

17. Toliau pateikiamas odos dirginimo vertinimo RhE bandymo modelių komponentų ir procedūrų bendrasis aprašymas (apie parametrus, susijusius su kiekvienu bandymo modeliu, taip pat žr. 3 priedėlį). Yra šį bandymo metodą atitinkančių keturių modelių standartinės veiklos procedūros (32) (33) (34) (35).

RHE BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Bendrosios sąlygos

18. Epiteliui rekonstruoti turėtų būti naudojami netransformuoti žmogaus odos keratinocitai. Po funkciniu *stratum corneum* turėtų būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* turėtų būti daugiasluoksnis ir turėti pagrindinių lipidų profilį, kad būtų gautas patvarus veiksmingas barjeras, kuris būtų atsparus citotoksinių palyginamųjų cheminių medžiagų, pvz., natrio dodecilsulfato (SDS) arba Triton X-100, greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija turėtų būti įrodyta ir gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant palyginamoji cheminė medžiaga per tam tikrą ekspozicijos laiką sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC_{50}), arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamosios cheminės medžiagos ekspozicijos trukmę, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET_{50}). RhE modelio sulaikymo savybės turėtų apsaugoti nuo medžiagos patekimo prie gyvojo audinio apeinant *stratum corneum*, nes taip būtų blogai modeliuojama odos ekspozicija. RhE modelis neturėtų būti užkrėstas bakterijomis, virusais, mikoplazmomis ar grybeliais.

Veikimo sąlygos

Gyvybingumas

19. Kiekybinio gyvybingumo nustatymo bandymas yra MTT bandymas (31). Gyvybingos RhE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas, kurios ekstrahuojamos iš audinio izopropanoliu (arba panašiu tirpikliu). Paties ekstrahavimo tirpiklio optinis tankis (OT) turėtų būti pakankamai mažas, t. y. OT< 0,1. Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio matavimą arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (36). RhE modelio naudotojai turėtų užtikrinti, kad kiekviena naudoto RhE modelio partija atitiktų neigiamiems kontroliniams ėminiams nustatytus kriterijus. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) (odos dirginimo bandymo metodo sąlygomis) nustato RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Į šį bandymo metodą įtrauktų keturių patvirtintų RhE bandymo modelių priimtinumo intervalai pateikti 2 lentelėje. Taikantys HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos metodą, turėtų naudoti 2 lentelėje pateiktų neigiamų kontrolinių ėminių OT intervalus kaip neigiamo kontrolinio ėminio priimtinumo kriterijų. Reikėtų dokumentuoti, kad neigiama kontroline medžiaga apdorotų audinių kultūra yra stabili (gaunami panašūs gyvybingumo matavimo rezultatai) visą ekspozicijos laikotarpį.

2 lentelė

Į šį bandymo metodą įtrauktų bandymo modelių neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalai

	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
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

Apsauginė funkcija

20. *Stratum corneum* ir jo lipidų sudėtis turėtų būti pakankama, kad būtų suteikta apsauga nuo greito tam tikrų citotoksinių palyginamųjų cheminių medžiagų, pvz., SDS arba Triton X-100, prasiskverbimo, įvertinamo pagal IC_{50} arba ET_{50} (3 lentelė).

Morfologija

21. Turėtų būti atliktas RhE modelio histologinis tyrimas, įrodantis į žmogaus *epidermį* panašią struktūrą (įskaitant daugiasluoksnį *stratum corneum*).

Atkuriamumas

22. Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių rezultatai taikant bandymo metodą turėtų įrodyti atkuriamumą per ilgą laiką.

Kokybės kontrolė

23. RhE modelis turėtų būti naudojamas tik tokiu atveju, jei kūrėjas arba tiekėjas įrodo, kad kiekviena naudojamo RhE modelio partija atitinka nustatytus gaminių išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra *gyvybingumo* (19 pastraipa), *apsauginės funkcijos* (20 pastraipa) ir *morfologijos* (21 pastraipa) kriterijai. Šie duomenys turėtų būti pateikti taikantiesiems bandymo metodą, kad jie galėtų įtraukti šią informaciją į bandymo ataskaitą. IC_{50} arba ET_{50} verčių priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) turėtų nustatyti RhE modelio kūrėjas arba tiekėjas. Tik su kokybiškais audiniais gauti rezultatai gali būti laikomi patikimais prognozuojant dirginimo klasifikaciją. Į šį bandymo metodą įtrauktų keturių bandymo modelių priimtinumo intervalai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė

Į šį bandymo metodą įtrauktų modelių partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijai

	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiSkin™ (SM) (18 h trukmės apdorojimas 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 h trukmės apdorojimas SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

24. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontrolinėms medžiagoms reikėtų naudoti ne mažiau kaip tris kartotinius bandinius. Tiriant skystąsias ir kietąsias chemines medžiagas, reikėtų uždėti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, kurio pakaktų epidermio paviršiui tolygiai padengti, bet vengiant neribotos dozės, t. y. nuo 26 iki 83 µl/cm^2 arba mg/cm^2 (žr. 3 priedėlį). Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų uždėjimą *epidermio* paviršių reikėtų suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, kad būtų geresnis bandomosios cheminės medžiagos sąlytis su *epidermio* paviršiumi. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Kaip paskleidimo priemonė kartais gali būti naudojamas nailono tinklelis (žr. 3 priedėlį). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, bandomoji medžiaga turėtų būti kruopščiai nuplauta nuo *epidermio* vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Priklausomai nuo naudojamo RhE bandymo modelio ekspozicijos laikotarpio trukmė yra nuo 15 min iki 60 min ir inkubavimo temperatūra – nuo 20 °C iki 37 °C. Šių ekspozicijos laikotarpių trukmė ir temperatūra optimizuojami kiekvienam atskiram RhE bandymo metodui ir rodo skirtingas savąsias bandymo modelių savybes (pvz., apsauginę funkciją) (žr. 3 priedėlį).

25. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, reikėtų naudoti vienalaikius neigiamus kontrolinius (NC) ir teigiamus kontrolinius (PC) ėminius, siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (naudojant NC), apsauginė funkcija ir gaunamas audinių jautris (naudojant PC) atitinka nustatytą istorinį priimtinumo intervalą. Siūlomas PC yra 5 % vandeninis SDS. Siūlomi NC yra vanduo arba fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale.

Ląstelių gyvybingumo matavimai

26. Pagal bandymo procedūrą yra svarbu, kad gyvybingumas nebūtų matuojamas iš karto po ekspozicijos bandomajai cheminei medžiagai, bet praėjus pakankamai ilgam išplauto audinio inkubavimo po ekspozicijos laikotarpiui, jį laikant naujoje terpėje. Per šį laikotarpį sudaromos sąlygos atsigauti po nestipraus citotoksinio poveikio ir atsirasti aiškiam citotoksiniam poveikiui. Atliekant pagal šį bandymo metodą naudojamų RhE pagrįstų bandymo modelių optimizavimo bandymą, buvo nustatyta, kad optimalus inkubavimo po ekspozicijos laikotarpis yra 42 h (11) (12) (13) (14) (15).

27. MTT bandymas yra standartizuotas kiekybinis metodas, kuris turėtų būti taikomas ląstelių gyvybingumui matuoti pagal šį bandymo metodą. Jis yra suderinamas su trimačiu audinio modeliu. Audinio bandinys 3 h laikomas reikiamos koncentracijos MTT tirpale (pvz., 0,3–1 mg/ml). Veikiamas gyvybingų ląstelių, MTT virsta mėlynos spalvos formazanu. Į nuosėdas iškritęs mėlynos spalvos formazano reakcijos produktas ekstrahuojamas iš audinio tirpikliu (pvz., izopropanoliu, parūgštintu izopropanoliu), ir formazano koncentracija matuojama nustatant optinį tankį, kai bangos ilgis – 570 nm, filtro juostos plotis – ne didesnis kaip ±30 nm, arba taikant HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 34 pastraipą) (36).

28. Bandomosios cheminės medžiagos optinės savybės arba jos cheminė sąveika su MTT (pvz., cheminės medžiagos gali slopinti arba pakeisti spalvos atsiradimą, taip pat ją sukelti) gali trukdyti atlikti bandymą, gaunant klaidingą gyvybingumo įvertį. Tai gali įvykti, kai tam tikra bandomoji medžiaga nevisiškai pašalinama iš audinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į *epidermį*. Jei bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai veikia MTT (pvz., yra MTT reduktorius), yra natūraliai spalvota arba virsta spalvota apdorojant audinį, reikėtų naudoti papildomus kontrolinius ėminius, kad būtų galima aptikti ir koreguoti bandomosios cheminės medžiagos trukdžius taikomam gyvybingumo matavimo metodui (žr. 29 ir 33 pastraipas). Tiesioginės MTT redukcijos ir spalvotų medžiagų trukdžių koregavimo išsamus aprašymas pateiktas į šį bandymo metodą įtrauktų keturių patvirtintų modelių SVP (32) (33) (34) (35).

29. Kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą reikėtų įdėti į tik ką paruoštą MTT tirpalą, kad būtų galima identifikuoti tiesioginius MTT reduktorius. Jei MTT mišinys, kuriame yra bandomoji cheminė medžiaga, nusidažo mėlyna arba violetine spalva, daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT ir reikėtų atlikti papildomą veikimo tikrinimą su negyvais RhE audiniais, nepriklausomai nuo to, ar naudojama standartinė optinio tankio matavimo, ar HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūra. Šiam papildomam veikimo tikrinimui naudojami negyvi audiniai, kurie turi tik liekamąjį metabolinį aktyvumą, bet absorbuoja bandomąją cheminę medžiagą panašiai kaip gyvieji audiniai. Kiekviena MTT redukuojanti bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvų ląstelių kartotinių bandinių, kuriems atliekama visa bandymo procedūra, kad būtų gauta nespecifinė MTT redukcija (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Pakanka vieno NSMTT kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta MTT reduktoriaus veikiamiems gyviesiems audiniams, minus nespecifinės MTT redukcijos procentinė vertė, gauta to paties MTT reduktoriaus veikiamiems negyviems audiniams ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSMTT).

30. Siekiant nustatyti galimus trukdžius, kuriuos kelia spalvotos bandomosios cheminės medžiagos arba tapusios spalvotomis dėl sąlyčio su vandeniu arba izopropanoliu, ir nuspręsti, ar būtini papildomi kontroliniai ėminiai, reikėtų atlikti bandomosios cheminės medžiagos tirpalo vandenyje (aplinkoje ekspozicijos metu) ir (arba) izopropanolyje (ekstrahavimo tirpale) spektrinė analizė. Jei vandenyje ir (arba) izopropanolyje ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga absorbuoja šviesą 570 ± 30 nm srityje, reikėtų atlikti papildomus spalvotų kontrolinių ėminių bandymus arba naudoti HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą, ir tokiu atveju šių kontrolinių ėminių nereikia (žr. 33 ir 34 pastraipas). Kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas, kiekviena trukdžius kelianti spalvota bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų gyvųjų audinių kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoj MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje, kad būtų gautas nespecifinės spalvos (NSS_{gyv}) kontrolinis ėminys. Jei bandoma spalvota bandomoji cheminė medžiaga, turi būti atliekamas vienalaikis NSS_{gyv} kontrolinis bandymas ir kartotinių bandymų atveju atliekant kiekvieną bandymą (kiekvieną atskirą bandymą) turi būti atliekamas nepriklausomas NSS_{gyv} kontrolinis bandymas dėl gyviesiems audiniams būdingos biologinės įvairovės. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems MTT tirpale, minus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir bandomiems vienu metu su koreguojamu bandymu (% NSS_{gyv}).

31. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios identifikuojamos kaip tiesioginiai MTT reduktoriai (žr. 29 pastraipą) ir kelia spalvos trukdžius (žr. 30 pastraipą) be NSMTT ir NSS_{gyv} kontrolinių ėminių, aprašytų pirmiau pateiktose pastraipose, reikės trečiojo kontrolinių ėminių rinkinio, kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas. Paprastai atlikti MTT bandymą trukdo tamsios spalvos (pvz., mėlynos, violetinės, juodos) bandomosios cheminės medžiagos, nes jų pačių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 29 pastraipoje. Šios bandomosios cheminės medžiagos gali jungtis prie gyvųjų ir negyvų audinių, todėl naudojant NSMTT kontrolinį ėminį gali būti koreguojama ne tik galima tiesioginė MTT redukcija, bet ir spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos prisijungimo prie negyvų audinių. Todėl galėtų būti dvigubas spalvos trukdžių koregavimas, nes atliekant NSS_{gyv} kontrolinį bandymą jau koreguojami spalvos trukdžiai dėl

bandomosios cheminės medžiagos prijungimo gyvaisiais audiniais. Siekiant išvengti galimo dvigubo spalvos trukdžių koregavimo, reikia atlikti trečiąjį negyvų audinių nespecifinės spalvos (NSS_{negyv}) kontrolinį bandymą. Naudojant šį papildomą kontrolinį ėminį, bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoje MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje. Pakanka vieno NSS_{negyv} kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių, bet jis turėtų būti atliekamas vienu metu su NSMTT kontroliniu bandymu ir, jei įmanoma, su ta pačia audinio partija. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus % NSS_{gyv}, plius nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems negyviems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSS_{negyv}).

32. Svarbu pažymėti, kad audinio ekstraktui gauti rodmenys dėl nespecifinės MTT redukcijos ir nespecifinės spalvos trukdžių gali būti didesni nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas. Atsižvelgdama į tai, kiekviena laboratorija prieš pradėdama bandyti bandomąsias chemines medžiagas reglamentavimo tikslais, turėtų nustatyti savo spektrofotometro tiesiškumo intervalą, naudodama prekyboje esantį MTT formazaną (CAS Nr. 57360-69-7). Atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą spektrofotometru, galima įvertinti tiesioginius MTT reduktorius ir spalvos trukdžius sukeliančias bandomąsias chemines medžiagas, jei audinių ekstraktų OT, gauti bandomajai cheminei medžiagai be koregavimo dėl tiesioginės MTT redukcijos ir (arba) spalvos trukdžių, yra spektrofotometro tiesiškumo intervale arba jei bandomajai cheminei medžiagai gauta nekoreguota gyvybingumo procentinė dalis jau yra ≤ 50 %. Vis dėlto, į bandomosioms cheminėms medžiagoms gautus neigiamų kontrolinių ėminių % NSMTT ir (arba) % NSS_{gyv} ≥ 50 % rezultatus reikėtų žiūrėti atsargiai, nes tai yra ribinės vertės, pagal kurias atskiriamos klasifikuojamos ir neklasifikuojamo cheminės medžiagos (žr. 36 pastraipą).

33. Spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios nesuderinamos su standartiniu optinio tankio (OT) matavimu dėl per didelių trukdžių MTT bandymui, galima naudoti alternatyvią HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą MTT formazanui nustatyti (žr. 34 pastraipą) (36). Naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemą, MTT formazaną galima atskirti nuo bandomosios cheminės medžiagos prieš jo kiekybinį nustatymą (36). Dėl šios priežasties NSS_{gyv} arba NSS_{negyv} kontrolinių ėminių niekuomet nereikia, kai naudojama HPLC/UPLC ir spektrofotmetrija, nepriklausomai nuo bandomos cheminės medžiagos. Vis dėlto NSMTT kontrolinius ėminius reikėtų naudoti, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT arba jos spalva trukdo vertinti jos gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT (kaip aprašyta 29 pastraipoje). Jei MTT formazanui matuoti naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamiems gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Jei bandomosios cheminės medžiagos gali tiesiogiai redukuoti MTT, tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, minus % NSMTT. Pagaliau reikėtų pažymėti, kad negalima vertinti tiesioginių MTT reduktorių, kurie taip pat gali kelti spalvos trukdžius ir kurie po apdorojimo lieka audiniuose ir taip stipriai redukuoja MTT, kad gauti bandomų audinių ekstraktų OT (atliekant standartinį OT matavimą) arba smailių plotai (naudojant UPLC arba HPLC ir spektrofotometriją) nepatenka į spektrofotometro tiesiškumo intervalą, nors tikimasi, kad tai būtų tik labai retas reiškinys.

34. HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją MTT formazano matavimams taip pat galima naudoti visų tipų bandomosioms cheminėms medžiagoms (spalvotoms, nespalvotoms, MTT reduktoriams ir ne reduktoriams) (36). Dėl HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemų įvairovės HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumą reikėtų įrodyti prieš pradedant sistemą naudoti audinių ekstraktų MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir ji turi atitikti standartinių tinkamumo parametrų rinkinio priimtinumo kriterijus, pagrįstus aprašytais JAV maisto ir vaistų administracijos rekomendacijose pramonei dėl biologinės analizės metodo patvirtinimo (36) (37). Šie pagrindiniai parametrai ir priimtinumo kriterijai patekti 4 priedėlyje. Jei HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistema atitinka 4 priedėlyje nustatytus priimtinumo kriterijus, ji laikoma tinkama ir paruošta MTT formazanui matuoti šiame bandymo metode aprašytomis bandymo sąlygomis.

Priimtinumo kriterijai

35. Taikant kiekvieną patvirtintus RhE modelius naudojantį bandymo metodą (žr. 23 pastraipą), neigiama kontroline medžiaga apdorotiems ėminiams turėtų būti gautos OT vertės, rodančios audinių kokybę po jų gabenimo, priėmimo veiksmų ir visų protokolo procesų. Kontrolinių ėminių OT vertės neturėtų būti mažesnės nei istoriškai nustatytos ribos. PC medžiaga, t. y. 5 % vandeniniu SDS tirpalu, apdoroti audiniai turėtų rodyti gebėjimą reaguoti į dirginančią cheminę medžiagą bandymo metodo sąlygomis (žr. 3 priedėlį ir papildomai informacijai gauti – į šias bandymų gaires įtrauktų keturių modelių SVP (32) (33) (34) (35)). Susiję ir tinkami kintamumo tarp audinio kartotinių bandinių matai, t. y. standartiniai nuokrypiai (SN) turėtų atitikti naudotam bandymo modeliui nustatytas priimtinumo ribas (žr. 3 priedėlį).

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

36. Gautos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos OT vertės gali būti naudojamos gyvybingumo procentinei daliai skaičiuoti, palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu, kuriam gautas gyvybingumas prilyginamas 100 %. Jei naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamiems gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti dirginančias bandomąsias chemines medžiagas nuo neklasifikuojamų, ir statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti, turėtų būti aiškiai nustatytos, dokumentuotos ir įrodytos kaip tinkamos (informacija pateikta bandymo modelių SVP). Toliau pateiktos dirginimui prognozuoti naudojamos ribinės vertės:

— Bandomoji cheminė medžiaga identifikuojama kaip medžiaga, kurią reikia klasifikuoti ir ženklinti pagal JT GHS ir CLP (1 arba 2 kategorijos), jei vidutinė audinio gyvybingumo procentinė dalis po ekspozicijos ir inkubavimo po apdorojimo yra mažesnė kaip arba lygi (≤) 50 %. Kadangi taikant į šį bandymo metodą įtrauktus RhE bandymo modelius negalima atskirti JT GHS ir CLP 1 ir 2 kategorijų, reikia turėti papildomos informacijos apie odos ėsdinimą, kad būtų galima spręsti dėl jos galutinio klasifikavimo (taip pat žr. EBPO rekomendacinį dokumentą dėl IATA (3)). Jei nustatoma, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra ėsdinanti (pvz., pagal B.40, B.40bis arba B.65 bandymo metodus), ir audinio gyvybingumas po ekspozicijos bei inkubavimo po apdorojimo yra mažesnis arba lygus (≤) 50 %, bandomoji cheminė medžiaga laikoma dirginančia odą pagal JT GHS ir CLP 2-ąją kategoriją.

— Priklausomai nuo valstybių narių reglamentavimo sistemos, bandomoji cheminė medžiaga gali būti laikoma odos nedirginančia pagal JT GHS ir CLP *be kategorijos*, jei audinio gyvybingumas po ekspozicijos ir inkubavimo po apdorojimo yra didesnis kaip (>) 50 %.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

37. Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvieno atskirų audinio kartotinių bandinių atskiro bandymo duomenys (pvz., OT vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įtraukiant kartotinių bandymų duomenis, jei reikia. Be to, ataskaitoje reikėtų pateikti kiekvieno atskiro bandymo vidutinę vertę ± SN. Ataskaitoje reikėtų nurodyti kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai stebimas spalvotų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

Bandymo ataskaita

38. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

— Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

— daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— šaltinis, partijos numeris, jei yra;

— bandomosios ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;

— laikymo sąlygos.

naudotas RhE modelis ir protokolas (ir pasirinkimo pagrindimas, jei tinka)

Bandymo sąlygos

— naudotas RhE modelis (įskaitant partijos numerį);

— informacija apie matavimo prietaiso (pvz., spektrofotometro) kalibravimą, bangos ilgį ir dažnių juostos plotį (jei tinka), naudojamą MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir matavimo prietaiso tiesiškumo intervalą; MTT formazano kiekybinio nustatymo metodo aprašymas;

— HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumo įvertinimo aprašymas, jei tinka; visa su konkrečiu RhE modeliu susijusi pagalbinė informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Ją turi sudaryti šie ir kiti duomenys:

  i) gyvybingumas;

  ii) apsauginė funkcija;

  iii) morfologija;

  iv) atkuriamumas ir prognozuojamumas;

  v) modelio kokybės kontrolei naudojamos medžiagos;

— nuoroda į modelio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys: - kokybės kontrolės duomenų priimtinumas atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;

— bandymo metodo taikymo kvalifikacijos įrodymas prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas.

Bandymo procedūra:

— naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys (įskaitant plovimo procedūras, atliekamas pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui); bandomosios cheminės medžiagos ir naudojamų kontrolinių cheminių medžiagų dozė;

— ekspozicijos laikotarpio ir poekspozicinio inkubavimo laikotarpio trukmė ir temperatūra;

— su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudojamų kontrolinių medžiagų nuoroda,

— audinių kartotinių bandinių, naudojamų bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamam, neigiamam kontroliniams ėminiams, NSMTT, NSS_{gyv} ir NSS_{negyv}, jei tinka);

— taikomų sprendimo priėmimo ir (arba) prognozavimo kriterijų, pagrįstų RhE modeliu, aprašymas;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas (įskaitant plovimo procedūras).

Atskiro bandymo ir bandymo priimtinumo kriterijai:

— Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vidutinės vertės bei priimtinumo intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis; priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams;

— priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai.

Rezultatai:

— lentelėse pateikti atskiros bandomosios cheminės medžiagos kiekvieno atskiro bandymo ir kiekvieno kartotinio bandinio matavimų duomenys, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, audinio gyvybingumo procentinę dalį, vidutinę audinio gyvybingumo procentinę dalį ir standartinį nuokrypį;

— jei tinka, kontrolinių ėminių, naudotų tiesioginiams MTT reduktoriams ir (arba) spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, rezultatai, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, % NSMTT, % NSS_{gyv}, % NSS_{negyv}, SN ir galutinę tikslią audinio gyvybingumo procentinę dalį;

— rezultatai gauti bandomajai (-ioms) cheminei (-ėms) medžiagai (-oms) ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms, atsižvelgiant į nustatytus atskiro bandymo ir bandymo priimtinumo kriterijus;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;

— gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

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. Pateikta 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. Pateikta 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) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.

(5) Šio priedo B.40 skyrius. Odos suardymas *in vitro*. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas.

(6) Šio priedo B.40bis skyrius. Odos ėsdinimas *In Vitro*. Rekonstruoto žmogaus epidermio (RHE) bandymo metodas.

(7) Šio priedo B.65 skyrius, *In Vitro* odos ėsdinimo naudojant membraninę pertvarą metodas.

(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. Pateikta 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. Tai pradiniai naudojimo charakteristikų standartai, naudoti dviem bandymo metodams patvirtinti. Šie naudojimo charakteristikų standartai nebeturėtų būtų naudojami, nes šiuo metu yra prieinama atnaujinta versija (8).*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Pateikta [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. Tai dabartinė ECVAM naudojimo charakteristikų standartų versija, atnaujinta 2009 m. atsižvelgiant į JT GHS įgyvendinimą. Šie naudojimo charakteristikų standartai nebeturėtų būtų naudojami, nes šiuo metu yra prieinama atnaujinta versija (8).*

(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) Europos Komisija (2001). 2001 m. rugpjūčio 6 d. Komisijos direktyva 2001/59/EB, dvidešimt aštuntą kartą derinanti su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo, *Europos Sąjungos oficialusis leidinys* L 225, 1–333.

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas– bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (9).

Ląstelių gyvybingumas– bendrojo ląstelių populiacijos aktyvumo, pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių gebėjimo redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlynąjį), matavimo parametras, kuris, atsižvelgiant į matuojamą vertinamąją baigtį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių gyvųjų ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Sutapimas– bandymo modelių, kuriais gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (9).

ET_{50}– gali būti įvertinta kaip ekspozicijos trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamąja chemine medžiaga, taip pat žr. IC_{50}.

GHS (Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema)– sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

HPLC– efektyvioji skysčių chromatografija.

IATA– integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

IC_{50}– gali būti įvertinta nustatant palyginamosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuriai esant audinių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC_{50}) po tam tikros ekspozicijos trukmės, taip pat žr. ET_{50}.

Neribota dozė– ant *epidermio* dedamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai padengti *epidermio* paviršių.

Mišinys– dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga– medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

MTT– 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Daugiakomponentė medžiaga– medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NSS_{negyv}– negyvų audinių nespecifinė spalva.

NSS_{gyv}– gyvųjų audinių nespecifinė spalva.

NSMTT– nespecifinė MTT redukcija.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS)– patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (9).

Teigiamas kontrolinis (PC) ėminys– kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas– santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (9).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (9).

Pakaitinis bandymas– bandymas, kuris skirtas pakeisti bandymą, paprastai naudojamą ir pripažintą tinkamu pavojui identifikuoti ir (arba) rizikai vertinti, ir kuris nustatytas kaip užtikrinantis lygiavertę ar geresnę žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą, kaip tinka, palyginti su pripažintu bandymu esant visoms įmanomoms bandymo aplinkybėms ir cheminėms medžiagoms (9).

Atskiras bandymas– vienos arba daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas vienu metu su neigiamu kontroliniu ėminiu ir teigiamu kontroliniu ėminiu.

Jautris– visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Odos dirginimas *in vivo* – grįžtamasis odos pažeidimas po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo trumpiau kaip 4 valandoms. Odos dirginimas yra vietinis paveiktos odos audinio atsakas ir atsiranda greitai po stimuliavimo (38). Jo priežastis – vietinis uždegiminis atsakas, įsitraukiant įgimtai (nespecifinei) odos audinio imuninei sistemai. Jo pagrindinė savybė – grįžtamasis procesas vykstant uždegiminiams atsakams ir esant su uždegiminiu procesu susijusiems būdingiems klinikiniams dirginimo požymiams (eritemai, edemai, niežėjimui ir skausmui).

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Medžiaga – natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UPLC – ypač efektyvi skysčių chromatografija.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

2 priedėlis

BANDYMO MODELIAI, ĮTRAUKTI Į ŠĮ BANDYMO METODĄ

Nr.	Bandymo modelio pavadinimas	Patvirtinimo tyrimo tipas	Nuorodos
1	EpiSkin™	Išsamus perspektyvusis patvirtinimo tyrimas (2003–2007 m.). Šio modelio komponentai buvo naudojami pradinio ir atnaujinto ECVAM PS bandymo metodo komponentams nustatyti (39) (40) (21) (*). Be to, metodo duomenys, susiję su neklasifikuojamų ir klasifikuojamų medžiagų identifikavimu, buvo pagrindiniai duomenys nustatant pradinio PS specifiškumo ir jautrio vertes (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*original*): Iš pradžių buvo atliktas bandymo modelio išsamus perspektyvusis patvirtinimo tyrimas kartu su Nr. 1, tirtu 2003–2007 m. Šio modelio komponentai buvo naudojami pradinio ir atnaujinto ECVAM PS bandymo metodo komponentams nustatyti (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Modifikuotas pradinis EpiDerm™ buvo patvirtintas naudojant pradinius ECVAM PS (21) 2008 m. (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Patvirtinimo tyrimas, pagrįstas pradiniais ECVAM naudojimo charakteristikų standartais (21) 2008 m. (*)	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Patvirtinimo tyrimas (2011–2012 m.), pagrįstas EBPO TG 439 naudojimo charakteristikų standartais (8), kurie yra pagrįsti atnaujintais ECVAM PS (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) ir šių TG PS (8) (*)

(*) Pradiniai ECVAM naudojimo charakteristikų standartai (PS) (21) buvo sukurti 2007 m. baigus perspektyvųjį patvirtinimo tyrimą (16), kuriame buvo vertinamas bandymo modelių Nr. 1 ir 2 veiksmingumas pagal klasifikavimo sistemą, aprašyta ES Pavojingų medžiagų direktyvos 28 keitinyje (41). 2008 m. įvedus JT GHS (1) ir ES CLP, klasifikuojamų ir neklasifikuojamų medžiagų atskyrimo ribinė vertė tuo pačiu buvo paslinkta nuo *in vivo* balo 2.0 iki 2.3. Siekiant prisitaikyti prie šio iš dalies pakeisto reglamentavimo reikalavimo, 2009 m. buvo atnaujintos ECVAM PS tikslumo vertės ir etaloninių cheminių medžiagų sąrašas (2) (39) (40). Pradinis ir atnaujintas PS buvo daugiausia pagrįsti modelių Nr. 1 ir 2 (16) duomenimis, bet papildomai naudoti duomenys apie etalonines chemines medžiagas iš modelio Nr. 3. Atnaujintas ECVAM PS buvo naudojamas 2010 m. nustatant su šiomis TG susijusį PS (8). Šiame bandymo metode PPM laikomas EpiSkin™ dėlto, kad jis buvo naudojamas kuriant visus PS kriterijus. Išsami informacija apie patvirtinimo tyrimus, duomenų rinkimą ir su JT GHS ir CLP įgyvendinimu susijusių būtinų PS pakeitimų pagrindimas yra pateikta atitinkamų EBPO TG 439 ECVAM/BfR aiškinamajame informaciniame dokumente (23).SIT: odos dirginimo bandymas (angl. *Skin Irritation Test*);

RHE: rekonstruotas žmogaus epidermis (angl. *Reconstructed Human Epidermis*).

3 priedėlis

Į ŠĮ BANDYMO METODĄ ĮTRAUKTŲ BANDYMO MODELIŲ SPECIFINIAI PROTOKOLO PARAMETRAI

RhE modelių protokolai yra labai panašūs, visų pirma visi naudoja 42 h inkubavimo po apdorojimo laikotarpį (32) (33) (34) (35). Skiriasi iš esmės trys parametrai, susiję su bandymų modelių skirtingomis apsauginėmis funkcijomis, būtent: A) parengiamojo inkubavimo trukmė ir tūris, B) bandomųjų cheminių medžiagų uždėjimas ir C) tūris po inkubavimo.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Parengiamasis inkubavimas				
Inkubavimo trukmė	18–24 h	18–24 h	< 2 h	15–30 h
Vidutinis tūris	2 ml	0,9 ml	0,3 ml arba 1 ml	0,5 ml
B) Bandomosios cheminės medžiagos uždėjimas				
Skysčiai	10 µl (26 µl/cm^2)	30µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Kietosios medžiagos	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DV (10µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25µl)
Nailono tinklelio naudojimas	Nenaudojamas	Jei būtina	Naudojamas	Nenaudojamas
Suminė uždėjimo trukmė	15 min	60 min	42 min	15 min
Uždėjimo temperatūra	T_{kamb}	a) T_{kamb}, 25 min b) 37 °C, 35 min	T_{kamb}	T_{kamb}
C) Tūris po inkubavimo				
Vidutinis tūris	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Didžiausiasis priimtinas kintamumas				
Audinio kartotinių bandinių standartinis nuokrypis	SN18	SN18	SN18	SN18

T_{kamb}: kambario temperatūra;
DV: distiliuotas vanduo;
DPBS: Dulbecco fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale.

4 priedėlis

HPLC ARBA UPLC IR SPEKTROFOTOMETRIJOS SISTEMOS, SKIRTOS IŠ RHE AUDINIO EKSTRAHUOTAM MTT FORMAZANUI MATUOTI, TINKAMUMO ĮVERTINIMO PAGRINDINIAI PARAMETRAI IR PRIIMTINUMO KRITERIJAI

Parametras	Protokolas, parengtas pagal FDA rekomendacijas (36) (37)	Priimtinumo kriterijai
Atrankumas	Izopropanolio, gyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų gyvųjų audinių izopropanolio ekstrakto), negyvų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų negyvų audinių izopropanolio ekstrakto) analizė	$Plotas_{trukdžių} \leq 20\ \%\ Plotas_{LLOQ}$ (1)
Preciziškumas	Kokybės kontrolės ėminiai (t. y. MTT formazano 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ir 160 µg/ml tirpalas) izopropanolyje (n = 5)	VK ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Tikslumas	Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	% Nuokr. ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Matricos efektas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 5)	85 % ≤ matricos efektas % ≤ 115 %
Pernaša	Izopropanolio analizė po ULOQ (2) etaloninio tirpalo	$Plotas_{trukdžių} \leq 20\ \%\ Plotas_{LLOQ}$
Atkuriamumas (vienos dienos)	3 nepriklausomos kalibravimo kreivės (gautos nuosekliai skiedžiant 6 kartus MTT formazaną izopropanolyje santykiu 1/3, pradedant ULOQ, t.y. 200 µg/ml); Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	Kalibravimo kreivės: % Nuokr. ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Atkuriamumas (tarp dienų)	1 diena:: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 2 diena:: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 3 diena:: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3)	Kokybės kontrolės ėminiai: % Nuokr. ≤ 15 % ir VK ≤ 15 %
MTT formazano RhE audinio ekstrakte trumpalaikis stabilumas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po 24 h laikymo kambario temperatūroje	% Nuokr. ≤ 15 %
MTT formazano RhE audinio ekstrakte ilgalaikis stabilumas, jei reikia	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po kelių laikymo tam tikroje temperatūroje (pvz., 4 °C, −20 °C, −80 °C) dienų	% Nuokr. ≤ 15 %“

(1) LLOQ: apatinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip sudaranti 1–2 % audinio gyvybingumo, t. y. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ – viršutinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip koncentracija, ne mažiau kaip du kartus didesnė nei didžiausia tikėtina MTT formazano koncentracija neigiamų kontrolinių ėminių izopropanolio ekstraktuose, t. y. 200 µg/ml.

8) B dalis papildoma šiais skyriais:

„B.63 **TOKSIŠKUMO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ATRANKOS BANDYMAS**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 421 (2016). EBPO cheminėms medžiagoms bandyti skirtos gairės periodiškai peržiūrimos, atsižvelgiant į mokslo pažangą. Pradinės atrankinio tyrimo bandymo gairės 421 buvo priimtos 1995 m. atsižvelgiant į „Parengiamojo toksiškumo reprodukcijai atrankos bandymo“ protokolą, aptartą dviejuose ekspertų pasitarimuose Londone 1990 m. (1) ir Tokijuje 1992 m. (2).

2. Šis bandymo metodas yra atnaujintas įtraukiant vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, ir jis yra tąsa 1998 m. EBPO iniciatyva pradėto didelės svarbos darbo, skirto peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymo gaires (3). Pavyzdžiui, EBPO TG 407 (28 dienų graužikų kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą, šio priedo B.7 skyrius) buvo išplėstos 2008 m., įtraukiant parametrus, tinkamus bandomųjų cheminių medžiagų endokrininiam aktyvumui aptikti. TG 421 atnaujinimo tikslas buvo įtraukti kai kurias vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, į atrankai skirtas bandymo gaires, kai ekspozicijos laikotarpiai aprėpia kai kuriuos jautrius vystymosi laikotarpius (prenatalinius ar ankstyvuosius postnatalinius laikotarpius).

3. Į TG 421 buvo įtrauktos pasirinktos papildomos vertinamosios baigtys, susijusios su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, taip pat TG 443 (Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas, šio priedo B.56 skyrius) dalis, atsižvelgiant į galimybių studiją, susijusią su baigčių įtraukimo moksliniais ir techniniais klausimais, taip pat su jų įtraukimo į tyrimą bandymų schemos reikiamais pakeitimais (4).

4. Šis bandymo metodas skirtas gauti ribotai informacijai apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį patinų ir patelių reprodukcijos charakteristikoms, pvz., lytinių liaukų funkcijai, poravimosi elgesiui, apvaisinimui, vystymuisi ir palikuonių atsivedimui. Jis nėra esamų B.31, B.34, B.35 arba B.56 bandymo metodų alternatyva arba pakeitimas.

PRADINIAI ASPEKTAI

5. Šis atrankos bandymo metodas gali būti taikomas, jei reikia gauti pradinę informaciją apie galimą poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi pradiniame cheminių medžiagų toksikologinių savybių vertinimo etape arba apie susirūpinimą keliančias chemines medžiagas. Jis taip pat gali būti taikomas kaip esamų cheminių medžiagų, apie kurias yra labai mažai toksikologinės informacijos arba jos nėra, pradinių atrankos bandymų rinkinio dalis, kaip dozės intervalo nustatymo tyrimas, atliekant išsamesnius reprodukcijos ir (arba) vystymosi tyrimus, arba jei laikoma, kad jis galėtų tikti. Atliekant tyrimą reikėtų vadovautis pagrindiniais principais ir aspektais, pateiktais EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl saugos įvertinimui naudojamų bandymo gyvūnų klinikinių požymių, kaip humaniško poveikio vertinamųjų baigčių, atpažinimo, vertinimo ir naudojimo (5).

6. Taikant šį bandymo metodą negaunama išsamios informacijos apie visus reprodukcijos ir vystymosi aspektus. Visų pirma, jis suteikia tik ribotas prenatalinės ekspozicijos postnatalinių reiškinių arba postnatalinės ekspozicijos metu galimai sukelto poveikio aptikimo priemones. Dėl (be kitų priežasčių) palyginti nedidelio gyvūnų skaičiaus dozių grupėse, vertinamųjų baigčių atrankumo ir trumpos tyrimo trukmės šiuo metodu nebus gauta įrodymų, kad būtų galima tvirtai pareikšti apie poveikio nebuvimą. Be to, nesant kitų toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi bandymų duomenų, teigiami rezultatai yra naudingi pradiniam pavojingumo vertinimui ir padeda priimti sprendimus dėl papildomų bandymų būtinumo ir trukmės.

7. Rezultatus, gautus taikant su endokrinine sistema susijusius parametrus, reikėtų vertinti atsižvelgiant į EBPO konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (6). Patobulintos EBPO TG 421 pagal šią konceptualią sistemą yra 4 lygmens *in vivo* bandymas, kuriuo gaunami duomenys apie neigiamą poveikį su endokrinine sistema susijusioms vertinamosioms baigtims. Tačiau vien tik pats endokrininės sistemos signalas negali būti laikomas pakankamu įrodymu, kad bandomoji cheminė medžiaga yra endokrininę sistemą ardanti medžiaga.

8. Taikant šį bandymo metodą, bandomoji cheminė medžiaga duodama per burną. Gali prireikti pakeitimų, jei naudojami kiti ekspozicijos būdai.

9. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

10. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Kelioms patinų ir patelių grupėms duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės. Patinai turėtų gauti dozę ne trumpiau kaip keturias savaites, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą (tai sudaro ne mažiau kaip dvi savaitės iki poravimosi, poravimosi laikotarpis ir maždaug dvi savaitės po poravimosi). Atsižvelgiant į ribotą dozės davimo patinams laikotarpį, vaisingumas gali ir nebūti tam tikras jautrus toksiškumo sėklidėms rodiklis. Todėl svarbu atlikti išsamų histologinį sėklidžių tyrimą. Manoma, kad dviejų savaičių prieš poravimąsi dozės davimo laikotarpio ir vėlesnių poravimosi ir (arba) vaisingumo stebėjimo rezultatų derinio, esant ne trumpesniam kaip keturių savaičių bendrajam dozės davimo laikotarpiui, ir toliau atlikto išsamaus patinų lytinių liaukų histopatologijos tyrimo pakanka, kad būtų galima aptikti daugumą patinų vaisingumui ir spermatogenezei įtaką darančių veiksnių.

12. Patelės turėtų gauti dozę visą tyrimo laikotarpį. Jį sudaro dvi savaitės iki poravimosi (turint tikslą aprėpti bent du pilnus rujos ciklus), skirtingas laikas iki apvaisinimo, vaikingumo trukmė ir mažiausiai trylika dienų po atsivedimo, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą.

13. Tyrimo trukmė po aklimatizavimo ir rujos ciklo įvertinimo prieš dozės davimą, priklauso nuo patelių vaisingumo ir yra maždaug 63 dienos (mažiausiai 14 dienų prieš poravimąsi (iki) 14 dienų poravimasis, 22 dienų vaikingumas, 13 dienų žindymas).

14. Dozės davimo laikotarpiu gyvūnai atidžiai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

15. Taikant šį bandymo metodą numatyta naudoti žiurkes. Jei šiam bandymo metodui nurodyti parametrai tiriami naudojant kitą graužikų rūšį, turėtų būti pateiktas išsamus pagrindimas. Vykdant tarptautinę patvirtinimo programą endokrininę sistemą ardančioms medžiagoms aptikti pagal EBPO TG 407 (atitinka šio priedo B.7 skyrių), vienintelė naudota rūšis buvo žiurkės. Neturėtų būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms dažnai pasireiškia vystymosi defektai. Reikėtų naudoti sveikus neapvaisintus gyvūnus, kurie nebuvo naudojami anksčiau atliekant bandymo procedūras. Reikėtų apibūdinti bandymo gyvūnų rūšį, veislę, lytį, masę ir amžių. Tyrimo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir ne didesnis kaip 20 % kiekvienos lyties gyvūno vidutinės masės. Jei tyrimas atliekamas kaip ilgalaikio ar visos kartos tyrimo parengiamasis tyrimas, būtų gerai abiems tyrimams naudoti tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnus.

Laikymas ir šėrimas

16. Visos procedūros turėtų atitikti vietinius laboratorinės gyvūnų priežiūros reikalavimus. Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina, kad būtų ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų stengtis, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, 12 h dienos šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, duodamą pagal šį metodą.

17. Gyvūnai turėtų būti apgyvendinti nedidelėmis tos pačios lyties grupėmis; gyvūnus galima laikyti atskirai, jei tai būtų moksliškai pagrįsta. Laikant grupėmis, viename narvelyje turėtų būti ne daugiau kaip penki gyvūnai. Poravimo procedūros turėtų būti atliekamos šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Vaikingos patelės turėtų būti laikomos atskiruose narveliuose ir turėti gūžtai įsirengti būtinų medžiagų. Žindančios patelės laikomos atskiruose narveliuose su savo palikuoniais.

18. Pašarus reikėtų nuolat analizuoti dėl teršalų buvimo. Pašaro ėminys turėtų būti saugomas, kol bus parengta ataskaita.

Gyvūnų ruošimas

19. Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu suskirstomi į kontrolines ir apdorojamas grupes. Narvelius reikėtų išdėstyti taip, kad narvelio vietos įtaka būtų kiek įmanoma mažesnė. Gyvūnai unikaliai identifikuojami ir ne mažiau kaip penkias paras iki tyrimo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Dozių ruošimas

20. Bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama duoti per burną, nebent būtų laikoma, kad labiau tinka kiti davimo būdai. Jei pasirenkamas davimo per burną būdas, bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per zondą, tačiau bandomąsias chemines medžiagas galima duoti su pašaru arba geriamuoju vandeniu.

21. Jei būtina, bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama tinkamame nešiklyje arba ruošiama jos suspensija. Rekomenduojama pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, jei įmanoma, vėliau svarstyti galimybę naudoti tirpalą arba emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų) ir tik tada naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jei nešiklis yra ne vanduo, turėtų būti žinomos jo toksiškumo charakteristikos. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir vienalytiškumą nešiklyje.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

22. Rekomenduojama kiekvienos grupės bandymą pradėti turint ne mažiau kaip 10 patinų ir 12–13 patelių. Prieš ekspozicijos pradžią įvertinamas patelių rujos ciklišKumas, ir gyvūnai, kurių ciklas nėra 4–5 dienos, neįtraukiami į tyrimą, todėl rekomenduojama turėti papildomų patelių, kad kiekvienoje grupėje liktų 10 patelių. Manoma, kad, išskyrus aiškaus toksinio poveikio atvejį, kiekvienoje grupėje bus mažiausiai 8 vaikingos patelės, ir tai paprastai yra mažiausias priimtinas vaikingų patelių skaičius kiekvienoje grupėje. Tikslas yra gauti pakankamą vaikingų patelių ir palikuonių skaičių, kad būtų galima pagrįstai įvertinti bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą daryti poveikį vaisingumui, vaikingumui, patelės ir žindomo palikuonio elgesiui bei F_1 kartos palikuonių augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki 13 paros po atsivedimo.

Dozavimas

23. Paprastai turėtų būti ne mažiau kaip trys bandymo grupės ir viena kontrolinė grupė. Dozių dydžiai gali būti pagrįsti informacija, gauta atliekant ūmaus toksiškumo bandymus, arba kartotinės dozės tyrimų rezultatais. Išskyrus apdorojimą bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinių grupių gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su apdorojimo grupių gyvūnais. Jeigu duodant bandomąją cheminę medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti didžiausią naudotą nešiklio kiekį.

24. Dozių dydžiai turėtų būti pasirinkti atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Taip pat reikėtų atsižvelgti į tai, kad vaikingų ir neapvaisintų gyvūnų jautrumas gali skirtis. Didžiausiąją dozę reikėtų pasirinkti turint tikslą sukelti toksinį poveikį, bet ne gyvūno žūtį ar stiprias kančias. Toliau reikėtų pasirinkti mažėjančių dozės dydžių seką, siekiant parodyti su dozavimu susijusį atsaką ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), esant mažiausiai dozei. Mažėjančių dozių dydžiams nustatyti paprastai yra optimalūs dozių skirtumo intervalai nuo dviejų iki keturių kartų, ir dažnai vietoj didelių intervalų tarp dozavimų (pvz., daugiau kaip 10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymo grupę.

25. Jei stebimas bendrasis toksiškumas (pvz., mažesnė kūno masė, poveikis kepenims, širdžiai, plaučiams arba inkstams ir kt.) arba kiti pakitimai, kurie gali nebūti toksiškumo atsakais (pvz., mažesnis pašaro vartojimas, kepenų padidėjimas), stebimas poveikis jautrioms endokrininės sistemos vertinamosioms baigtims turėtų būti aiškinamas atsargiai.

Ribinis bandymas

26. Jei atliekant per burną duodamos vieno dydžio dozės tyrimą pagal šiam tyrimui aprašytas procedūras, duodama ne mažesnė kaip 1 000 mg/kg kūno masės per parą dozė arba, jei duodama su pašaru ar geriamuoju vandeniu, atitinkamą pašaro ar geriamo vandens procentinę dalį sudaranti dozė nesukelia pastebimo toksinio poveikio ir jei toksinio poveikio nesitikima, atsižvelgiant į giminingos struktūros medžiagoms gautus duomenis, visas bandymas naudojant kelių dydžių dozes gali būti nebūtinas. Ribinis bandymas atliekamas, išskyrus atvejus, kai žmonių ekspozicijos būdas rodo, kad per burną duodamos dozės turi būti didesnės. Jei duodama kitais būdais, pvz., įkvepiama arba dedama ant odos, didžiausią galimą koncentraciją dažnai gali lemti bandomųjų cheminių medžiagų fizikinės ir cheminės savybės.

Dozių davimas

27. Gyvūnai gauna bandomosios cheminės medžiagos dozę kasdien 7 dienas per savaitę. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama viena dozė per skrandžio zondą arba per tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausiasis gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukelia sunkesnį poveikį, bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kiek įmanoma mažesnis keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų vienodas.

28. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru ar geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios cheminės medžiagos kiekiai nekeltų trukdžių normaliai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti pastovią koncentraciją pašaruose (ppm) arba pastovaus dydžio dozę pagal gyvūno kūno masę; pasirinktą variantą reikėtų nurodyti. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir koreguojama mažiausiai kartą per savaitę pastoviam dozės ir gyvūno kūno masės santykiui užtikrinti.

Bandymo tvarkaraštis

29. Dozes reikėtų pradėti duoti abiejų lyčių gyvūnams ne vėliau kaip 2 savaites prieš poravimąsi, po to, kai jie buvo aklimatizuojami ne trumpiau kaip penkias dienas, ir patelės atrinktos pagal normalius rujos ciklus (2 savaičių laikotarpiu prieš apdorojimą). Tyrimo tvarkaraštis turėtų būti sudarytas taip, kad rujos ciklo įvertinimas prasidėtų netrukus po to, kai gyvūnai pasiekia visišką lytinę brandą. Jos laikas gali šiek tiek skirtis skirtingoms žiurkių veislėms skirtingose laboratorijose, pvz., *Sprague Dawley* žiurkės subręsta 10 savaičių amžiaus, *Wistar* žiurkės – maždaug 12 savaičių amžiaus. Pateles su palikuoniais reikėtų numarinti 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau. Gimimo diena (t. y., kai baigiama atsivesti) nustatoma kaip 0 diena po atsivedimo. Patelės, kurios nerodo poravimosi požymių, numarinamos po 24–26 dienų nuo paskutinės poravimosi laikotarpio dienos. Dozės toliau duodamos abiejų lyčių gyvūnams visą poravimosi laikotarpį. Patinams reikėtų duoti dozę po poravimosi laikotarpio ne trumpiau kaip iki viso 28 dienų dozavimo laikotarpio pabaigos. Patinai numarinami arba, jei manoma, kad juos galima poruoti dar kartą, paliekami ir jiems toliau duodama dozė.

30. Dozės turėtų būti duodamos motininėms patelėms kasdien visą vaikingumo laikotarpį ir ne trumpiau kaip iki 13 dienos po atsivedimo, įskaitant ir tą dieną, arba likus dienai iki numarinimo. Jei tyrimai atliekami bandomąją cheminę medžiagą duodant įkvėpti arba ją dedant ant odos, dozė turėtų būti duodama ne trumpiau kaip iki 19 dienos nuo vaikingumo pradžios, įskaitant ją, ir davimą reikėtų atnaujinti kiek įmanoma greičiau, bet ne vėliau kaip 4 dieną po atsivedimo (PND).

31. Bandymo tvarkaraščio schema pateikta 2 priedėlyje.

Poravimo procedūra

32. Atliekant šį tyrimą paprastai reikėtų poruoti 1:1 (vienas patinas ir viena patelė). Išimčių gali būti dėl atsitiktinai žuvusių patinų. Patelė turėtų būti laikoma su tuo pačiu patinu tol, kol atsiranda poravimosi požymiai, arba praeina dvi savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. 0 vaikingumo diena apibrėžiama kaip diena, kurią patvirtinamas poravimosi faktas (randamas makšties kamštis arba spermos). Jei poravimas nesėkmingas, galima būtų spręsti dėl pakartotino patelių poravimo su patikrintais tos pačios grupės patinais.

Vados dydis

33. 4 dieną po atsivedimo kiekvienos vados dydį galima koreguoti, šalinant perteklinius jauniklius atsitiktinės atrankos būdu, kad būtų gautas kiek įmanoma vienodesnis keturių ar penkių vienos lyties jauniklių vienai vadai skaičius, priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio. Reikėtų paimti dviejų perteklinių jauniklių kraujo ėminius, juos sujungti ir naudoti serumo T4 koncentracijos nustatymui. Atrankusis jauniklių šalinimas, pvz., pagal kūno masę arba anogenitalinį atstumą (AGD), netinka. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis ar penkis kiekvienos lyties jauniklius, priimtinas dalinis jauniklių skaičiaus koregavimas (pvz., šeši patinai ir keturios patelės). Jaunikliai nešalinami, kai vados dydis yra mažesnis nei brokavimo tikslinė vertė (8 ar 10 jauniklių vienai vadai). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei brokavimo tikslinė vertė, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

34. Jei vados dydis nekoreguojamas, du jaunikliai vienai vadai numarinami 4 dieną po gimimo ir imami jų kraujo ėminiai serumo skydliaukės hormono koncentracijai matuoti. Jei įmanoma, šie du žiurkiukai vienai vadai turėtų būti patelės, kad žiurkiukus patinus būtų galima pasilikti spenelių išsaugojimo įvertinimui, išskyrus atvejus, kai pašalinus šias pateles jų nelieka vertinimui tyrimo pabaigoje. Jaunikliai nešalinami, jei vados dydis būtų mažesnis kaip 8 ar 10 jauniklių vienai vadai (priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei normalioje vadoje, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

Gyvų gyvūnų stebėjimo rezultatai

Klinikiniai stebėjimai

35. Visą bandymo laikotarpį reikėtų atlikti bendruosius klinikinius stebėjimus bent kartą per dieną ir dažniau, jei stebimi toksiškumo požymiai. Juos pageidautina atlikti kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsusio atsivedimo požymius ir visus toksiškumo požymius, įskaitant gaištamumą. Į šiuos registruojamus duomenis reikėtų įtraukti toksiškumo požymių pradžios laiką, laipsnį ir trukmę.

Kūno masė ir pašaro bei vandens suvartojimas

36. Patinus ir pateles reikėtų sverti pirmąją dozės davimo dieną, ne rečiau kaip kas savaitę vėliau ir tyrimo pabaigoje. Vaikingumo laikotarpiu pateles reikėtų sverti 0, 7, 14 ir 20 dieną ir per 24 valandas po atsivedimo (0 arba 1 diena po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Šie rezultatai turėtų būti pateikiami ataskaitoje atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną.

37. Pašaro suvartojimą prieš poravimąsi, vaikingumo ir žindymo metu reikėtų matuoti mažiausiai kartą per savaitę. Pašaro suvartojimo poravimosi metu matuoti nebūtina. Vandens suvartojimas šiais laikotarpiais taip pat turėtų būti matuojamas, kai bandomoji cheminė medžiaga yra duodama su geriamuoju vandeniu.

Rujos ciklai

38. Rujos ciklus reikėtų stebėti prieš apdorojimo pradžią, kad tyrimui būtų atrinktos patelės, turinčios reguliarų ciklišKumą (žr. 22 pastraipą). Makšties tepinėlius taip pat reikėtų stebėti kasdien nuo apdorojimo laikotarpio pradžios iki poravimosi įrodymų gavimo. Jei yra susirūpinimas dėl ūminio streso poveikio, kuris galėtų pakeisti rujos ciklus pradėjus duoti dozes, laboratorijos gali veikti bandymo gyvūnus medžiaga 2 savaites, tada kasdien imti makšties tepinėlius, kad rujos ciklas būtų stebimas mažiausiai dvi savaites prieš poravimosi laikotarpį ir stebėjimas tęsiamas poravimosi laikotarpiu iki poravimosi įrodymų gavimo. Makšties ar gimdos kaklelio ląsteles reikėtų imti atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir tokiu būdu nebūtų sukeltas netikras vaikingumas (7) (8).

Palikuonių parametrai

39. Gestacijos trukmė turėtų būti registruojama ir pradedama skaičiuoti nuo 0 vaikingumo dienos. Kiekviena vada turėtų būti apžiūrėta kiek įmanoma greičiau po atsivedimo siekiant nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, gimusių negyvų ir gimusių gyvų jauniklių skaičių, silpnuosius jauniklius (jauniklius, kurie yra gerokai mažesni už atitinkamus kontrolinius jauniklius) ir dideles anomalijas.

40. Gyvi jaunikliai turėtų būti suskaičiuojami ir jų lytis nustatoma per 24 h nuo atsivedimo (0 dieną arba 1 dieną po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Be 35 pastraipoje aprašytų stebėjimų, reikėtų registruoti visus jauniklių nenormalaus elgesio pasireiškimus.

41. Kiekvieno jauniklio anogenitalinis atstumas (AGD) turėtų būti matuojamas tą pačią dieną po gimimo tarp PND 0 ir PND 4. Jauniklio kūno masės duomenis reikėtų gauti tą pačią dieną, kurią matuojamas AGD, ir AGD turėtų būti norminamas pagal jauniklio dydį, ir būtų gerai, kad AGD būtų lygus kubinei šakniai iš kūno masės (9). Jauniklių patinų spenelius ir (arba) areoles reikėtų suskaičiuoti PND 12 arba 13 dieną, kaip rekomenduojama EBPO GD 151 (10).

Klinikinė biochemija

42. Kraujo ėminiai iš nustatytos vietos imami pagal tokį tvarkaraštį:

— ne mažiau kaip dviejų jauniklių vienai vadai 4 dieną po gimimo, jei pakanka jauniklių skaičiaus (žr. 33–34 pastraipas)

— visų patelių, ne mažiau kaip dviejų jauniklių vienai vadai 13 dieną tyrimo pabaigoje, ir

— visų suaugusių patinų tyrimo pabaigoje.

Visi kraujo ėminiai laikomi tinkamomis sąlygomis. 13 dienų jauniklių ir suaugusių patinų kraujo ėminiai vertinami dėl skydliaukės hormonų (T4) koncentracijos serume. Papildomai nustatomas T4 kiekis patelių ir 4 dienų jauniklių kraujo ėminiuose, jei reikia. Be to, galima pasirinkti matuoti kitus hormonus, jei tinka. Vienos vados jauniklių kraujo ėminius galima sujungti atliekant skydliaukės hormonų analizę. Skydliaukės hormonus (T4 ir TSH) reikėtų matuoti kaip „suminį kiekį“.

43. Hormonų nustatymo rezultatų kintamumui ir absoliučiajai koncentracijai gali turėti įtakos šie veiksniai:

— numarinimo laikas – dėl hormonų koncentracijos kitimo paros metu;

— numarinimo būdas, siekiant išvengti per didelio streso, galinčio turėti įtakos hormonų koncentracijai,

— hormonų nustatymui skirti bandymo rinkiniai, kuriais gautos kalibravimo kreivės gali skirtis.

44. Hormonų nustatymui specialiai skirti plazmos ėminiai turėtų būti imami panašiu dienos metu. Naudojant įvairius prekyboje esančius bandymo rinkinius, skiriasi gautos analizuojamų hormonų koncentracijos skaitinės vertės.

Patologija

Bendroji nekroskopija

45. Reikėtų atlikti numarintų arba tyrimo metu nugaišusių suaugusiųjų gyvūnų makroskopinį tyrimą anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas reprodukcijos sistemos organams. Reikėtų registruoti implantacijos vietų skaičių. Makšties tepinėliai turėtų būti tiriami skrodimo dienos ryte, kad būtų galima nustatyti rujos ciklo stadiją ir koreliaciją su kiaušidžių histopatologija.

46. Nuo visų suaugusiųjų patinų sėklidžių, sėklidžių prielipų, taip pat prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis, kaip visumos, reikėtų pašalinti visus priaugusius audinius, jei yra, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti drėgnos būsenos, kad būtų išvengta džiūvimo. Be to, papildomai galėtų būti nustatoma patinų išangės pakeliamojo ir stormeninio akytkūnio raumens, abiejų Kuperio liaukų ir varpos galvos masė, patelių – porinių kiaušidžių (drėgno organo masė) ir gimdos (įskaitant gimdos kaklelį) masė; jei šios masės įtraukiamos, jos turėtų būti nustatytos kuo greičiau po skrodimo.

47. Negyvi jaunikliai ir 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau numarinti jaunikliai turėtų būti bent kruopščiai apžiūrėti išoriškai dėl didelių anomalijų. Ypatingą dėmesį reikėtų atkreipti į išorinius lytinio dauginimosi organus, kuriuos reikėtų ištirti dėl pakitusio vystymosi požymių. 13 dieną reikėtų konservuoti iš 1 patino ir 1 patelės vienai jauniklių vadai paimtą skydliaukę.

48. Reikėtų konservuoti visų suaugusiųjų gyvūnų kiaušides, sėklides, papildomus lytinius organus (gimdą ir gimdos kaklelį, sėklidžių prielipus, prostatą ir sėklines pūsleles, plius koaguliatorių liaukas), skydliaukę ir visus organus, turinčius makroskopinių pažeidimų. Atliekant įprastinį sėklidžių ir sėklidžių prielipų tyrimą, nerekomenduojama fiksuoti formaline. Šiems audiniams priimtinas fiksavimo metodas yra Bouino arba modifikuotojo Davidsono fiksatyvo naudojimas (11). Abu *tunica albuginea* galus galima atsargiai ir negiliai pradurti adata, kad fiksatyvas galėtų greitai prasiskverbti.

Histopatologija

49. Reikėtų atlikti didžiausiąją dozę gavusios ir kontrolinės grupės gyvūnų kiaušidžių, sėklidžių ir sėklidžių prielipų išsamų histologinį tyrimą (ypač kreipiant dėmesį į spermatogenezės stadijas ir sėklidžių intersticinių ląstelių struktūros histopatologiją). Jei būtina, galima tirti kitus konservuotus audinius, įskaitant jauniklių ir suaugusiųjų gyvūnų skydliaukę. Atlikus fiksavimą, galėtų būti nustatyta skydliaukės masė. Valyti (apipjaustyti) taip pat reikėtų labai atsargiai ir tik atlikus fiksavimą, kad nebūtų pažeistas audinys. Pažeidus audinį gali būti gauti netikslūs histopatologinės analizės rezultatai. Jei pakitimai nustatomi didžiausiąją dozę gavusioje grupėje, tyrimus reikėtų išplėsti kitų dozavimo grupių gyvūnams. Histopatologinių tyrimų gairėse (11) pateikta išsamios papildomos informacijos apie skrodimą, fiksavimą, pjaustymą ir endokrininių audinių histopatologiją.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

50. Turėtų būti pateikiami atskirų gyvūnų duomenys. Be to, papildomai visus duomenis reikėtų suvesti į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei nurodomas gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų nugaišimo arba humaniško numarinimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, toksinio poveikio požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir toksinio poveikio rimtumą, histopatologinių pakitimų tipai ir visi atitinkami vados duomenys. Lentelės pavidalo suvestinės formatas, kuris pasirodė labai naudingas, kai reikia įvertinti poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, pateiktas 3 priedėlyje.

51. Atsižvelgiant į nedidelę tyrimo apimtį, statistinės analizės kaip reikšmingumo kriterijų nustatymo vertė yra ribota daugeliui vertinamųjų baigčių, ypač reprodukcijos vertinamųjų baigčių. Jei statistiniai tyrimai atliekami, pasirinktas metodas turėtų atitikti tiriamo kintamojo pasiskirstymą ir metodą reikėtų pasirinkti prieš tyrimo pradžią. AGD ir spenelių išlikimo statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados veiksnius. Jei tinka, statistinės analizės vienetas yra vada. Jauniklių kūno masės statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados dydį. Dėl mažo grupės dydžio istorinių kontrolinių ėminių duomenų (pvz., vados dydžio), jei yra, naudojimas taip pat gali būti naudingas kaip pagalbinė priemonė aiškinant tyrimą.

Rezultatų įvertinimas

52. Šio toksiškumo tyrimo rezultatai turėtų būti vertinami atsižvelgiant į stebimą poveikį, nekroskopijos ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinimas aprėpia ryšį tarp bandomosios cheminės medžiagos dozės ir anomalijų buvimo ar nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pažeidimus, nustatytus tikslinius organus, nevaisingumą, klinikines anomalijas, paveiktą reprodukavimo gebą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaištamumui ir visus kitus toksiškumo reiškinius.

53. Dėl trumpo patinų apdorojimo laikotarpio, vertinant poveikį patinų reprodukcijai, sėklidžių ir sėklidžių prielipų histopatologiją reikėtų nagrinėti kartu su vaisingumo duomenimis. Reprodukcijos ir (arba) vystymosi istorinių kontrolinių ėminių duomenų (pvz., vados dydis, AGD, spenelių išlikimas, T4 koncentracija serume), jei yra, naudojimas taip pat gali būti naudingas kaip pagalbinė priemonė aiškinant tyrimą.

54. Siekiant užtikrinti kokybės kontrolę, siūloma rinkti istorinių kontrolinių ėminių duomenis ir apskaičiuoti skaitinių duomenų variacijos koeficientus, ypač parametrų, susijusių su endokrininę sistemą ardančių medžiagų aptikimu. Šie duomenys gali būti naudojami palyginimo tikslais, kai vertinami atliekami tyrimai.

Bandymo ataskaita

55. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

Bandymo gyvūnai:

— naudota rūšis ir (arba) veislė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

— rūšies, jei tai ne žiurkės, pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

— dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;

— duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą ir (arba) jos dėjimą į pašarą, gautą preparato koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) pašare arba geriamajame vandenyje perskaičiavimas į faktinę dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei taikoma,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

— išsamus randomizavimo procedūros brokuojamiems jaunikliams atrinkti procedūros aprašymas, jei brokuojami.

Rezultatai:

— kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai,

— Pašaro ir vandens suvartojimo duomenys, jei yra;

— toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant vaisingumą, nėštumą, ir kitus toksiškumo požymius;

— gestacijos trukmė;

— toksiškas arba kitoks poveikis reprodukcijai, palikuonims, postnataliniam augimui ir kt.;

— klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami);

— suaugusiųjų patelių, kurių rujos ciklas yra normalus arba nenormalus, skaičius ir ciklo trukmė;

— gimusių gyvų jauniklių skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai;

— jauniklio kūno masės duomenys;

— visų jauniklių AGD (ir kūno masė AGD matavimo dieną);

— spenelių išlikimas pas jauniklius patinus;

— 13 dienų jauniklių ir suaugusiųjų patinų skydliaukės hormonų koncentracija (ir patelių bei 4 dienos jauniklių, jei matuojama);

— jauniklių su aiškiai matomais išsigimimais skaičius, išorinių lyties organų bendrasis įvertinimas, silpniausių jauniklių skaičius;

— nugaišimo laikas tyrimo metu arba nurodymas, kad gyvūnas išgyveno iki pabaigos;

— implantacijų skaičius, vados dydis ir vados masė registravimo metu;

— tėvų kartos kūno masės numarinant ir organų masės duomenys;

— nekroskopijos duomenys;

— išsamus histopatologinių rezultatų aprašymas;

— absorbcijos duomenys (jei yra);

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei reikia.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

Rezultatų aiškinimas

56. Atliekant tyrimą gaunami su kartotinėmis dozėmis susijusio toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi vertinimo rezultatai (žr. 5 ir 6 pastraipas). Jis galėtų parodyti, ar būtina atlikti tolesnius tyrimus, ir būti naudojamas kaip gairės rengiant jų schemas. Reikėtų ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 43, kuri padėtų paaiškinti reprodukcijos ir vystymosi rezultatus (12). EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 106 dėl graužikų endokrininių ir reprodukcijos bandymų histologinio įvertinimo (11) pateikiama informacija apie (endokrininių) organų bei makšties tepinėlių paruošimą ir įvertinimą, kuri gali būti naudinga šiam bandymo metodui.

LITERATŪRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.

(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 priedėlis

APIBRĖŽTYS (TAIP PAT ŽR. EBPO REKOMENDACINĮ DOKUMENTĄ 150 (6))

Androgeniškumas - cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus androgeninis hormonas (pvz., testosteronas).

Antiandrogeniškumas - cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus androgeninio hormono (pvz., testosterono) veikimą žinduolio organizme.

Antiestrogeniškumas - cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus estrogeninio hormono (pvz., 17β-estradiolio) veikimą žinduolio organizme.

Antitiroidinis aktyvumas - cheminės medžiagos gebėjimas slopinti natūralaus skydliaukės hormono (pvz., $T_{3)}$ veikimą žinduolio organizme.

Cheminė medžiaga- medžiaga arba mišinys.

Toksiškumas vystymuisi - toksiškumas reprodukcijai, kuris pasireiškia kaip palikuonių pre-, peri-, postnataliniai, struktūriniai ar funkciniai sutrikimai.

Dozavimas - bendrasis terminas, aprėpiantis dozės dydį, jos davimo dažnumą ir trukmę.

Dozė - duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase, per parą tenkančia vienam bandomojo gyvūno kūno masės vienetui (pvz., mg/kg kūno masės per parą), arba pastovia koncentracija pašare.

Akivaizdus toksiškumas- bendrasis terminas, apibūdinantis aiškius toksiškumo požymius, pastebimus davus bandomosios cheminės medžiagos. Šių požymių turėtų pakakti pavojui įvertinti ir jie turėtų būti tokie, kad padidinus duodamą dozę būtų galima tikėtis sunkių toksiškumo požymių stiprėjimo ir galbūt gyvūnų gaišimo.

Vaisingumo sumažėjimas - rodo patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sutrikimus.

Toksinis poveikis patelei - neigiamas poveikis vaikingoms patelėms, kuris pasireiškia būdingai (tiesioginis poveikis) arba nebūdingai (netiesioginis poveikis).

NOAEL - termino *nepastebėto neigiamo poveikio riba* santrumpa. Tai didžiausioji dozė, kurią duodant nepastebima su apdorojimu susijusių neigiamų rezultatų.

Estrogeniškumas - cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus estrogeninis hormonas (pvz., 17β-estradiolis).

Toksiškumas reprodukcijai - rodo neigiamą poveikį palikuoniams ir (arba) patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sumažėjimą.

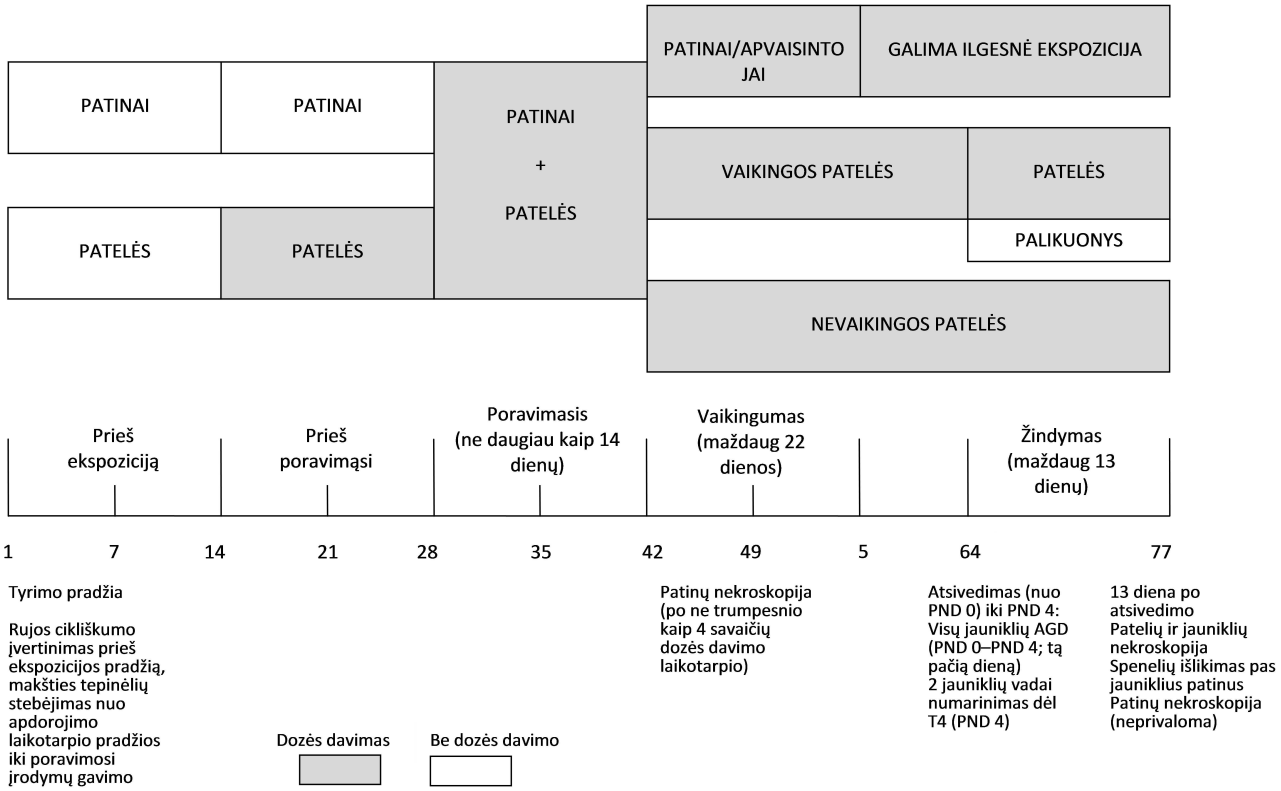
Bandomoji cheminė medžiaga - medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.

Tiroidinis aktyvumas - cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus skydliaukės hormonas (pvz., $T_{3)}$.

Tinkamumo patvirtinimas - mokslinis procesas, skirtas apibūdinti bandymo metodo taikymo charakteristikoms keliamus reikalavimus ir apribojimus bei įrodyti jo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

2 priedėlis

BANDYMO TVARKARAŠČIO SCHEMA, RODANTI DIDŽIAUSIĄJĄ TYRIMO TRUKMĘ, PAGRĮSTĄ VISU 14 DIENŲ PORAVIMOSI LAIKOTARPIU



3 priedėlis

POVEIKIO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ĮVERTINIMO LENTELĖS FORMOS SUVESTINĖ ATASKAITA

STEBĖJIMŲ REZULTATAI	VERTĖS				
Dozavimas (vienetai)	0 (kontrolinis)	…	…	…	…
Porų skaičius pradžioje (skaičius)					
Rujos ciklas (bent vidutinė nereguliariųjų ciklų vidutinė trukmė ir dažnis)					
Patelės, rodančios poravimosi požymius (skaičius)					
Vaikingos patelės (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 1–5 (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 6–...[1] (skaičius)					
Vaikingumas ≤ 21 diena (skaičius)					
Vaikingumas = 22 dienos (skaičius)					
Vaikingumas ≥ 23 dienos (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių 4 dieną po atsivedimo (skaičius)					
Implantai/patelei (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/patelei po atsivedimo (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/patelei 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė AGD matavimo metu (vidutinė patinų, vidutinė patelių)					

STEBĖJIMŲ REZULTATAI	VERTĖS				
Dozavimas (vienetai)	0 (kontrolinis)	…	…	…	…
Jauniklių AGD, matuotas tą pačia dieną – nuo atsivedimo dienos iki 4 dienos (vidutinis patinų, vidutinis patelių, pažymėti dieną po atsivedimo (PND))					
Jauniklių masė 4 dieną (vidurkis)					
Spenelių išlikimas pas jauniklius patinus 13 dieną (vidurkis)					
Jauniklių masė 13 dieną (vidurkis)					
JAUNIKLIAI SU ANOMALIJOMIS					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su ≥ 2					
PALIKUONIŲ NUOSTOLIAI					
Prenataliniai (implantacijos minus gyvų jauniklių skaičius)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					
Postnataliniai (gyvų atsivedimo metu skaičius minus gyvų 13 dieną po atsivedimo skaičius)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					

([1]) Paskutinė poravimosi laikotarpio diena.

B.64 **JUNGTINIS KARTOTINĖS DOZĖS TOKSIŠKUMO BANDYMO IR TOKSIŠKUMO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ATRANKOS BANDYMO TYRIMAS**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 422 (2016). EBPO cheminėms medžiagoms bandyti skirtos gairės periodiškai peržiūrimos, atsižvelgiant į mokslo pažangą. Pradinės atrankinio tyrimo bandymo gairės 422 buvo priimtos 1996 m. atsižvelgiant į „Jungtinio kartotinės dozės ir reprodukcijos ir (arba) vystymosi atrankos bandymo“ protokolą, aptartą dviejuose ekspertų pasitarimuose Londone 1990 m. (1) ir Tokijuje 1992 m. (2).

2. Šiame bandymo metode sujungta toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi atrankos dalis, pagrįsta valstybių narių įgyta patirtimi, pradinį metodą taikant didelių gamybos apimčių cheminėms medžiagoms ir atliekant teigiamų kontrolinių medžiagų tiriamuosius darbus (3) (4), ir kartotinės dozės toksiškumo dalis pagal EBPO bandymo gaires 407 (28 dienų graužikų kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą, atitinka šio priedo B.7 skyrių).

3. Šis bandymo metodas yra atnaujintas įtraukiant vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, ir jis yra tąsa 1998 m. EBPO iniciatyva pradėto didelės svarbos darbo, skirto peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymo gaires (5). Atsižvelgiant į tai TG 407 (atitinka šio priedo B.7 skyrių) buvo išplėstos 2008 m., įtraukiant parametrus, tinkamus bandomųjų cheminių medžiagų endokrininiam aktyvumui aptikti. TG 422 atnaujinimo tikslas buvo įtraukti kai kurias vertinamąsias baigtis, susijusias su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, į atrankai skirtas bandymo gaires, kai ekspozicijos laikotarpiai aprėpia kai kuriuos jautrius vystymosi laikotarpius (prenatalinius ar ankstyvuosius postnatalinius laikotarpius).

4. Į TG 422 buvo įtrauktos pasirinktos papildomos vertinamosios baigtys, susijusios su endokrininę sistemą ardančiomis medžiagomis, taip pat TG 443 dalis (Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas, atitinkantis šio priedo B.56 skyrių), atsižvelgiant į galimybių studiją, susijusią su baigčių įtraukimo moksliniais ir techniniais klausimais, taip pat su jų įtraukimo į tyrimą bandymų schemos reikiamais pakeitimais (6).

5. Šis bandymo metodas skirtas gauti ribotai informacijai apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį patinų ir patelių reprodukcijos charakteristikoms, pvz., lytinių liaukų funkcijai, poravimosi elgesiui, apvaisinimui, vystymuisi ir palikuonių atsivedimui. Jis nėra esamų B.31, B.34, B.35 arba B.56 bandymo metodų alternatyva arba pakeitimas.

PRADINIAI ASPEKTAI

6. Vertinant ir nustatant bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo charakteristikas, kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą gali būti nustatomas po to, kai ūmaus toksiškumo bandymais gaunama pradinė informacija. Atliekant šį tyrimą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai dėl kartotinės ekspozicijos per palyginti ribotos trukmės laikotarpį. Metodą sudaro pamatinis kartotinės dozės toksiškumo tyrimas, kuris gali būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurioms nebūtinas 90 dienų tyrimas (pvz., kai gamybos apimtis neviršija tam tikrų ribų), arba kaip parengiamasis tyrimas prieš ilgalaikį tyrimą. Atliekant tyrimą reikėtų vadovautis pagrindiniais principais ir aspektais, pateiktais EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl saugos įvertinimui naudojamų bandymo gyvūnų klinikinių požymių, kaip humaniško poveikio vertinamųjų baigčių, atpažinimo, vertinimo ir naudojimo (7).

7. Be to, jį sudaro toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vaisingumui atrankos bandymas, todėl taip pat gali būti taikomas gauti pradinei informacijai apie galimą poveikį vyriškos ir moteriškos lyties reprodukcijos charakteristikoms, pvz., lytinių liaukų funkcijai, poravimosi elgesiui, apvaisinimui, vystymuisi ir palikuonių atsivedimui, arba kaip pradinė bandomųjų cheminių medžiagų toksikologinių savybių vertinimo pakopa, arba apie susirūpinimą keliančias chemines medžiagas. Taikant šį bandymo metodą negaunama išsamios informacijos apie visus reprodukcijos ir vystymosi aspektus. Visų pirma, jis suteikia tik ribotas prenatalinės ekspozicijos postnatalinių reiškinių arba postnatalinės ekspozicijos metu galimai sukelto poveikio aptikimo priemones. Dėl (be kitų priežasčių) vertinamųjų baigčių atrankumo ir trumpos tyrimo trukmės šiuo metodu nebus gauta įrodymų, kad būtų galima tvirtai pareikšti apie poveikio reprodukcijai ir (arba) vystymuisi nebuvimą. Be to, nesant kitų toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi bandymų duomenų, teigiami rezultatai yra naudingi pradiniam pavojingumo vertinimui ir padeda priimti sprendimus dėl papildomų bandymų būtinumo ir trukmės.

8. Rezultatus, gautus taikant su endokrinine sistema susijusius parametrus, reikėtų vertinti atsižvelgiant į EBPO konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (8). Patobulintos EBPO TG 422 pagal šią konceptualią sistemą yra 4 lygmens *in vivo* bandymas, kuriuo gaunami duomenys apie neigiamą poveikį su endokrinine sistema susijusioms vertinamosioms baigtims. Tačiau vien tik pats endokrininės sistemos signalas negali būti laikomas pakankamu įrodymu, kad bandomoji cheminė medžiaga yra endokrininę sistemą ardanti medžiaga.

9. Taip pat šiame metode atskirai pažymimas neurologinis poveikis, kaip specifinė vertinamoji baigtis, ir būtinumas atlikti kruopščius gyvūnų klinikinius tyrimus, kad būtų galima gauti kiek įmanoma daugiau informacijos. Šiuo metodų turėtų būti įmanoma identifikuoti neurotoksinį potencialą turinčias chemines medžiagas, ir dėl to gali prireikti papildomai giliau tirti šį aspektą. Be to, metodas gali rodyti imunologinio poveikio pagrindinius požymius.

10. Nesant kitų sisteminio toksiškumo, toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, neurotoksiškumo ir (arba) imunotoksiškumo tyrimų duomenų, teigiami rezultatai yra naudingi pradiniam pavojingumo vertinimui ir padeda priimti sprendimus dėl papildomų bandymų būtinumo ir trukmės. Bandymas gali būti ypač naudingas kaip EBPO Patikrinimo informacijos duomenų rinkinio (SIDS), skirto įvertinti esamas chemines medžiagas, apie kurias yra labai mažas toksikologinės informacijos kiekis arba jos nėra, dalis ir gali būti dviejų atskirų kartotinės dozės toksiškumo bandymo (EBPO TG 407, atitinka šio priedo B.7 skyrių) ir toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi bandymo (EBPO TG 421, atitinka šio priedo B.63 skyrių) atlikimo alternatyva. Jis taip pat gali būti taikomas kaip dozės intervalo nustatymo tyrimas, atliekant išsamesnius reprodukcijos ir (arba) vystymosi tyrimus, arba jei laikoma, kad jis galėtų tikti.

11. Paprastai daroma prielaida, kad skiriasi vaikingų ir neapvaisintų gyvūnų jautrumas. Todėl atliekant šį sudėtinį tyrimą, kuris tinka įvertinti bendrąjį sisteminį toksiškumą ir specifinį toksiškumą reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, gali būti sudėtingiau nustatyti dozės lygius nei šiuos bandymus atliekant atskirai. Be to, bendrojo sisteminio toksiškumo bandymų rezultatų aiškinimas gali būti sunkesnis nei atliekant atskirą kartotinės dozės tyrimą, ypač tuo atveju, kai atliekant tyrimą serumo ir histopatologijos parametrai neįvertinami vienu metu. Dėl šių techninių sunkumų reikia turėti didelę toksiškumo bandymų atlikimo patirtį atliekant šį jungtinį atrankos bandymą. Kita vertus, be to, kad naudojama mažiau gyvūnų, sudėtinis bandymas gali būti geresnis būdas atskirti tiesioginį poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi nuo poveikių, kurie yra antriniai kitų (sisteminių) poveikių atžvilgiu.

12. Šiame bandyme dozavimo laikotarpis yra ilgesnis nei įprastinis 28 dienų kartotinės dozės tyrimo laikotarpis. Tačiau jį atliekant naudojama mažiau kiekvienos lyties vienos grupės gyvūnų palyginti su situacija, kai įprastinis 28 dienų kartotinės dozės tyrimas atliekamas papildant toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi atrankos bandymą.

13. Taikant šį bandymo metodą, bandomoji cheminė medžiaga duodama per burną. Gali prireikti pakeitimų, jei naudojami kiti ekspozicijos būdai.

14. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

15. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

16. Kelioms patinų ir patelių grupėms duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės. Patinai turėtų gauti dozę ne trumpiau kaip keturias savaites, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą (tai sudaro ne mažiau kaip dvi savaitės iki poravimosi, poravimosi laikotarpis ir maždaug dvi savaitės po poravimosi). Atsižvelgiant į ribotą dozės davimo patinams laikotarpį, vaisingumas gali ir nebūti tam tikras jautrus toksiškumo sėklidėms rodiklis. Todėl svarbu atlikti išsamų histologinį sėklidžių tyrimą. Manoma, kad dviejų savaičių prieš poravimąsi dozės

davimo laikotarpio ir vėlesnių poravimosi ir (arba) vaisingumo stebėjimo rezultatų derinio, esant ne trumpesniam kaip keturių savaičių bendrajam dozės davimo laikotarpiui, ir toliau atlikto išsamaus patinų lytinių liaukų histopatologijos tyrimo pakanka, kad būtų galima aptikti daugumą patinų vaisingumui ir spermatogenezei įtaką darančių veiksnių.

17. Patelės turėtų gauti dozę visą tyrimo laikotarpį. Jį sudaro dvi savaitės iki poravimosi (turint tikslą aprėpti bent du pilnus rujos ciklus), skirtingas laikas iki apvaisinimo, vaikingumo trukmė ir mažiausiai trylika dienų po atsivedimo, iki pat numarinimo, įskaitant dieną prieš numatytą numarinimą.

18. Tyrimo trukmė po aklimatizavimo ir rujos ciklo įvertinimo prieš dozės davimą, priklauso nuo patelių vaisingumo ir yra maždaug 63 dienos (mažiausiai 14 dienų prieš poravimąsi (iki 14 dienų) poravimasis, 22 dienų vaikingumas, 13 dienų žindymas).

19. Dozės davimo laikotarpiu gyvūnai atidžiai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

20. Taikant šį bandymo metodą numatyta naudoti žiurkes. Jei TG 422 nurodyti parametrai tiriami naudojant kitą graužikų rūšį, turėtų būti pateiktas išsamus pagrindimas. Vykdant tarptautinę patvirtinimo programą endokrininę sistemą ardančioms medžiagoms aptikti pagal TG 407, vienintelė naudota rūšis buvo žiurkės. Neturėtų būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms dažnai pasireiškia vystymosi defektai. Reikėtų naudoti sveikus neapvaisintus gyvūnus, kurie nebuvo naudojami anksčiau atliekant bandymo procedūras. Reikėtų apibūdinti bandymo gyvūnų rūšį, veislę, lytį, masę ir amžių. Tyrimo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir būti ne didesnis kaip ± 20 % kiekvienos lyties gyvūno vidutinės masės. Jei tyrimas atliekamas kaip ilgalaikio ar visos kartos tyrimo parengiamasis tyrimas, būtų gerai abiems tyrimams naudoti tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnus.

Laikymas ir šėrimas

21. Visos procedūros turėtų atitikti vietinius laboratorinės gyvūnų priežiūros reikalavimus. Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °). Santykinė oro drėgmė turėtų būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina, kad būtų ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, 12 h dienos šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, duodamą pagal šį metodą.

22. Gyvūnai turėtų būti apgyvendinti nedidelėmis tos pačios lyties grupėmis; gyvūnus galima laikyti atskirai, jei tai būtų moksliškai pagrįsta. Laikant grupėmis, viename narvelyje turėtų būti ne daugiau kaip penki gyvūnai. Poravimo procedūros turėtų būti atliekamos šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Vaikingos patelės turėtų būti laikomos atskiruose narveliuose ir turėti gūžtai įsirengti būtinų medžiagų. Žindančios patelės laikomos atskiruose narveliuose su savo palikuoniais.

23. Pašarus reikėtų nuolat analizuoti dėl teršalų buvimo. Pašaro ėminys turėtų būti saugomas, kol bus parengta ataskaita.

Gyvūnų ruošimas

24. Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinai paskirstomi ir priskiriami apdorojimo grupėms ir narveliams. Narvelius reikėtų išdėstyti taip, kad narvelio vietos įtaka būtų kiek įmanoma mažesnė. Gyvūnai unikaliai identifikuojami ir ne mažiau kaip penkias paras iki tyrimo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Dozių ruošimas

25. Bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama duoti per burną, nebent būtų laikoma, kad labiau tinka kiti davimo būdai. Jei pasirenkamas davimo per burną būdas, bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per zondą, tačiau bandomąsias chemines medžiagas taip pat galima duoti su pašaru arba geriamuoju vandeniu.

26. Jei būtina, bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama tinkamame nešiklyje arba ruošiama jos suspensija. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, tada svarstyti galimybę naudoti aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalą arba suspensiją ir tik po to – galimybę naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jei nešiklis yra ne vanduo, turėtų būti žinomos jo toksiškumo charakteristikos. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir vienalytiškumą nešiklyje.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

27. Rekomenduojama kiekvienos grupės bandymą pradėti turint ne mažiau kaip 10 patinų ir 12–13 patelių. Prieš ekspozicijos pradžią įvertinamas patelių rujos ciklišKumas, ir gyvūnai, kurių ciklas nėra 4–5 dienos, neįtraukiami į tyrimą, todėl rekomenduojama turėti papildomų patelių, kad kiekvienoje grupėje liktų 10 patelių. Manoma, kad, išskyrus aiškaus toksinio poveikio atvejį, kiekvienoje grupėje bus mažiausiai 8 vaikingos patelės, ir tai paprastai yra mažiausias priimtinas vaikingų patelių skaičius kiekvienoje grupėje. Tikslas yra gauti pakankamą vaikingų patelių ir palikuonių skaičių, kad būtų galima pagrįstai įvertinti bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą daryti poveikį vaisingumui, vaikingumui, patelės ir žindomo palikuonio elgesiui bei F_1 kartos palikuonių augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki 13 paros po atsivedimo. Jei planuojami tarpiniai skrodimai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas tiek, kiek numatyta numarinti gyvūnų iki tyrimo pabaigos. Turėtų būti apsvarstyta galimybė į kontrolinę grupę ir didžiausiajai dozei skirtą grupę įtraukti po vieną papildomą pagalbinę penkių kiekvienos lyties gyvūnų grupę, kad ne mažiau kaip 14 dienų po apdorojimo būtų galima stebėti sisteminio toksinio poveikio grįžtamumą, tvarumą arba vėlavimą. Pagalbinės grupės gyvūnai nebūtų poruojami, todėl nenaudojami vertinant toksiškumą reprodukcijai ir (arba) vystymuisi.

Dozavimas

28. Paprastai turėtų būti ne mažiau kaip trys bandymo grupės ir viena kontrolinė grupė. Jei nėra tinkamų bendrojo toksiškumo duomenų, gali būti atliktas intervalo nustatymo tyrimas (naudojant tos pačios veislės ir iš to paties šaltinio gautus gyvūnus), kuris padėtų nustatyti naudotinas dozes. Išskyrus apdorojimą bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinių grupių gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su apdorojimo grupių gyvūnais. Jeigu duodant bandomąją cheminę medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti didžiausią naudotą nešiklio kiekį.

29. Dozių dydžiai turėtų būti pasirinkti atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Taip pat reikėtų atsižvelgti į tai, kad vaikingų ir neapvaisintų gyvūnų jautrumas gali skirtis. Didžiausiąją dozę reikėtų pasirinkti turint tikslą sukelti toksinį poveikį, bet ne gyvūno žūtį ar akivaizdžias kančias. Toliau reikėtų pasirinkti mažėjančių dozės dydžių seką, siekiant parodyti su dozavimu susijusį atsaką ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), esant mažiausiai dozei. Paprastai optimalūs dozių skirtumo intervalai yra nuo dviejų iki keturių kartų, ir dažnai vietoj didelių intervalų tarp dozių (pvz., daugiau kaip 10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymo grupę.

30. Jei stebimas bendrasis toksiškumas (pvz., mažesnė kūno masė, poveikis kepenims, širdžiai, plaučiams arba inkstams ir kt.) arba kiti pakitimai, kurie gali nebūti toksiškumo atsakais (pvz., mažesnis pašaro vartojimas, kepenų padidėjimas), stebimas poveikis jautrioms endokrininės sistemos vertinamosioms baigtims turėtų būti aiškinamas atsargiai.

Ribinis bandymas

31. Jei atliekant per burną duodamos vieno dydžio dozės tyrimą pagal šiam tyrimui aprašytas procedūras, duodama ne mažesnė kaip 1 000 mg/kg kūno masės per parą dozė arba, jei duodama su pašaru, atitinkamą pašaro ar geriamo vandens procentinę dalį sudaranti dozė (pagal nustatytą kūno masę) nesukelia pastebimo toksinio poveikio ir jei toksinio poveikio nesitikima, atsižvelgiant į gimiminges struktūros medžiagoms gautus duomenis, visas bandymas naudojant kelių dydžių dozes gali būti nebūtinas. Ribinis bandymas atliekamas, išskyrus atvejus, kai žmonių ekspozicijos būdas rodo, kad duodamos dozės turi būti didesnės. Jei duodama kitais būdais, pvz., įkvepiama arba dedama ant odos, didžiausią galimą ekspozicijos koncentraciją dažnai gali lemti bandomųjų cheminių medžiagų fizikinės ir cheminės savybės.

Dozių davimas

32. Gyvūnai gauna bandomosios cheminės medžiagos dozę kasdien 7 dienas per savaitę. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama viena dozė per skrandžio zondą arba per tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausiasis gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima

duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukelia sunkesnį poveikį, bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kiek įmanoma mažesnis keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų vienodas.

33. Jei bandomosios cheminės medžiagos duodamos su pašaru ar geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios cheminės medžiagos kiekiai nekeltų trukdžių normaliai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti pastovią koncentraciją pašaruose (ppm) arba pastovaus dydžio dozę pagal gyvūno kūno masę; pasirinktą variantą reikėtų nurodyti. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir koreguojama mažiausiai kartą per savaitę pastoviam dozės ir gyvūno kūno masės santykiui užtikrinti. Jei jungtinis tyrimas naudojamas kaip ilgalaikio ar išsamaus toksiškumo reprodukcijai tyrimo parengiamasis tyrimas, abiem tyrimams reikėtų naudoti panašų pašarą.

Bandymo tvarkaraštis

34. Dozes reikėtų pradėti duoti abiejų lyčių gyvūnams 2 savaites prieš poravimąsi, po to, kai jie buvo aklimatizuojami ne trumpiau kaip penkias dienas, ir patelės atrinktos pagal normalius rujos ciklus (2 savaičių laikotarpiu prieš apdorojimą). Tyrimo tvarkaraštis turėtų būti sudarytas taip, kad rujos ciklo įvertinimas prasidėtų netrukus po to, kai gyvūnai pasiekia visišką lytinę brandą. Jos laikas gali šiek tiek skirtis skirtingoms žiurkių veislėms skirtingose laboratorijose, pvz., *Sprague Dawley* žiurkės subręsta 10 savaičių amžiaus, *Wistar* žiurkės – maždaug 12 savaičių amžiaus. Pateles su palikuoniais reikėtų numarinti 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau. Jei patelės turėtų negauti pašaro per naktį prieš kraujo ėminių ėmimą (pasirinkus tokį variantą), patelės ir jų palikuoniai nebūtinai turi būti numarinami tą pačią dieną. Gimimo diena (t. y., kai baigiama atsivesti) nustatoma kaip 0 diena po atsivedimo. Patelės, kurios nerodo poravimosi požymių, numarinamos po 24–26 dienų nuo paskutinės poravimosi laikotarpio dienos. Dozės toliau duodamos abiejų lyčių gyvūnams visą poravimosi laikotarpį. Patinams reikėtų duoti dozę po poravimosi laikotarpio ne trumpiau kaip iki viso 28 dienų dozavimo laikotarpio pabaigos. Patinai numarinami arba, jei manoma, kad juos galima poruoti dar kartą, paliekami ir jiems toliau duodama dozė.

35. Dozės turėtų būti duodamos motininėms patelėms kasdien visą vaikingumo laikotarpį ir ne trumpiau kaip iki 13 dienos po atsivedimo, įskaitant ir tą dieną, arba likus dienai iki numarinimo. Jei tyrimai atliekami bandomąją cheminę medžiagą duodant įkvėpti arba ją dedant ant odos, dozė turėtų būti duodama ne trumpiau kaip iki 19 dienos nuo vaikingumo pradžios, įskaitant ją, ir davimą reikėtų atnaujinti kiek įmanoma greičiau, bet ne vėliau kaip 4 dieną po atsivedimo (PND).

36. Jei įtraukta pagalbinė grupė, jos gyvūnai, numatyti vėlesniems stebėjimams, neporuojami. Jie turėtų būti laikomi be apdorojimo dar ne trumpiau kaip 14 dienų po pirmojo patelių numatyto numarinimo, kad būtų galima aptikti toksinio poveikio vėlavimą, tvarumą arba atsigavimą nuo jo.

37. Bandymo tvarkaraščio schema pateikta 2 priedėlyje.

Rujos ciklai

38. Rujos ciklus reikėtų stebėti prieš apdorojimo pradžią, kad tyrimui būtų atrinktos patelės, turinčios reguliarų ciklišKumą (žr. 27 pastraipą). Makšties tepinėlius taip pat reikėtų stebėti kasdien nuo apdorojimo laikotarpio pradžios iki poravimosi įrodymų gavimo. Jei yra susirūpinimas dėl ūminio streso poveikio, kuris galėtų pakeisti rujos ciklus, pradėjus duoti dozes, laboratorijos gali veikti bandymo gyvūnus medžiaga 2 savaites, tada kasdien imti makšties tepinėlius, kad rujos ciklas būtų stebimas mažiausiai dvi savaites prieš poravimosi laikotarpį ir stebėjimas tęsiamas poravimosi laikotarpiu iki poravimosi įrodymų gavimo. Makšties ar gimdos kaklelio ląsteles reikėtų imti atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir tokiu būdu nebūtų sukeltas netikras vaikingumas (8) (9).

Poravimo procedūra

39. Atliekant šį tyrimą paprastai reikėtų poruoti 1: 1 (vienas patinas ir viena patelė). Išimčių gali būti dėl atsitiktinai žuvusių patinų. Patelė turėtų būti laikoma su tuo pačiu patinu tol, kol atsiranda poravimosi požymiai, arba praeina dvi savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. 0 vaikingumo diena apibrėžiama kaip diena, kurią patvirtinamas poravimosi faktas (randamas makšties kamštis arba spermos). Jei poravimas buvo nesėkmingas, galima būtų spręsti dėl pakartotino patelių poravimo su patikrintais tos pačios grupės patinais.

Vados dydis

40. 4 dieną po atsivedimo kiekvienos vados dydį galima koreguoti, šalinant perteklinius jauniklius atsitiktinės atrankos būdu, kad būtų gautas kiek įmanoma vienodesnis keturių ar penkių vienos lyties jauniklių vienai vadai skaičius, priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio. Reikėtų paimti dviejų perteklinių jauniklių kraujo ėminius, juos sujungti ir naudoti serumo T4 koncentracijos nustatymui. Atrankusis jauniklių šalinimas, pvz., pagal kūno masę arba anogenitalinį atstumą (AGD), netinka. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis ar penkis kiekvienos lyties jauniklius, priimtinas dalinis jauniklių skaičiaus koregavimas (pvz., šeši patinai ir keturios patelės). Jaunikliai nešalinami, kai vados dydis yra mažesnis nei brokavimo tikslinė vertė (8 ar 10 jauniklių vienai vadai). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei brokavimo tikslinė vertė, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

41. Jei vados dydis nekoreguojamas, du jaunikliai vienai vadai numarinami 4 dieną po gimimo ir imami jų kraujo ėminiai serumo skydliaukės hormono koncentracijai matuoti. Jei įmanoma, šie du jaunikliai vienai vadai turėtų būti patelės, kad jauniklius patinus būtų galima pasilikti spenelių išlikimo įvertinimui, išskyrus atvejus, kai pašalinus šias pateles jų nelieka vertinimui tyrimo pabaigoje. Jaunikliai nešalinami, jei vados dydis būtų mažesnis kaip 8 ar 10 jauniklių vienai vadai (priklausomai nuo normalaus naudotos žiurkių veislės vados dydžio). Jei vadoje tik vienu jaunikliu daugiau nei normalioje vadoje, jis šalinamas ir naudojamas kraujui paimti, kad būtų galima atlikti serumo T4 vertinimą.

Stebėjimų rezultatai

42. Bendrus klinikinius stebėjimus reikia atlikti mažiausiai kartą per dieną, pageidautina kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Gyvūnų sveikatos būklė turėtų būti registruojama. Bent du kartus per dieną visi gyvūnai turėtų būti patikrinami, ar jie sveiki ir nenugaišę.

43. Kartą prieš pirmosios ekspozicijos pradžią (kad būtų galima palyginti tą patį gyvūną) ir bent kartą per savaitę po dozės davimo turėtų būti atliekami išsamūs visų tėvų kartos gyvūnų klinikiniai stebėjimai. Kiekvieną dieną šiuos stebėjimus reikėtų atlikti tuo pačiu metu, perkėlus gyvūną iš narvo į tam skirtą vietą. Jų rezultatai turėtų būti kruopščiai registruojami, pageidautina naudojant įvertinimo balais sistemas, aiškiai apibrėžtas bandymų laboratorijos. Turėtų būti dedamos pastangos, kad bandymo sąlygų kaita būtų kuo mažesnė, ir pageidautina, kad šiuos stebėjimus atliktų stebėtojai, kurie nežinotų, ar buvo apdorojama. Registruojami požymiai turėtų aprėpti odos, kailio, akių, gleivinės pakitimus, išskyrų, išmatų, autonominio aktyvumo (pvz., ašarojimo, plaukų pašiaušimo, vyzdžio dydžio, neįprasto kvėpavimo) buvimą ir kitus dalykus. Taip pat turėtų būti registruojami eisenos, pozos, atsako į tvarkymo veiksmus pakitimai, traukulių arba toninių judesių atsiradimas, stereotipijos požymiai (pvz., besaikis valymasis, pasikartojantis sukimasis ratu), sunkus arba ilgalaikis atsivedimas arba keistas elgesys (pvz., savęs luošinimas, ėjimas atbulomis) (10).

44. Vieną kartą tyrimo metu reikėtų atlikti penkių patinų ir penkių patelių, atsitiktinai atrinktų iš kiekvienos grupės, jutiminės reakcijos į skirtingų rūšių dirgiklius (pvz., klausos, regos ir proprioceptorių dirgiklius) (8) (9) (11), sugriebimo stiprumo (12) ir judėjimo aktyvumo (13) vertinimą. Išsamesnės informacijos apie procedūras, kurios galėtų būti taikomos, pateikta atitinkamuose literatūros šaltiniuose. Tačiau taip pat galėtų būti taikomos čia nurodytoms procedūroms alternatyvios procedūros. Šie funkciniai patinų stebėjimai turėtų būti atliekami baigiantis dozės davimo jiems laikotarpiui, prieš pat numatytą numarinimą, bet prieš hematologijai ar klinikinei chemijai skirtų kraujo ėminių ėmimą (žr. 53–56 pastraipas, įskaitant 1 išnašą). Šių funkcinių bandymų metu patelės turėti būti fiziologiškai panašios būsenos ir jų funkcinius bandymus reikėtų vieną kartą atlikti paskutinę žindymo savaitę (pvz., 6–13 žindymo dieną), netrukus prieš numatytą numarinimą. Kiek įmanoma reikėtų mažinti patelių ir jauniklių atskyrimo trukmę.

45. Vieną kartą prieš tyrimų pabaigą atliekami funkciniai stebėjimai nebūtini, kai tyrimas atliekamas kaip vėlesnio pusiau lėtinio (90 dienų) arba ilgalaikio toksiškumo tyrimo parengiamasis tyrimas. Tokiu atveju funkciniai stebėjimai turėtų būti įtraukiami į šį tolesnį tyrimą. Kita vertus, tokie funkciniai stebėjimai atliekant kartotinės dozės tyrimą suteikia didesnę galimybę geriau parinkti dozių dydžius tolesniam pusiau lėtinio arba ilgalaikio toksiškumo tyrimui.

46. Išimtiniais atvejais funkcinių stebėjimų galima neatlikti ir su tomis grupėmis, kurių toksiškumo požymiai tokio laipsnio, kad jie labai trukdytų atlikti funkcinius bandymus.

47. Gestacijos trukmė turėtų būti registruojama ir pradedama skaičiuoti nuo 0 nėštumo dienos. Kiekviena vada turėtų būti apžiūrėta kiek įmanoma greičiau po atsivedimo siekiant nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, gimusių negyvų ir gimusių gyvų jauniklių skaičių, silpnuosius jauniklius (jauniklius, kurie yra gerokai mažesni už atitinkamus kontrolinius jauniklius) ir dideles anomalijas.

48. Gyvi jaunikliai turėtų būti suskaičiuojami ir jų lytis nustatoma per 24 h nuo atsivedimo (0 dieną arba 1 dieną po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Be tėvų kartos gyvūnų stebėjimų (žr. 43 ir 44 pastraipas), reikėtų registruoti visus jauniklių nenormalaus elgesio pasireiškimus.

49. Kiekvieno jauniklio anogenitalinis atstumas (AGD) turėtų būti matuojamas tą pačią dieną po gimimo tarp PND 0 ir PND 4. Jauniklio kūno masės duomenis reikėtų gauti tą pačią dieną, kurią matuojamas AGD, ir AGD turėtų būti norminamas pagal jauniklio dydį, ir būtų gerai, kad AGD būtų lygus kubinei šakniai iš kūno masės (14). Jauniklių patinų spenelius ir (arba) areoles reikėtų suskaičiuoti PND 12 arba 13 dieną, kaip rekomenduojama EBPO GD 151 (15).

Kūno masė ir pašaro bei vandens suvartojimas

50. Patinus ir pateles reikėtų sverti pirmąją dozės davimo dieną, ne rečiau kaip kas savaitę vėliau ir tyrimo pabaigoje. Vaikingumo laikotarpiu pateles reikėtų sverti 0, 7, 14 ir 20 dieną ir per 24 valandas po atsivedimo (0 arba 1 diena po atsivedimo) ir bent 4 ir 13 dieną po atsivedimo. Šie rezultatai turėtų būti pateikiami ataskaitoje atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną.

51. Pašaro suvartojimą prieš poravimąsi, vaikingumo ir žindymo metu reikėtų matuoti mažiausiai kartą per savaitę. Pašaro suvartojimą poravimosi metu matuoti nebūtina. Vandens suvartojimas šiais laikotarpiais taip pat turėtų būti matuojamas, kai bandomoji cheminė medžiaga yra duodama su šia terpe.

Hematologija

52. Vieną kartą tyrimo metu reikėtų atlikti tokius penkių patinų ir penkių patelių, atsitiktinai atrinktų iš kiekvienos grupės, hematologinius tyrimus: hematokrito, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio, retikolucitų, bendrojo leukocitų kiekio ir leukocitų formulės, trombocitų kiekio ir kraujo krešėjimo trukmės ir aktyvumo. Jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga arba jos numanomi metabolitai turi oksidacinių savybių, turėtų būti nustatyti ir kiti rodikliai, įskaitant metemoglobino koncentraciją ir Heinco kūnelius.

53. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos. Ėminių ėmimo metu patelės turėti būti fiziologiškai panašios būsenos. Siekiant išvengti praktinių sunkumų, susijusių su gestacijos pradžios kintamumu, vietoj patelių kraujo ėminių ėmimo prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu, juos būtų galima imti baigiantis laikotarpiui prieš poravimąsi. Patinų kraujo ėminius geriausia būtų imti prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu. Arba patinų kraujo ėminius taip pat būtų galima imti baigiantis laikotarpiui prieš poravimąsi, jei šis laiko momentas laikomas tinkamiausiu patelėms.

54. Kraujo ėminius reikėtų laikyti tinkamomis sąlygomis.

Klinikinė biochemija

55. Klinikiniai biocheminiai nustatymai tiriant pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turėtų būti atliekami imant kiekvienos grupės penkių patinų ir penkių patelių kraują. Rekomenduojama prieš kraujo ėmimą gyvūnų per naktį nešerti ([1]). Atliekant plazmos arba serumo tyrimus turėtų būtų nustatomas: natris, kalis, gliukozė, suminis cholesterolis, karbamidas, kreatininas, suminis baltymų kiekis ir albuminas, mažiausiai du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (pvz., alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė ir sorbitoldehidrogenazė) ir tulžies rūgštys. Tam tikromis aplinkybėmis naudingos informacijos gali suteikti papildomi fermentų (kepenų arba kitokios kilmės) ir bilirubino tyrimai.

56. Kraujo ėminiai iš nustatytos vietos imami pagal tokį tvarkaraštį:

— ne mažiau kaip dviejų jauniklių iš kiekvienos vados 4 dieną po gimimo, jei pakanka jauniklių skaičiaus (žr. 40–41 pastraipas)

— visų patelių, ne mažiau kaip dviejų jauniklių ių kiekvienos vados 13 dieną tyrimo pabaigoje, ir

— visų suaugusių patinų tyrimo pabaigoje.

Visi kraujo ėminiai laikomi tinkamomis sąlygomis. 13 dienų jauniklių ir suaugusių patinų kraujo ėminiai vertinami dėl skydliaukės hormonų (T4) koncentracijos serume. Papildomai nustatomas T4 kiekis patelių ir 4 dienų jauniklių kraujo ėminiuose, jei reikia. Be to, galima pasirinkti matuoti kitus hormonus, jei tinka. Vienos vados jauniklių kraujo ėminius galima sujungti atliekant skydliaukės hormonų analizę. Skydliaukės hormonus (T4 ir TSH) reikėtų matuoti kaip „suminį kiekį".

([1]) Atliekant kai kuriuos serumo ir plazmos matavimus, ypač gliukozės, pageidautina, kad gyvūnai naktį prieš ėminių ėmimą negautų pašaro. Pagrindinė tokios pirmenybės teikimo priežastis yra padidėjęs kintamumas, kuris neišvengiamai būtų, jei gyvūnai būtų šeriami, galėtų slėpti sunkiau pastebimą poveikį ir būtų sunku aiškinti rezultatus. Tačiau, kita vertus, naktį nešeriant gyvūnų gali būti (vaikingų) gyvūnų bendrosios medžiagų apykaitos trukdžių, trikdoma laktacija ir žindymo elgesys, ir ypač atliekant šėrimo tyrimus, gali būti trikdomas kasdienio veikimo bandomąja chemine medžiaga būdas. Jei būtų nuspręsta nešerti gyvūnų per naktį, klinikiniai biocheminiai tyrimai turėtų būti atliekami atlikus patinų funkcinius stebėjimus 4 tyrimo savaitę. Pateles reikėtų palikti papildomai dienai po jauniklių atjunkymo (pvz., PND 13). Patelių reikėtų nešerti per naktį iš 13 į 14 žindymo dieną ir numarinimo metu paimtą kraują naudoti klinikinės chemijos parametrams nustatyti.

57. Paskutinę tyrimo savaitę (neprivalomai) gali būti atliekami kiekvienos grupės penkių atsitiktinai atrinktų patinų šlapimo tyrimai, nustatytu laiku imant tam tikrą šlapimo tūrį ir tiriant: išvaizdą, kvapą, tūrį, osmolialumą arba savitąjį tankį, pH, baltymus, gliukozę ir kraują (kraujo kūnelius).

58. Be to, būtų galima numatyti tyrimus bendrų audinių pažeidimų serumo rodikliams nustatyti. Jei žinomos ar įtariamos bandomosios cheminės medžiagos savybės gali daryti įtaką susijusiems medžiagų apykaitos eigai, galima atlikti kalcio, fosfato, trigliceridų ir gliukozės nešėrus, specifinių hormonų, metemoglobino bei cholinesterazės analizę. Būtinumas tai atlikti turi būti nustatomas kiekvieną kartą atskirai.

59. Hormonų nustatymo rezultatų kintamumui ir absoliučiajai koncentracijai gali turėti įtakos šie veiksniai:

— numarinimo laikas – dėl hormonų koncentracijos kitimo paros metu;

— numarinimo būdas, siekiant išvengti per didelio streso, galinčio turėti įtakos hormonų koncentracijai,

— hormonų nustatymui skirti bandymo rinkiniai, kuriais gautos kalibravimo kreivės gali skirtis.

60. Hormonų nustatymui specialiai skirti plazmos ėminiai turėtų būti imami panašiu dienos metu. Naudojant įvairius prekyboje esančius bandymo rinkinius, skiriasi gautos analizuojamų hormonų koncentracijos skaitinės vertės.

61. Jei pamatinių istorinių duomenų nepakanka, turėtų būti apsvarstyta galimybė nustatyti hematologinius ir klinikinius biocheminius kintamuosius prieš pradedant duoti dozes arba, tai geriau atlikti naudojant gyvūnų grupę, neįtrauktą į bandymo grupes. Patelių atvejų tyrimui imami žindančių gyvūnų duomenys.

PATOLOGIJA

Bendroji nekroskopija

62. Turėtų būti atliekamas išsamus visų bandomųjų gyvūnų bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolės, krūtinės ląstos, pilvo ertmes ir jų turinį. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas reprodukcijos sistemos organams. Reikėtų registruoti implantacijos vietų skaičių. Makšties tepinėliai turėtų būti tiriami skrodimo dienos ryte, kad būtų galima nustatyti rujos ciklo stadiją ir koreliaciją su patelės reprodukcijos organų histopatologija.

63. Nuo visų suaugusiųjų patinų sėklidžių, sėklidžių prielipų, taip pat prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis, kaip visumos, reikėtų pašalinti visus priaugusius audinius, jei yra, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti drėgnos būsenos, kad būtų išvengta džiūvimo. Be to, papildomai galėtų būti nustatoma patinų išangės pakeliamojo ir stormeninio akytkūnio raumens, abiejų Kuperio liaukų ir varpos galvos masė, patelių – porinių kiaušidžių (drėgno organo masė) ir gimdos (įskaitant gimdos kaklelį) masė; jei šios masės įtraukiamos, jos turėtų būti nustatytos kuo greičiau po skrodimo. Reikėtų konservuoti visų suaugusiųjų gyvūnų kiaušides, sėklides, papildomus lytinius organus ir visus organus, turinčius makroskopinių pažeidimų.

64. Visų suaugusiųjų patinų ir patelių bei kiekvienos vados vieno 13 dienos jauniklio patino ir patelės skydliaukės turėtų būt konservuojamos tinkamiausioje fiksavimo terpėje, kad vėliau būtų galima atlikti numatytą histopatologinį tyrimą. Skydliaukės masę galima nustatyti atlikus fiksavimą. Valyti (apipjaustyti) taip pat reikėtų labai atsargiai ir tik atlikus fiksavimą, kad nebūtų pažeistas audinys. Pažeidus audinį gali būti gauti netikslūs histopatologinės analizės rezultatai. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu ir saugomi tinkamomis sąlygomis (žr. 56 pastraipą).

65. Be to, atsitiktinai iš kiekvienos grupės atrinktų penkių suaugusiųjų patinų ir patelių (neskaitant gaištančių ir (arba) numarintų iki tyrimo pabaigos) kepenys, inkstai, antinksčiai, užkrūčio liauka, bužnis, smegenys ir širdis turėtų būti nuvalyti pašalinant priaugusius audinius, jei yra, ir kuo greičiau pasverti drėgnos būsenos, kad būtų išvengta džiūvimo. Naudojant audiniui ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui tinkamiausią fiksavimo terpę, reikėtų konservuoti šiuos audinius: visus labai pažeistus audinius, smegenis (jų būdingiausias dalis – didžiąsias smegenis, smegenėles ir smegenų tiltą), nugaros smegenis, akis, skrandį, mažąsias ir didžiąsias žarnas (taip pat Peyerio plokšteles), kepenis, inkstus, antinksčius, bužnį, širdį, užkrūčio liauką, trachėją ir plaučius (įleidžiant fiksatyvo ir tada panardinant), lytines liaukas (sėklides ir kiaušides), papildomus lytinius organus (gimdą, gimdos kaklelį, sėklidžių prielipus, prostatą ir

sėklines pūsleles su koaguliatorių liaukomis), makštį, šlapimo pūslę, limfinius mazgus (be artimiausio drenažinio mazgo, remiantis geriausią laboratorine patirtimi paimamas dar vienas mazgas (16)), periferinį nervą (sėdimąjį arba blauzdikaulio), pageidautina, esantį arti raumens, skeleto raumenis ir kaulus su kaulų čiulpais (išpjovą arba šviežiai paruoštą kaulų čiulpų punkciją). Rekomenduojama atlikti sėklidžių fiksavimą jas panardinant į Bouino arba modifikuotąjį Davidsono fiksatyvą (16) (17) (18). Šių audinių nerekomenduojama fiksuoti formaline. Abu *tunica albuginea* galus galima atsargiai ir negiliai pradurti adata, kad fiksatyvas galėtų greitai prasiskverbti. Atsižvelgiant į gautus klinikinių tyrimų ir kitus rezultatus, gali tekti tirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai.

66. Vertingos informacijos apie poveikį endokrininei sistemai galima gauti tiriant šiuos audinius: lytines liaukas (kiaušides ir sėklides), papildomus lytinius organus (gimdą ir gimdos kaklelį, sėklidžių prielipus, sėklines pūsleles su koaguliatorių liaukomis, dorsolateralinę ir pilvinę prostatą), makštį, hipofizį, patinų pieno liauką ir antinksčių liauką. Patinų pieno liaukų pakitimai nėra pakankamai dokumentuoti, bet šis parametras gali būti labai jautrus estrogeniškai veikiančioms medžiagoms. Į 65 pastraipą neįtrauktų organų ir (arba) audinių stebėjimas nėra būtinas.

67. Negyvi jaunikliai ir 13 dieną po atsivedimo arba šiek tiek vėliau numarinti jaunikliai turėtų būti bent kruopščiai apžiūrėti išoriškai dėl didelių anomalijų. Ypatingą dėmesį reikėtų atkreipti į išorinius lytinio dauginimosi organus, kuriuos reikėtų ištirti dėl pakitusio vystymosi požymių.

Histopatologija

68. Turėtų būti atliekami išsamūs histopatologiniai kontrolinių ir didelės dozės grupių pasirinktų gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių tyrimai (ypač kreipiant dėmesį į patinų lytinių liaukų spermatogenezės stadijas ir sėklidžių intersticinių ląstelių struktūros histopatologiją). Jei būtina, galima ištirti jauniklių ir likusių suaugusiųjų gyvūnų skydliaukę. Jei su ekspozicija susijusių pakitimų nustatoma didžiausiąją dozę gavusioje grupėje, reikėtų išanalizuoti ir kitas dozes gavusių gyvūnų grupes. Histopatologinių tyrimų gairėse (10) pateikta išsamios papildomos informacijos apie skrodimą, fiksavimą, pjaustymą ir endokrininių audinių histopatologiją.

69. Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pažeidimai. Siekiant padėti nustatyti NOAEL, reikėtų tirti kitų dozių grupių tikslinius organus, ypač tų grupių, kurios nurodomos kaip rodančios NOAEL.

70. Jei naudojama pagalbinė grupė, reikėtų atlikti audinių ir organų, poveikis kuriems buvo nustatytas tiriant apdorotas grupes, histopatologinį tyrimą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

71. Turėtų būti pateikiami atskirų gyvūnų duomenys. Be to, papildomai visus duomenis reikėtų suvesti į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei nurodomas gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų nugaišimo arba humaniško numarinimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, toksinio poveikio požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir toksinio poveikio rimtumą, histopatologinių pakitimų tipai ir visi atitinkami vados duomenys. Lentelės pavidalo suvestinės formatas, kuris pasirodė labai naudingas, kai reikia įvertinti poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, pateiktas 3 priedėlyje.

72. Jei įmanoma, kiekybiniai rezultatai turėtų būti įvertinti taikant tinkamą visuotinai pripažintą statistinį metodą. Lyginant poveikį pagal dozių intervalą turėtų būti vengiama taikyti įvairius t kriterijus. Statistiniai metodai turėtų būti parenkami rengiant tyrimo planą. AGD ir spenelių išlikimo statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados veiksnius. Jei tinka, statistinės analizės vienetas yra vada. Jauniklių kūno masės statistinė analizė turėtų būti pagrįsta atskirų jauniklių duomenimis, atsižvelgiant į vados dydį. Atsižvelgiant į nedidelę tyrimo apimtį, statistinės analizės kaip reikšmingumo kriterijų nustatymo vertė yra ribota daugeliui vertinamųjų baigčių, ypač reprodukcijos vertinamųjų baigčių. Kai kurie plačiausiai taikomi metodai, ypač skirstinio vidutinės vertės mato parametriniai kriterijai, netinka. Jei statistiniai tyrimai atliekami, pasirinktas metodas turėtų atitikti tiriamo kintamojo pasiskirstymą ir metodą reikėtų pasirinkti prieš tyrimo pradžią.

Rezultatų įvertinimas

73. Šio toksiškumo tyrimo rezultatai turėtų būti vertinami atsižvelgiant į stebimą poveikį, nekroskopijos ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinimas aprėpia ryšį tarp bandomosios cheminės medžiagos dozės ir anomalijų buvimo ar nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pažeidimus, nustatytus tikslinius organus, nevaisingumą, klinikines anomalijas, paveiktą reprodukavimo gebą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaištamumui ir visus kitus toksiškumo reiškinius.

74. Dėl trumpo patinų apdorojimo laikotarpio, vertinant poveikį patinų reprodukcijai, sėklidžių ir sėklidžių prielipų histopatologiją reikėtų nagrinėti kartu su vaisingumo duomenimis. Reprodukcijos ir (arba) vystymosi istorinių kontrolinių ėminių duomenų (pvz., vados dydis, AGD, spenelių išlikimas, T4 koncentracija serume), jei yra, naudojimas taip pat gali būti naudingas kaip pagalbinė priemonė aiškinant tyrimą.

75. Siekiant užtikrinti kokybės kontrolę, siūloma rinkti istorinių kontrolinių ėminių duomenis ir apskaičiuoti skaitinių duomenų variacijos koeficientus, ypač parametrų, susijusių su endokrininę sistemą ardančių medžiagų aptikimu. Šie duomenys gali būti naudojami palyginimo tikslais, kai vertinami atliekami tyrimai.

Bandymo ataskaita

76. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

Bandymo gyvūnai:

— naudota rūšis ir (arba) padermė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

— rūšies, jei tai ne žiurkės, pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

— dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;

— duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą ir (arba) jos dėjimą į pašarą, gautą preparato koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) pašare arba geriamajame vandenyje perskaičiavimas į faktinę dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei taikoma;

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę;

— išsamus randomizavimo procedūros brokuojamiems jaunikliams atrinkti procedūros aprašymas, jei brokuojami.

Rezultatai:

— kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai;

— pašaro ir vandens suvartojimo duomenys, jei taikoma;

— toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant vaisingumą, nėštumą, ir kitus toksiškumo požymius;

— gestacijos trukmė;

— toksiškas arba kitoks poveikis reprodukcijai, palikuonims, postnataliniam augimui ir kt.;

— klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami);

— jutimo organų aktyvumo, sugriebimo stiprumo ir judėjimo aktyvumo vertinimo duomenys;

— hematologiniai tyrimai, remiantis atitinkamomis pamatinėmis vertėmis;

— klinikiniai biocheminiai tyrimai, remiantis atitinkamomis pamatinėmis vertėmis;

— suaugusiųjų patelių, kurių rujos ciklas yra normalus arba nenormalus, skaičius ir ciklo trukmė;

— gimusių gyvų jauniklių skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai;

— jauniklių su aiškiai matomais išsigimimais skaičius, išorinių lyties organų bendrasis įvertinimas, silpniausių jauniklių skaičius;

— nugaišimo laikas tyrimo metu arba nurodymas, kad gyvūnas išgyveno iki pabaigos;

— implantacijų skaičius, vados dydis ir vados masė registravimo metu;

— jauniklio kūno masės duomenys;

— visų jauniklių AGD (ir kūno masė AGD matavimo dieną);

— spenelių išlikimas pas jauniklius patinus;

— 13 dienų jauniklių ir suaugusiųjų patinų skydliaukės hormonų koncentracija (ir patelių bei 4 dienos jauniklių, jei matuojama);

— tėvų kartos kūno masės numarinant ir organų masės duomenys;

— nekroskopijos duomenys;

— išsamus histopatologinių rezultatų aprašymas;

— absorbcijos duomenys (jei yra);

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei reikia.

Rezultatų aptarimas

Išvados.

Rezultatų aiškinimas

77. Tyrime būtų pateikiami su kartotinių dozių vartojimu susijusio toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi vertinimo rezultatai. Visų pirma, kadangi daugiausia dėmesio skiriama bendrojo toksiškumo ir toksiškumo reprodukcijai ir (arba) vystymuisi vertinamosioms baigtims, pagal tyrimo rezultatus bus galima atskirti poveikį reprodukcijai ir (arba) vystymuisi, kai bendrojo toksiškumo nėra, ir poveikį, kuris pasireiškia tik esant koncentracijoms, kurios taip pat sukelia toksiškumą tėvų kartos gyvūnams (žr. 7–11 pastraipas). Jis galėtų parodyti tolesnių tyrimų atlikimo būtinybę ir pateikti jų rengimo schemų rekomendacijas. Reikėtų ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 43, kuri padėtų paaiškinti reprodukcijos ir vystymosi rezultatus (19). EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 106 dėl graužikų endokrininių ir reprodukcijos bandymų histologinio įvertinimo (16) pateikiama informacija apie (endokrininių) organų bei makšties tepinėlių paruošimą ir įvertinimą, kuri gali būti naudinga šiam bandymo metodui.

LITERATŪRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.

(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. Galima gauti iš Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos Paryžiuje.

(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 priedėlis

APIBRĖŽTYS (TAIP PAT ŽR. EBPO REKOMENDACINĮ DOKUMENTĄ NR. 150 (20))

Androgeniškumas - cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus androgeninis hormonas (pvz., testosteronas).

Antiandrogeniškumas - cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus androgeninio hormono (pvz., testosterono) veikimą žinduolio organizme.

Antiestrogeniškumas - cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus estrogeninio hormono (pvz., 17β-estradiolio) veikimą žinduolio organizme.

Antitiroidinis aktyvumas - cheminės medžiagos gebėjimas slopinti natūralaus skydliaukės hormono (pvz., T_3) veikimą žinduolio organizme.

Cheminė medžiaga - atskira cheminė medžiaga arba mišinys.

Toksiškumas vystymuisi - toksiškumas reprodukcijai, kuris pasireiškia kaip palikuonių pre-, peri-, postnataliniai, struktūriniai ar funkciniai sutrikimai.

Dozė - duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase, per parą tenkančia vienam bandomojo gyvūno kūno masės vienetui (pvz., mg/kg kūno masės per parą), arba pastovia koncentracija pašare.

Dozavimas - bendrasis terminas, aprėpiantis dozės dydį, jos davimo dažnumą ir trukmę.

Akivaizdus toksiškumas - bendrasis terminas, apibūdinantis aiškius toksiškumo požymius, pastebimus davus bandomosios cheminės medžiagos. Šių požymių turėtų pakakti pavojui įvertinti ir jie turėtų būti tokie, kad padidinus duodamą dozę būtų galima tikėtis sunkių toksiškumo požymių stiprėjimo ir galbūt gyvūnų gaišimo.

Vaisingumo sumažėjimas - rodo patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sutrikimus.

Toksinis poveikis patelei - neigiamas poveikis vaikingoms patelėms, kuris pasireiškia būdingai (tiesioginis poveikis) arba nebūdingai (netiesioginis poveikis), ir yra susijęs su vaikingumo būsena.

NOAEL - termino *nepastebėto neigiamo poveikio riba* santrumpa. Tai didžiausioji dozė, kurią duodant nepastebima su apdorojimu susijusių neigiamų rezultatų.

Estrogeniškumas - cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus estrogeninis hormonas (pvz., 17β-estradiolis).

Toksiškumas reprodukcijai - rodo neigiamą poveikį palikuoniams ir (arba) patelių ar patinų reprodukcijos funkcijų arba gebos sumažėjimą.

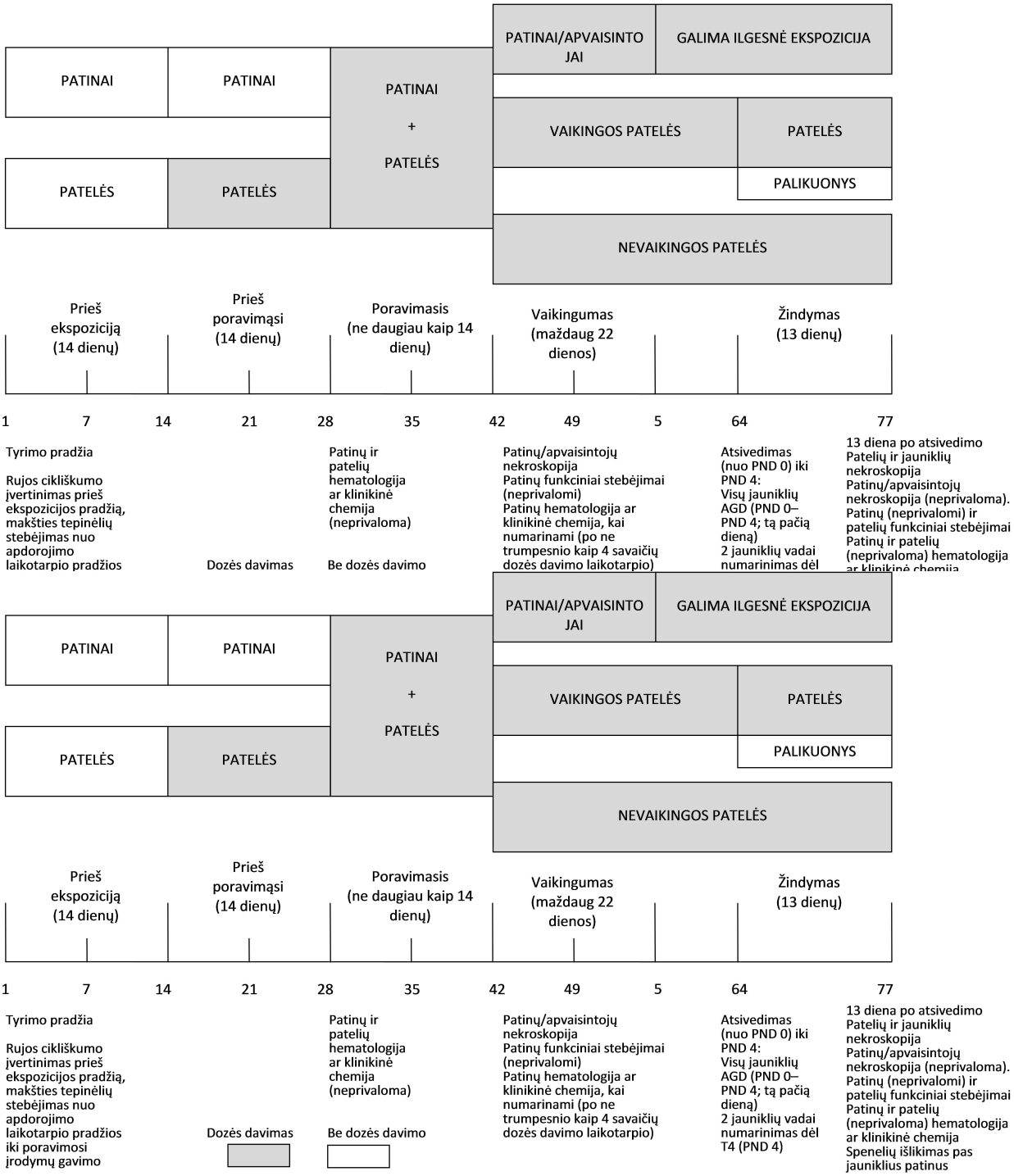
Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.

Tiroidinis aktyvumas - cheminės medžiagos gebėjimas veikti žinduolio organizme kaip natūralus skydliaukės hormonas (pvz., T_3).

Tinkamumo patvirtinimas - mokslinis procesas, skirtas apibūdinti bandymo metodo taikymo charakteristikoms keliamus reikalavimus ir apribojimus bei įrodyti jo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

2 priedėlis

BANDYMO TVARKARAŠČIO SCHEMA, RODANTI DIDŽIAUSIĄJĄ TYRIMO TRUKMĘ, PAGRĮSTĄ VISU 14 DIENŲ PORAVIMOSI LAIKOTARPIU



3 priedėlis

POVEIKIO REPRODUKCIJAI IR (ARBA) VYSTYMUISI ĮVERTINIMO LENTELĖS FORMOS SUVESTINĖ ATASKAITA

STEBĖJIMŲ REZULTATAI	VERTĖS				
Dozavimas (vienetai)	0 (kontrolinis)	…	…	…	…
Porų skaičius pradžioje (skaičius)					
Rujos ciklas (bent vidutinė nereguliariųjų ciklų vidutinė trukmė ir dažnis)					
Patelės, rodančios poravimosi požymius (skaičius)					
Vaikingos patelės (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 1–5 (skaičius)					
Apvaisinimo dienos 6–...() (skaičius).[[1]] [(1)] (skaičius)					
Vaikingumas ≤ 21 diena (skaičius)					
Vaikingumas = 22 dienos (skaičius)					
Vaikingumas ≥ 23 dienos (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių (skaičius)					
Patelės, turinčios gyvų jauniklių 4 dieną po atsivedimo (skaičius)					
Implantai/patelei (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/patelei po atsivedimo (vidurkis)					
Gyvi jaunikliai/patelei 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) po atsivedimo (vidurkis)					
Lyčių santykis (v/m) 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė po atsivedimo (vidurkis)					
Vados masė 4 dieną po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė po atsivedimo (vidurkis)					
Jauniklių masė AGD matavimo metu (vidutinė patinų, vidutinė patelių)					
Jauniklių AGD, matuotas tą pačia dieną – nuo atsivedimo dienos iki 4 dienos (vidutinis patinų, vidutinis patelių, pažymėti dieną po atsivedimo (PND))					

STEBĖJIMŲ REZULTATAI	VERTĖS				
Jauniklių masė 4 dieną (vidurkis)					
Jauniklių masė 13 dieną (vidurkis)					
Spenelių išlikimas pas jauniklius patinus 13 dieną (vidurkis)					
JAUNIKLIAI SU ANOMALIJOMIS					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su ≥ 2					
PALIKUONIŲ NUOSTOLIAI					
Prenataliniai (implantacijos minus gyvų jauniklių skaičius)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					
Postnataliniai (gyvų jauniklių skaičius atsivedimo metu minus gyvų jauniklių skaičius 13 dieną po atsivedimo)					
Patelių su 0					
Patelių su 1					
Patelių su 2					
Patelių su ≥ 3					

([1]) Paskutinė poravimosi laikotarpio diena.

B.65 ODOS ĖSDINIMO *IN VITRO* NAUDOJANT MEMBRANINĘ PERTVARĄ METODAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 435 (2015). Odos ėsdinimu vadinamas negrįžtamasis odos pažeidimas, kuris pasireiškia kaip matoma nekrozė per epidermį į dermį, po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1])). Šis bandymo metodas, atitinkantis atnaujintas EBPO bandymo gaires 435, yra *in vitro* membraninės pertvaros bandymo metodas, kuris gali būti taikomas ėsdinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti. Bandymo metode naudojama dirbtinė membrana, skirta rodyti atsaką ėsdinančioms cheminėms medžiagoms panašiai kaip gyvūnų oda *in situ*.

2. Įprastai odos ėsdinimas buvo vertinamas uždedant bandomąją cheminę medžiagą ant gyvo gyvūno odos ir vertinant audinio pažeidimo laipsnį po tam tikro nustatyto laiko tarpo (2). Be šio bandymo metodo, yra priimti keli kiti *in vitro* bandymo metodai kaip alternatyva (3) (4) standartinei *in vivo* triušio odos procedūrai (šio priedo B.4 skyrius, atitinka EBPO TG 404), naudojamai ėsdinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti (2). Pagal JT GHS odos ėsdinimo vertinimo ir klasifikavimo nuosekliųjų bandymų ir įvertinimo strategiją ir EBPO rekomendaciniame dokumente dėl odos dirginimo ar ėsdinimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) rekomenduojama taikyti patvirtintus ir priimtus *in vitro* 3 ir 4 modulių bandymo metodus (1) (5). IATA aprašomi keli moduliai, kuriuose grupuojami informacijos šaltiniai ir analizės priemonės bei (i) pateikiami nurodymai, kaip integruoti ir naudoti esamus bandymų ir ne bandymų duomenis, skirtus cheminių medžiagų odos dirginimo ir odos ėsdinimo potencialui įvertinti, ir (ii) siūlomas metodas, jei būtini papildomi bandymai, įskaitant, kai nustatomi neigiami rezultatai (5). Pagal šį modulinį metodą gauti teigiami *in vitro* bandymo metodų rezultatai gali būti naudojami cheminei medžiagai priskirti ėsdinančioms, neatliekant bandymų su gyvūnais, ir taip mažinti bei tikslinti gyvūnų naudojimą ir išvengti skausmo bei kančių, kurių galėtų būti, jei šiam tikslui būtų naudojami gyvūnai.

3. Atlikti *in vitro* membraninės pertvaros modelio, parduodamo Corrositex® pavadinimu (6) (7) (8), patvirtinimo tyrimai, pagal kuriuos gautas bendrasis odos ėsdinimo prognozavimo tikslumas – 79 % (128/163), jautris – 85 % (76/89) ir specifiškumas – 70 % (52/74), kai duomenų bazę sudarė 163 medžiagos ir mišiniai (7). Atsižvelgiant į jo pripažintą tinkamumą, šį patvirtintą pamatinį metodą (PPM) rekomenduojama taikyti kaip nuosekliųjų bandymų strategijos dalį, vertinant cheminių medžiagų odos ėsdinimo pavojingumą (5) (7). Prieš *in vitro* odos ėsdinimo membraninės pertvaros modelį naudojant reglamentavimo tikslais, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, kad būtų užtikrintas jo panašumas į PPM (9) pagal naudojimo charakteristikų standartų reikalavimus (10). EBPO abipusis duomenų pripažinimas būtų užtikrintas tik po to, kai pagal PS pasiūlytas naujas arba atnaujintas metodas būtų peržiūrėtas ir įtrauktas į atitinkamas EBPO bandymo gaires. Šiuo metu į EBPO bandymo gaires 435 yra įtrauktas tik vienas *in vitro* metodas, ir šis bandymo metodas – prekyboje esantis Corrositex® modelis.

4. Kiti odos ėsdinimo metodai yra pagrįsti rekonstruotos žmogaus odos (EBPO TG 431) (3) ir izoliuoto žiurkių odos (EBPO TG 430) (4) naudojimu. Šiose bandymo gairėse taip pat pateiktas ėsdinančių cheminių medžiagų skirstymas į tris JT GHS ėsdinančių medžiagų pakategores ir tris JT krovinių pakuotės grupes dėl ėsdinimo pavojaus. Šios bandymo gairės buvo pirmą kartą priimtos 2006 m. ir atnaujintos 2015 m., pateikiant nuorodą į IATA rekomendacinį dokumentą bei atnaujinant kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašą.

APIBRĖŽTYS

5. Vartojamos apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

6. Atliekant šiame metode aprašytą bandymą galima identifikuoti ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas ir atlikti ėsdinančių bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimą į pakategores pagal JT GHS ir CLP (1 lentelė). Be to, toks bandymo metodas gali būti atliekamas transporto sektoriaus tikslais siekiant priimti sprendimus dėl konkrečių klasių cheminių medžiagų ėsdinančių ar neėsdinančių savybių, pvz., organinių ir neorganinių rūgščių, rūgščių darinių ([2]) ir bazių (7) (11) (12). Šiame bandymo metode aprašyta bendroji procedūra yra panaši į patvirtintą pamatinio bandymo

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

([2]) „Rūgšties darinys“ yra nespecifinės klasės pavadinimas ir plačiąja prasme apibrėžiamas kaip iš rūgšties gauta cheminė medžiaga tiesiogiai arba rūgštį modifikavus arba iš atlikus dalinę pakaitų reakciją. Šią klasę sudaro anhidridai, halogenintos rūgštys, druskos ir kitų tipų cheminės medžiagos.

metodo procedūrą (7). Nors taikant šį bandymo metodą negaunama reikiamos informacijos apie odos dirginimą, reikėtų pažymėti, kad B.46 (atitinka EBPO TG 439) bandymo metodu konkrečiai tiriamas odos dirginimo *in vitro* poveikį sveikatai (13). Siekiant išsamiai įvertinti vietinį poveikį odai po vienkartinės odos ekspozicijos, informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente dėl integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (5).

1 lentelė

JT GHS odos ėsdinimo kategorijos ir pakategorės ([1])

Ėsdinimo kategorija (1 kategorija) (institucijos, kurios nenaudoja pakategorių)	Galimos ėsdinimo pakategorės ([1]) (institucijos, naudojančios pakategores, įskaitant CLP reglamentą)	Ėsdinanti ≥ 1 iš 3 gyvūnų	
		Ekspozicijos trukmė	Stebėjimo trukmė
Ėsdinanti	Ėsdinanti 1A pakategorės	≤ 3 min	≤ 1 h
	Ėsdinanti 1B pakategorės	> 3 min/≤ 1 h	≤ 14 dienų
	Ėsdinanti 1C pakategorės	> 1 h/≤ 4 h	≤ 14 dienų

([1]) Pagal ES CLP reglamentą taikomos trys odos ėsdinimo pakategorės 1A, 1B ir 1C.

7. Patvirtinto pamatinio bandymo metodo (7) ribotumas yra tas, kad daug neėsdinančių cheminių medžiagų ir kai kurios ėsdinančios cheminės medžiagos gali netikti bandymui, atsižvelgiant į pradinį suderinamumo bandymą (žr. 13 pastraipą). Vandeniniai cheminių medžiagų tirpalai, kurių pH yra nuo 4,5 iki 8,5 intervale, dažnai netinka bandymui, tačiau 85 % šiame pH intervale bandytų cheminių medžiagų buvo neėsdinančios atliekant bandymus su gyvūnais (7). *In vitro* membraninės pertvaros metodas gali būti taikomas kietosioms medžiagoms (tirpioms ar netirpioms vandenyje), skysčiams (vandeniniams ar nevandeniniams) ir emulsijoms bandyti. Tačiau bandomosios cheminės medžiagos, kurios nesukelia aptinkamo pakitimo atliekant suderinamumo bandymą (t. y. patvirtinto pamatinio bandymo metodo cheminės medžiagos aptikimo sistemos (angl. *Chemical Detection System*, CDS) spalvos pakitimo) negali būti bandomos taikant membraninės pertvaros metodą ir jas reikėtų bandyti taikant kitus metodus.

BANDYMO PRINCIPAS

8. Bandymo sistemą sudaro du komponentai: sintetinė makromolekulinė biologinė pertvara ir cheminės medžiagos aptikimo sistema (CDS); naudojant CDS, šiuo bandymo metodu nustatomas membraninės pertvaros pažeidimas, sukeltas ėsdinančios bandomosios cheminės medžiagos, kai bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant sintetinės makromolekulinės membraninės pertvaros (7) paviršiaus, greičiausiai veikiant vienodam (-iems) ėsdinimo mechanizmui (-ams), kuriuo veikiama gyvoji oda.

9. Prasiskverbimas (arba proveržis) per membraninę pertvarą gali būti matuojamas naudojant kelias procedūras arba CDS, įskaitant pH indikatorinio dažiklio spalvos arba kitos po pertvara esančio indikatoriaus tirpalo savybės pakitimą.

10. Turėtų būti nustatyta, ar membraninė pertvara yra tinkama, t. y., ar ji atitinka numatytą naudojimą ir yra patikima. Turi būti užtikrinta, kad skirtingi preparatai būtų suderinami pertvaros savybių atžvilgiu, pvz., neėsdinančios cheminės medžiagos negalėtų įveikti pertvaros, būtų galima skirstyti cheminių medžiagų ėsdinimo savybes pagal įvairias JT GHS ėsdinimo pakategores (1). Priskiriamas klasifikavimas yra pagrįstas cheminė medžiagos prasiskverbimo per membraninę pertvarą į indikatoriaus tirpalą trukme.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

11. Prieš pradėdamos taikyti šį bandymo metodą atitinkantį *in vitro* membraninės pertvaros metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, teisingai klasifikuodamos dvylika kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų, rekomenduojamų 2 lentelėje. Tais atvejais, kai sąraše nurodytos medžiagos nėra arba, jei būtų pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys (pvz., iš etaloninių cheminių medžiagų sąrašo (10)), jei taikomi tie patys atrankos kriterijai, kaip aprašyta 1 lentelėje.

2 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos ([1])

Medžiaga ([2])	CASRN	Cheminė klasė	*In vivo* JT GHS pakategorė ([3])	*In vitro* JT GHS pakategorė ([3])
Boro trifluorido dihidratas	13319-75-0	Neorganinės rūgštys	1A	1A
Nitrato rūgštis	7697-37-2	Neorganinės rūgštys	1A	1A
Fosforo pentachloridas	10026-13-8	Neorganinių rūgščių pirmtakai	1A	1A
Valerilchloridas	638-29-9	Acilchloridai	1B	1B
Natrio hidroksidas	1310-73-2	Neorganinės bazės	1B	1B
1-(2-aminoetil)piperazinas	140-31-8	Alifatiniai aminai	1B	1B
Benzensulfonilchloridas	98-09-9	Acilchloridai	1C	1C
N,N-dimetilbenzilaminas	103-83-3	Anilinai	1C	1C
Tetraetilenpentaminas	112-57-2	Alifatiniai aminai	1C	1C
Eugenolis	97-53-0	Fenoliai	NĖ	NĖ
Nonilakrilatas	2664-55-3	Akrilatai/metilakrilatai	NĖ	NĖ
Natrio hidrokarbonatas	144-55-8	Neorganinės druskos	NĖ	NĖ

([1]) Dvylika pirmiau išvardytų medžiagų sudaro trys JT GHS ėsdinančių medžiagų kiekvienos pakategorės medžiagos ir trys neėsdinančios medžiagos, kurias nesunku įsigyti iš komercinių tiekėjų, ir JT GHS pakategorė yra pagrįsta aukštos kokybės *in vivo* bandymais. Šios medžiagos yra paimtos iš 40 etaloninių medžiagų sąrašo, įtrauktų į mažiausią sąrašą, kurį sudaro cheminės medžiagos, nurodytos naudoti įrodant bandymo metodų, struktūra ir funkciniu požiūriu panašių į patvirtintą pamatinį bandymo metodą, tikslumą ir patikimumą, ir jos buvo pasirinktos iš 163 etaloninių cheminių medžiagų, iš pradžių naudotų pamatiniam bandymo metodui patvirtinti (Corrositex®) (7) (10) (14). Šios atrankos tikslas buvo įtraukti, kiek tai įmanoma, chemines medžiagas, kurios: atitiko atsakų į ėsdinimą (pvz., neėsdinančios; JT I, II ir III pakuotės grupių ėsdinančios) intervalą, kurį patvirtintu pamatiniu metodu galima išmatuoti arba numatyti; atitiko cheminių medžiagų klases, naudojamas atliekant patvirtinimo tyrimą; turi tinkamai apibūdintą cheminę struktūrą; davė atkuriamus rezultatus pagal patvirtintą pamatinį bandymo metodą; davė rezultatus, nustatytus atliekant *in vivo* pamatinį bandymą; buvo prekyboje; ir nebuvo susijusios su labai didelėmis šalinimo išlaidomis (14).

([2]) Medžiagos bandomos grynos arba ≥ 90 % grynumo.

([3]) Atitinkamos JT pakuotės grupės I, II ir III atitinka JT GHS ir CLP pakategores 1A, 1B ir 1C. NĖ– neėsdinanti.

PROCEDŪRA

12. Toliau pateiktose pastraipose apibūdinami dirbtinės membraninės pertvaros ėsdinimo vertinimo bandymo metodo komponentai ir procedūros (7) (15), pagrįstos esamu PPM, t. y. prekyboje esančiu Corrositex®. Membraninė pertvara, suderinamumo ir (arba) indikatoriaus ir kategorijos priskyrimo tirpalai gali būti sukurti, paruošti arba nupirkti, pvz., PPM Corrositex® atveju. Yra patvirtinto pamatinio bandymo metodo ėminių bandymo metodo protokolas (7). Bandymai turėtų būti atliekami aplinkos temperatūroje (17–25 °C), ir komponentai turėtų atitikti šias sąlygas.

Bandomosios cheminės medžiagos suderinamumo bandymas

13. Prieš atliekant membraninės pertvaros bandymą, atliekamas suderinamumo bandymas, kad būtų galima nustatyti, ar bandomąją cheminę medžiagą yra aptinkama CDS. Jei CDS neaptinka bandomosios cheminės medžiagos, membraninės pertvaros bandymo metodas nėra tinkamas tos konkrečios bandomosios cheminės medžiagos ėsdinimo potencialui įvertinti, todėl turėtų būti taikomas kitas bandymo metodas. Atliekant suderinamumo bandymą naudojama CDS ir ekspozicijos sąlygos turėtų atitikti toliau atliekamo membraninės pertvaros metodo ekspozicijos sąlygas.

Trukmės kategorijos priskyrimo bandomajai cheminei medžiagai bandymas

14. Jei reikia taikant bandymo metodą, turėtų būti atliekamas trukmės kategorijos priskyrimo suderinamumo bandymo reikalavimus atitikusiai bandomajai cheminei medžiagai bandymas, t. y. atrankos bandymas, kad būtų galima atskirti stipriąsias ir silpnąsias rūgštis ar bazes. Pavyzdžiui, taikant patvirtintą pamatinį bandymo metodą, trukmės kategorijos priskyrimo bandymas naudojamas, siekiant nustatyti, kurią iš dviejų trukmės verčių reikėtų imti, atsižvelgiant į tai, ar nustatyta reikšminga rūgšties ar šarmo atsarga. Nustatant ėsdinimo savybes ir JT GHS odos ėsdinimo pakategores, turėtų būti naudojamos dvi skirtingos proveržio trukmės vertės, pagrįstos bandomosios cheminės medžiagos rūgšties arba šarmo atsarga.

MEMBRANINĖS PERTVAROS BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Membraninė pertvara

15. Membraninę pertvarą sudaro du komponentai: baltyminis makromolekulinis vandeninis gelis ir pralaidi laikančioji membrana. Baltyminis gelis turėtų būti nepralaidus skysčiams ir kietosioms medžiagoms, bet jis gali būti ėsdinamas ir taip tapti pralaidus. Visiškai sukonstruota membraninė pertvara turėtų būti laikoma iš anksto nustatytomis sąlygomis, įrodančiomis apsaugą nuo gelio savybių blogėjimo, pvz., džiūvimo, mikrobų augimo, poslinkio, pleišėjimo, dėl ko blogėtų jos veiksmingumas. Turėtų būti nustatytas priimtinas laikymo laikotarpis ir membraninės pertvaros ruošiniai nebūtų naudojami jam pasibaigus.

16. Pralaidi laikančioji membrana yra mechaninis baltyminio gelio pagrindas jo susidarymo proceso metu ir ekspozicijos bandomajai cheminei medžiagai metu. Pralaidi laikančioji membrana turėtų apsaugoti nuo gelio persimetimo arba poslinkio ir lengvai praleisti visas bandomąsias chemines medžiagas.

17. Baltyminis gelis, sudarytas iš gelio matricą formuojančių baltymų, pvz., keratino, kolageno, arba jų mišinio, yra bandomosios cheminės medžiagos ėsdinama medžiaga. Baltyminė medžiaga dedama ant laikančiosios membranos paviršiaus ir paliekama sustingti prieš dedant membraninę pertvarą virš indikatoriaus tirpalo. Baltyminis gelis turėtų būti vienodo storio ir tankio, be oro burbuliukų arba defektų, galinčių paveikti jo funkcinį vientisumą.

Cheminės medžiagos aptikimo sistema (CDS)

18. Indikatoriaus tirpalas, kuris yra atliekant suderinamumo bandymą naudotas tirpalas, turėtų aptikti bandomosios cheminės medžiagos buvimą. Reikėtų naudoti pH indikatorinį dažiklį arba dažiklių mišinį, pvz., krezolio raudonąjį ir metilo oranžinį, kuris keistų spalvą, reaguodamas į bandomosios cheminės medžiagos buvimą. Matavimo sistema gali būti regimoji arba elektroninė.

19. Aptikimo sistemos, sukurtos bandomosios cheminės medžiagos proveržiui per membraninę pertvarą aptikti, turėtų būti vertinamos dėl savo tinkamumo ir patikimumo, kad būtų galima parodyti aptinkamų cheminių medžiagų grupes ir kiekybinio aptikimo ribas.

BANDYMO EIGA

Bandymo metodo komponentų surinkimas

20. Membraninė pertvara dedama į buteliuką (arba mėgintuvėlį) su indikatoriaus tirpalu taip, kad laikančioji membrana visiškai liestų indikatoriaus tirpalą ir nebūtų oro burbuliukų. Reikėtų imtis priemonių pertvaros vientisumui užtikrinti.

Bandomosios cheminės medžiagos uždėjimas

21. Tinkamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, pvz., 500 µl skysčio arba 500 mg smulkių kietosios medžiagos miltelių (7), atsargiai dedamas ant viršutinio membraninės pertvaros paviršiaus ir tolygiai paskirstomas. Paruošiamas tinkamas kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos kartotinių ėminių ir jos kontrolinių ėminių skaičius, pvz., keturi (7) (žr. 23–25 pastraipas). Registruojamas bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ant membraninės pertvaros laikas. Siekiant užtikrinti, kad būtų tiksliai registruojamos trumpos ėsdinimo trukmės vertės, bandomosios cheminės medžiagos dėjimas į kartotinių ėminių buteliukus suskirstomas pagal laiką.

Prasiskverbimo per membraninę pertvarą matavimas

22. Kiekvienas buteliukas yra tinkamai stebimas ir registruojamas indikatoriaus tirpalo pirmojo spalvos pasikeitimo laikas, t. y. prasiskverbimas per pertvarą, ir nustatomas laikas nuo uždėjimo iki prasiskverbimo per membraninę pertvarą.

Kontroliniai ėminiai

23. Atliekant bandymus, susijusius su bandomosios cheminės medžiagos nešiklio ar tirpiklio naudojimu, nešiklis arba tirpiklis turėtų būti suderinami su membraninės pertvaros sistema, t. y. neturėtų pakeisti membraninės pertvaros vientisumo ar bandomosios cheminės medžiagos ėsdinimo savybių. Jei tinka, tirpiklio (arba nešiklio) kontroliniai ėminiai turėtų būti bandomi vienu metu su bandomąja chemine medžiaga, kad būtų įrodytas tirpiklio suderinamumas su membraninės pertvaros sistema.

24. Vienu metu su bandomąja chemine medžiaga turėtų būti bandoma tarpinių ėsdinimo savybių teigiama (ėsdinanti) kontrolinė medžiaga, pvz., 110 ± 15 mg natrio hidroksido (JT GHS ėsdinimo 1B pakategorė) (7), kad būtų galima įvertinti, ar bandymo sistema veikia priimtinu būdu. Antroji teigiama kontrolinė medžiaga, kuri būtų tos pačios cheminių medžiagų klasės kaip bandomoji cheminė medžiaga, gali būti naudinga vertinant ėsdinančios bandomosios cheminės medžiagos santykinį ėsdinimo potencialą. Turėtų būti parenkama (-os) tarpinių ėsdinimo savybių teigiama (-os) kontrolinė (-ės) medžiaga (-os) (pvz., JT GHS pakategorės 1B), kad būtų galima nustatyti prasiskverbimo trukmės pokyčius, kurie gali būti nepriimtinai ilgesni ar trumpesni nei nustatyta pamatinė vertė ir taip rodyti netinkamą bandymo sistemos veikimą. Šiuo tikslu mažai duotų naudos stipriai ėsdinančios (JT GHS 1A pakategorės) arba neėsdinančios cheminės medžiagos. Naudojant ėsdinančią JT GHS 1B pakategorės cheminę medžiagą, būtų galima aptikti per trumpą arba per ilgą proveržio trukmę. Silpnai ėsdinanti medžiaga (JT GHS 1C pakategorės) gali būti naudojama kaip teigiama kontrolinė medžiaga, kad būtų galima išmatuoti bandymo metodo gebėjimą nuolat atskirti silpnai ėsdinančias ir neėsdinančias chemines medžiagas. Nepriklausomai nuo taikomo metodo, priimtinas teigiamos kontrolinės medžiagos atsako intervalas turėtų būti gautas pagal naudojamų teigiamos (-ų) kontrolinės (-ių) medžiagos (-ų) istorinių proveržio trukmių intervalą, pvz., vidurkis ± 2–3 standartiniai nuokrypiai. Atliekant kiekvieną tyrimą, turėtų būti nustatyta teigiamos kontrolinės medžiagos proveržio trukmė, kad būtų galima aptikti į priimtiną intervalą nepatenkančius nukrypimus.

25. Vienu metu su bandomąja chemine medžiaga turėtų būti bandoma neigiama (neėsdinanti) kontrolinė medžiaga, pvz., 10 % citrinų rūgštis, 6 % propano rūgštis (7), kaip kita kokybės kontrolės priemonė, rodanti membraninės pertvaros funkcinį vientisumą.

Tyrimo priimtinumo kriterijai

26. Pagal nustatytus kiekvienos JT GHS ėsdinimo pakategorės trukmės parametrus, bandomosios cheminės medžiagos ėsdinimas prognozuojamas, naudojant trukmę (minutėmis) nuo bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ant membraninės pertvaros iki prasiskverbimo per ją. Tyrimas būtų laikomas priimtinu, jei atliekant vienalaikį teigiamos kontrolinės medžiagos bandymą būtų gauta tikėtina atsako trukmė (pvz., 8–16 min. natrio hidroksido proveržio trukmė, jei jis naudojamas kaip teigiama kontrolinė medžiaga), vienu metu bandoma neigiama kontrolinė medžiaga neturėtų būti ėsdinanti ir, jei įtrauktas, tirpiklio kontrolinis ėminys neturėtų būti ėdinantis ar pakeisti bandomosios cheminės medžiagos ėsdinimo potencialą. Prieš pradėdamos taikyti šį bandymo metodą atitinkantį metodą įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, naudodamos dvylika cheminių medžiagų, rekomenduojamų 2 lentelėje. Jei pagal šį bandymo metodą kuriami nauji analogiški metodai, kurie struktūra ir funkciniu požiūriu yra panašūs į patvirtintą pamatinį metodą (14), turėtų būti naudojami iš anksto nustatyti naudojimo charakteristikų standartai naujo metodo patikimumui ir tikslumui įrodyti prieš pradedant jį taikyti reglamentavimo bandymams (10).

Rezultatų aiškinimas ir bandomųjų cheminių medžiagų ėsdinimo savybių klasifikavimas

27. Bandomoji cheminė medžiaga klasifikuojama pagal JT GHS ėsdinimo pakategores (1) ir, jei taikoma, jai priskiriama JT pakavimo grupė (16), atsižvelgiant į trukmę (minutėmis) nuo bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo ant membraninės pertvaros iki prasiskverbimo per ją. Kiekvienam siūlomam bandymo metodui nustatomos trijų ėsdinimo pakategorių ribinės trukmės vertės. Priimant galutinis sprendimus dėl ribinių trukmės verčių reikėtų atsižvelgti į būtinumą kiek įmanoma sumažinti ėsdinimo pavojaus priskyrimą žemesnei kategorijai (t. y. klaidingai neigiamų rezultatų). Šiose bandymo gairėse reikėtų naudoti 3 lentelėje nurodytas Corrositex® ribines trukmės vertes, nes jos atitinka vienintelį į bandymo gaires įtrauktą bandymo metodą (7).

3 lentelė

Corrositex® prognozavimo modelis

Vidutinė proveržio trukmė (min)		JT GHS prognozė (3)
1 kategorijos bandomosios cheminės medžiagos (1) (nustatytos pagal metodo kategorijos priskyrimo bandymą)	2 kategorijos bandomosios cheminės medžiagos (2) (nustatytos pagal metodo kategorijos priskyrimo bandymą)	
0–3 min	0–3 min	Ėsdinanti, neprivaloma pakategorė 1A
nuo > 3 iki 60 min	nuo > 3 iki 30 min	Ėsdinanti, neprivaloma pakategorė 1B
nuo > 60 iki 240 min	nuo > 30 iki 60 min	Ėsdinanti, neprivaloma pakategorė 1C
> 240 min	> 60 min	Neėsdinanti

(1) Bandomosios cheminės medžiagos su didele rūgšties arba šarmo atsarga (6).
(2) Bandomosios cheminės medžiagos su maža rūgšties arba šarmo atsarga (6).
(3) JT GHS 1A, 1B ir 1C pakategorės atitinka I, II ir III JT pakuotės grupes.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

28. Trukmė (minutėmis) nuo bandomosios cheminės medžiagos ir teigiamos (-ų) kontrolinės (-ių) medžiagos (-ų)uždėjimo iki jų prasiskverbimo per pertvarą būti pateikiama lentelės forma, nurodant atskirus kartotinių bandymų duomenis, kiekvieno bandymo vidurkį ± standartinį nuokrypį.

Bandymo ataskaita

29. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos

— Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

— daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— šaltinis, partijos numeris, jei yra;

— bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jei tai atliekama (pvz., šildymas, malimas);

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, naudojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma;

— laikymo sąlygos.

Nešiklis:

— identifikavimo duomenys, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris;

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Naudotas in vitro membraninės pertvaros modelis ir protokolas, įskaitant įrodytą tikslumą ir patikimumą

Bandymo sąlygos

— naudotos aparatūros ir ruošimo procedūrų aprašymas;

— naudotos *in vitro* membraninės pertvaros šaltinis ir sudėtis;

— indikatoriaus tirpalo sudėtis ir savybės;

— aptikimo metodas;

— bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių medžiagų kiekiai;

— kartotinių bandymų skaičius;

— trukmės kategorijos priskyrimo bandymo aprašymas ir pagrindimas;

— uždėjimo būdas;

— stebėjimo trukmės vertės;

— taikytų įvertinimo ir klasifikavimo kriterijų aprašymas;

— bandymo metodo taikymo kvalifikacijos įrodymas prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas chemines medžiagas.

Rezultatai:

— kiekvieno kartotinio bandymo atskirų bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių ėminių rezultatų duomenys lentelėse;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;

— gautas klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

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. Pateikta http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Šio priedo B.4 skyrius. Ūmus odos dirginimas, ėsdinimas.

(3) Šio priedo B.40bis skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. rekonstruoto žmogaus epidermio (RŽE) bandymo metodas.

(4) Šio priedo B.40 skyrius. Odos suardymas *in vitro*. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas.

(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. Pateikta 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) Šio priedo B.46 skyrius, *In Vitro* odos dirginimas. Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodas. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Pateikta http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Pateikta 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. Pateikta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas– bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (9).

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Cheminės medžiagos aptikimo sistema (CDS)– regimojo nustatymo arba elektroninė matavimo sistema su indikatoriniu tirpalu, reaguojanti į bandomosios cheminės medžiagos buvimą, pvz., esant bandomajai cheminei medžiagai, pasikeičia pH indikatorinio dažiklio arba dažiklių mišinio spalva arba vyksta kitų tipų cheminės ar elektrocheminės reakcijos.

Sutapimas– bandymo metodo, kuriuo gaunamas su kategorija susijęs rezultatas, taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas kartais vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų bandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuojamos kaip teigiamos arba neigiamos. Sutapimas labai priklauso nuo tiriamos bandomosios cheminės medžiagos tipui gautų teigiamų rezultatų dalies (9).

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema)– sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

IATA– integruotasis bandymo ir vertinimo metodas.

Mišinys– dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga– medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga– medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

NĖ– neėsdinanti.

Naudojimo charakteristikų standartai– patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) panašūs tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (9).

Tinkamumas– santykio tarp bandymo metodo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra bandymo metodo, taikomo tiriamam biologiniam poveikiui matuoti ar prognozuoti, tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (9).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis vertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (9).

Jautris– visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Odos ėsdinimas *in vivo*– negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma dermio nekrozė per *epidermį*, praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo. Atsakas į ėsdinimą yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, pasibaigus 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Specifiškumas– visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos taikant bandymo metodą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (9).

Medžiaga– natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

B.66 STABILIAI TRANSFEKUOTOS TRANSAKTYVACIJOS *IN VITRO* BANDYMAI ESTROGENŲ RECEPTORIŲ AGONISTAMS IR ANTAGONISTAMS APTIKTI

BENDRASIS ĮVADAS

EBPO į rezultatus orientuotos bandymo gairės

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 455 (2016). TG 455 yra į rezultatus orientuotos bandymo gairės (PBTG), aprašančios stabiliai transfekuotos transaktyvacijos *in vitro* bandymo metodus, siekiant aptikti estrogenų receptorių agonistus ir antagonistus (ER TA bandymai). Jas sudaro keletas mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašių bandymo metodų estrogenų receptorių (t. y. ERα ir (arba) ERβ) agonistams ir antagonistams identifikuoti, ir jos turėtų palengvinti naujų panašių ar modifikuotų bandymų metodų kūrimą, atsižvelgiant į patvirtinimo principus, išdėstytus EBPO rekomendaciniame dokumente dėl naujų ar atnaujintų pavojaus vertinimo bandymo metodų patvirtinimo ir tarptautinio pripažinimo (1). Visiškai patvirtinti pamatiniai bandymo metodai (2 priedėlis ir 3 priedėlis), kurie sudaro šių į rezultatus orientuotų bandymo gairių pagrindą, yra:

— stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (STTA) bandymas (2) naudojant (h) ERα-HeLa-9903 ląstelių liniją; ir

— VM7Luc ER TA bandymas (3), naudojant VM7Luc4E2 ląstelių liniją ([1]), kuri daugiausia ekspresuoja hERα ir kažkiek hERβ (4) (5).

Yra naudojimo charakteristikų standartai (6) (7), kuriuos reikėtų naudoti vystant ir patvirtinant bandymus dėl tos pačios pavojaus vertinamosios baigties. Būtų galima laiku iš dalies pakeisti PBTG 455, kad nauji panašūs bandymai galėtų būti įtraukti į atnaujintas PBTG; tačiau panašūs bandymai bus įtraukti tik tada, kai tik EBPO atliks peržiūrą ir sutiks, kad jie atitinka naudojimo charakteristikų standartus. Į TG 455 įtraukti bandymai gali būti naudojami sprendžiant be skirtumo klausimus, susijusius su EBPO valstybės narės reikalavimais estrogenų receptorių transaktyvacijos bandymo rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

Į šį bandymo metodą įtrauktų bandymų pagrindimas ir principai

2. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėta labai svarbi veikla, kurios tikslas – patikslinti esamas ir parengti naujas galimų endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema (CF) buvo peržiūrėta 2012 m. Originalios ir peržiūrėtos CF yra įtrauktos kaip priedai į EBPO rekomendacinį dokumentą dėl endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų vertinimo standartizuotų bandymo gairių (8). CF sudaro penki lygiai, kai kiekvienas lygis atitinka skirtingą biologinio sudėtingumo lygį. Šiame bandymo metode aprašyti ER transaktyvacijos (TA) bandymai yra 2 lygio ir juos sudaro *in vitro bandymai, kuriais gaunami duomenys apie pasirinktą (-us) endokrininį (-ius) mechanizmą (-us) ir (arba) kelią (-ius)*. Šis bandymo metodas taikomas *in vitro* transaktyvacijos (TA) bandymams, skirtiems identifikuoti estrogenų receptorių (ER) agonistus ir antagonistus.

3. Estrogenų sąveika su estrogenų receptoriais gali turėti įtakos estrogenų valdomų genų transkripcijai, kuri gali sukelti arba slopinti ląstelių procesus, įskaitant tuos, kurie yra būtini ląstelių proliferacijai, normaliam vaisiaus vystymuisi ir reprodukcijos funkcijai (9) (10) (11). Normalių estrogeninių sistemų sutrikimas gali sukelti neigiamą poveikį normaliam vystymuisi (ontogenezei), reprodukcinei sveikatai ir reprodukcijos sistemos vientisumui.

4. *In vitro* TA bandymai yra pagrįsti tiesiogine arba netiesiogine medžiagų sąveika su specifiniu receptoriumi, kuris reguliuoja reporterinio geno produkto transkripciją. Tokie bandymai yra plačiai naudojami, kai reikia įvertinti specifiniais branduolio receptoriais, pvz., estrogenų receptoriais, reguliuojamą genų ekspresiją (12) (13) (14) (15) (16). Jie yra pasiūlyti ER reguliuojamai estrogeninei transaktyvacijai aptikti (17) (18) (19). Yra mažiausiai du pagrindiniai branduolio ER potipiai, α ir β, kuriuos koduoja atskiri genai. Atitinkami baltymai turi skirtingas biologines funkcijas, taip pat skirtingą pasiskirstymą audiniuose ir ligandų prijungimo gimiringumus (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Branduolio ERα tarpininkauja klasikiniam estrogeniniam atsakui (27) (28) (29) (30), todėl dauguma šiuo metu kuriamų ER aktyvinimo arba slopinimo matavimo modelių yra skirti ERα. Bandymai naudojami identifikuoti cheminėms medžiagoms, kurios aktyvina (arba slopina) ER po ligandų prijungimo, kai gautas receptoriaus ir ligando

kompleksas prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir transaktyvina reporterinį geną, dėl ko padidėja ląstelių baltymo žymeklio ekspresija. Atliekant šiuos bandymus galima naudoti skirtingus reporterio atsakus. Liuciferaze pagrįstose sistemose liuciferazės fermentas paverčia liuciferino substratą bioliuminescenciniu produktu, kurį galima kiekybiškai išmatuoti liuminometru. Kiti įprastinių reporterių pavyzdžiai yra fluorescencinis baltymas ir *LacZ* genas, koduojantis *β*-galaktozidazę, fermentą, galintį paversti bespalvį substratą X-gal (5-brom-4-chlor-indolilgalaktopiranozidą) mėlynos spalvos produktu, kuri galima kiekybiškai nustatyti spektrofotometru. Šie reporteriai gali būti įvertinti greitai ir nebrangiai prekyboje esančiais bandymo rinkiniais.

5. STTA ir VM7Luc TA bandymų patvirtinimo tyrimai įrodė jų tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (3) (4) (5) (30). Liuminescencija pagrįstų ER TA bandymų, naudojančių krutų ląsteles, naudojimo charakteristikų standartai yra įtraukti į ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaitą dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* bandymas cheminių medžiagų, kaip žmogaus estrogenų receptorių agonistų ir antagonistų, aktyvumui identifikuoti (3). Šie naudojimo charakteristikų standartai yra modifikuoti, kad juos būtų galima naudoti STTA ir VM7Luc TA bandymams (2).

6. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

TA bandymų taikymo sritis ir su jais susiję apribojimai

7. Šie bandymai yra siūlomi atrankos ir pirmumo nustatymo tikslais, tačiau taip pat gali suteikti informacijos apie mechanizmą, kuri gali būti naudojama taikant įrodomosios vertės analizės metodą. Jie nagrinėja TA, sukeltą cheminių medžiagų prijungimo prie ER *in vitro* sistemoje. Todėl rezultatų nereikėtų tiesiogiai ekstrapoliuoti į nepaliestos endokrininės sistemos *in vivo* sudėtingą signalizavimą ir reguliavimą.

8. ER tarpininkaujama TA laikoma vienu iš pagrindinių endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, nors yra kitų endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, įskaitant i) sąveikas su kitais receptoriais ir fermentų sistemomis endokrininės sistemos viduje, ii) hormonų sintezę, iii) hormonų metabolinį aktyvinimą ir (arba) inaktyvinimą, iv) hormonų pasiskirstymą tiksliniuose audiniuose ir v) hormonų pašalinimą iš kūno. Nei viename pagal šį bandymo metodą atliekamų bandymų šie veikimo būdai nenagrinėjami.

9. Taikant šį bandymo metodą tiriamas cheminių medžiagų gebėjimas aktyvinti (t. y. veikti kaip agonistai), taip pat slopinti (t. y. veikti kaip antagonistai) nuo ER priklausomą transkripciją. Priklausomai nuo ląstelių tipo, kai kurios cheminės medžiagos elgtis kaip atrankieji estrogenų receptorių moduliatoriai (SERM) ir būti aktyvios kaip agonistai ir antagonistai. Cheminės medžiagos, kurios atliekant šiuos bandymus yra neigiamos, gali būti įvertintos prijungimo prie ER bandyme prieš darant išvadą, kad cheminė medžiaga nesijungia prie receptoriaus. Be to, bandymai gali tik su tam tikra tikimybe informuoti apie pradinės molekulės aktyvumą, turint omenyje ribotą *in vitro* ląstelių sistemų metabolinio aktyvinimo gebą. Atsižvelgiant į tai, kad atliekant patvirtinimą buvo naudotos tik atskiros medžiagos, tinkamumo mišiniams klausimas nebuvo sprendžiamas. Bandymų metodas vis dėlto teoriškai tinka daugiakomponentėms medžiagoms, UVCB ir mišiniams bandyti. Prieš taikant bandymų metodą daugiakomponentei medžiagai, UVCB ir mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

10. Informacijos tikslais 1 lentelėje pateikti agonistų bandymo rezultatai, gauti 34 medžiagoms, kurios buvo bandomos taikant abu šiame bandymo metode aprašytus visiškai patvirtintus pamatinius bandymo metodus. 26 iš šių medžiagų klasifikuojamos kaip visiškai nustatyti ER agonistai ir 8 kaip neigiamos, atsižvelgiant į paskelbtas ataskaitas, įskaitant *in vitro* prijungimo prie ER ir TA bandymus ir (arba) uterotrofinio poveikio bandymą (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). 2 lentelėje pateikti antagonistų bandymo rezultatai, gauti 15 medžiagų, kurios buvo bandomos taikant abu šiame bandymo metode aprašytus visiškai patvirtintus pamatinius bandymo metodus. 4 iš šių medžiagų klasifikuojamos kaip visiškai nustatyti arba numanomi ER antagonistai ir 10 kaip neigiamos, atsižvelgiant į paskelbtas ataskaitas, įskaitant *in vitro* prijungimo prie ER ir TA bandymus (2) (3) (18) (31). Atsižvelgiant į 1 ir 2 lentelėse apibendrintus duomenis, buvo 100 % visų medžiagų klasifikavimo pagal abu pamatinius metodus sutapimas, išskyrus vieną antagonistų bandymo medžiagą (mifepristoną), ir kiekviena medžiaga buvo teisingai klasifikuota kaip ER agonistas arba antagonistas arba neigiama. Papildoma informacija apie šią cheminių medžiagų grupę, taip pat apie papildomas chemines medžiagas, kurios buvo bandomos atliekant STTA ir VM7Luc ER TA bandymų patvirtinimo tyrimus, pateikiama ER TA naudojimo charakteristikų standartuose (6) (7), 2 priedėlis (1, 2 ir 3 lentelės).

1 lentelė

STTA ir VM7Luc ER TA bandymų rezultatų, gautų medžiagoms, bandomoms atliekant abu agonistų bandymus, ir klasifikuojamoms kaip ER agonistai (TEIG) arba kaip neigiamos medžiagos (NEIG), apžvalga

	Medžiaga	CASRN	STTA bandymas (1)			VM7Luc ER TA bandymas (2)		Klasifikavimo duomenų šaltinis (4)		
			ER TA aktyvumas	PC_{10} vertė (M)	PC_{50} vertėb (b) (M)	ER TA aktyvumas	**EC_{50} vertė** (b), (3) (M)	Kiti ER TA bandymai (c)	Jungimas prie ER	Uterotrofinis poveikis
1	17β- (a)	50-28-2	TEIG	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	TEIG	$5{,}63 \times 10^{-12}$	TEIG (227/227)	TEIG	TEIG
2	17*β*-estradiolis (a)	57-91-0	TEIG	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	TEIG	$1{,}40 \times 10^{-9}$	TEIG(11/11)	TEIG	TEIG
3	17α-etinilestradiolis (a)	57-63-6	TEIG	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	TEIG	$7{,}31 \times 10^{-12}$	TEIG(22/22)	TEIG	TEIG
4	17*β*–trenbolonas	10161-33-8	TEIG	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	TEIG	$4{,}20 \times 10^{-8}$	TEIG (2/2)	neb	neb
5	19-nortestosteronas (a)	434-22-0	TEIG	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	TEIG	$1{,}80 \times 10^{-6}$	TEIG(4/4)	TEIG	TEIG
6	4-kumilfenolis (a)	599-64-4	TEIG	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	TEIG	$3{,}20 \times 10^{-7}$	TEIG(5/5)	TEIG	neb
7	4-*tret*-oktilfenolis (a)	140-66-9	TEIG	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	TEIG	$3{,}19 \times 10^{-8}$	TEIG(21/24)	TEIG	TEIG
8	Apigeninas (a)	520-36-5	TEIG	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	TEIG	$1{,}60 \times 10^{-6}$	TEIG(26/26)	TEIG	neb

	Medžiaga	CASRN	STTA bandymas (1)			VM7Luc ER TA bandymas (2)		Klasifikavimo duomenų šaltinis (4)		
			ER TA aktyvumas	PC_{10} vertė (M)	PC_{50} vertėb (b) (M)	ER TA aktyvumas	**EC_{50} vertė** (b), (3) (M)	Kiti ER TA bandymai (c)	Jungimas prie ER	Uterotrofinis poveikis
9	Atrazinas (a)	1912-24-9	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG (30/30)	NEIG	neb
10	Bisfenolis A (a)	80-05-7	TEIG	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	TEIG	$5{,}33 \times 10^{-7}$	TEIG (65/65)	TEIG	TEIG
11	Bisfenolis B (a)	77-40-7	TEIG	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	TEIG	$1{,}95 \times 10^{-7}$	TEIG(6/6)	TEIG	TEIG
12	Butilbenzilftalatas (a)	85-68-7	TEIG	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	TEIG	$1{,}98 \times 10^{-6}$	TEIG(12/14)	TEIG	NEIG
13	Kortikosteronas (a)	50-22-6	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG(6/6)	NEIG	neb
14	Kumestrolis (a)	479-13-0	TEIG	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	TEIG	$1{,}32 \times 10^{-7}$	TEIG(30/30)	TEIG	neb
15	Daidzeinas (a)	486-66-8	TEIG	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	TEIG	$7{,}95 \times 10^{-7}$	TEIG(39/39)	TEIG	TEIG
16	Dietilstilbestrolis (a)	56-53-1	TEIG	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	TEIG	$3{,}34 \times 10^{-11}$	TEIG(42/42)	TEIG	neb
17	Di-*n*-butilftalatas	84-74-2	TEIG	$4{,}09 \times 10^{-6}$		TEIG	$4{,}09 \times 10^{-6}$	TEIG(6/11)	TEIG	NEIG
18	Etilparabenas	120-47-8	TEIG	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(nėra PC_{50})	TEIG	$2{,}48 \times 10^{-5}$	TEIG		neb
19	Estronas (a)	53-16-7	TEIG	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	TEIG	$2{,}34 \times 10^{-10}$	TEIG(26/28)	TEIG	TEIG
20	Genisteinas (a)	446-72-0	TEIG	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	TEIG	$2{,}71 \times 10^{-7}$	TEIG(100/102)	TEIG	TEIG

	Medžiaga	CASRN	STTA bandymas (1)			VM7Luc ER TA bandymas (2)		Klasifikavimo duomenų šaltinis (4)		
			ER TA aktyvumas	PC_{10} vertė (M)	PC_{50} vertėb (b) (M)	ER TA aktyvumas	**EC_{50} vertė** (b), (3) (M)	Kiti ER TA bandymai (c)	Jungimas prie ER	Uterotrofinis poveikis
21	Haloperidolis	52-86-8	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG (2/2)	NEIG	neb
22	Kempferolis (a)	520-18-3	TEIG	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	TEIG	$3{,}99 \times 10^{-6}$	TEIG(23/23)	TEIG	neb
23	Keponas (a)	143-50-0	TEIG	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	TEIG	$4{,}91 \times 10^{-7}$	TEIG(14/18)	TEIG	neb
24	Ketokonazolas	65277-42-1	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG (2/2)	NEIG	neb
25	Linuronas (a)	330-55-2	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG (8/8)	NEIG	neb
26	*Mezo*-heksestrolis (a)	84-16-2	TEIG	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	TEIG	$1{,}65 \times 10^{-11}$	TEIG(4/4)	TEIG	neb
27	Metiltestosteronas (a)	58-18-4	TEIG	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	TEIG	$2{,}68 \times 10^{-6}$	TEIG(5/6)	TEIG	neb
28	Morinas	480-16-0	TEIG	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	TEIG	$2{,}37 \times 10^{-6}$	TEIG(2/2)	TEIG	neb
29	Noretinodrelis (a)	68-23-5	TEIG	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	TEIG	$9{,}39 \times 10^{-10}$	TEIG(5/5)	TEIG	neb
30	*p,p'*-metoksichlora-NEIGs (a)	72-43-5	TEIG	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(nėra PC_{50}) (b)	TEIG	$1{,}92 \times 10^{-6}$	TEIG(24/27)	TEIG	TEIG
31	Fenobarbitalis (a)	57-30-7	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG(2/2)	NEIG	neb

	Medžiaga	CASRN	STTA bandymas (1)			VM7Luc ER TA bandymas (2)		Klasifikavimo duomenų šaltinis (4)		
			ER TA aktyvumas	PC_{10} vertė (M)	PC_{50} vertėb (b) (M)	ER TA aktyvumas	**EC_{50} vertė** (b), (3) (M)	Kiti ER TA bandymai (c)	Jungimas prie ER	Uterotrofinis poveikis
32	Rezerpinas	50-55-5	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG(4/4)	NEIG	neb
33	Spironolaktonas (a)	52-01-7	NEIG	—	—	NEIG	—	NEIG(4/4)	NEIG	neb
34	Testosteronas	58-22-0	TEIG	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	TEIG	$1{,}75 \times 10^{-5}$	TEIG(5/10)	TEIG	neb

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; M – molinė koncentracija; EC_{50} – pusė didžiausiosios efektyviosios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga; neb – nebandyta; PC_{10} (ir PC_{50}) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant atsakas yra 10 % (arba 50 %, kai PC_{50}) teigiamos kontrolinės medžiagos (E2, 1 nm) atsako kiekvienoje plokštelėje.

(a) STTA ir VM7Luc ER TA bandymams naudotos gerai žinomos medžiagos, nurodytos kaip ER agonistai ar neigiamos medžiagos, kurios buvo naudojamos tikslumui įvertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą (ICCVAM VM7Luc ER TA įvertinimo ataskaita, 4-1 lentelė (3)).

(b) Didžiausioji bandymo koncentracija, kai nėra apribojimų dėl citotoksiškumo arba netirpumo, buvo 1×10^{-5} M (STTA bandymas) ir 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA bandymas).

(c) Skaičius skliaustuose rodo bandymo rezultatus, klasifikuojamus kaip teigiamus (TEIG) arba neigiamus (NEIG) visam skaičiui nurodytų tyrimų.

(1) Vertės, paskelbtos bandymo *Stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (TA) bandymas estrogeniniam aktyvumui aptikti. Žmogaus estrogenų receptoriaus alfa tarpininkaujamas reporterinio geno bandymas, naudojant hER-HeLa-9903 ląstelių liniją* parengiamojo patvirtinimo ir tarplaboratorinio patvirtinimo ataskaitos projekte (2)

(2) ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaita dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* metodas ER agonistams ir antagonistams identifikuoti (3)

(3) Vidutinės EC_{50} vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).

(4) Klasifikavimas kaip ER agonisto ar neigiamos medžiagos buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymo metodų ICCVAM bendrųjų apžvalginių dokumentų (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31) informacija, taip pat informacija, gauta iš leidinių, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Pastabos. Kiekvienas bandymas pagal šį bandymo metodą neturi tų pačių matuojamų dydžių. Kai kuriomis aplinkybėmis EC_{50} negali būti apskaičiuota, nes negaunama visa atsako priklausomybės nuo dozės kreivė. STTA bandymo pagrindinis matuojamas dydis yra PC_{10} vertė, bet taip pat gali būti kitų pavyzdžių, kai naudingos informacijos galima gauti naudojant PC_x.

2 lentelė

STTA ir VM7Luc ER TA bandymų rezultatų, gautų abiejuose antagonistų bandymuose bandytoms ir kaip ER antagonistai (TEIG) arba kaip neigiamos klasifikuojamoms medžiagoms, palyginimas

	Medžiaga [a]	CASRN	ER STTA bandymas [1]		VM7Luc ER TA bandymas [2]		ER STTA kandidatų poveikis [4]	ICCVAM [5] sutartas klasifikavimas	MeSH [6] cheminė klasė	Produkto klasė [7]
			ER TA aktyvumas	IC_{50} vertė [b] (M)	ER TA aktyvumas	IC_{50} vertė [b], [3] (M)				
1	4-hidroksitamoksifenas	68047-06-3	TEIG	$3{,}97 \times 10^{-9}$	TEIG	$2{,}08 \times 10^{-7}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
2	Dibenzo[a,h]antracenas	53-70-3	TEIG	Nėra IC_{50}	TEIG	Nėra IC_{50}	TEIG	PT	Policiklinis junginys	Laboratorinė cheminė medžiaga, gamtinis produktas
3	Mifepristonas	84371-65-3	TEIG	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEIG	—	silpna TEIG	NEIG	Steroidas	Vaistai
4	Raloksifeno hidrochloridas	82640-04-8	TEIG	$7{,}86 \times 10^{-10}$	TEIG	$1{,}19 \times 10^{-9}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
5	Tamoksifenas	10540-29-1	TEIG	$4{,}91 \times 10^{-7}$	TEIG	$8{,}17 \times 10^{-7}$	TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
6	17β-estradiolis	50-28-2	NEIG	—	NEIG	—	PN	PN	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
7	Apigeninas	520-36-5	NEIG	—	NEIG	—	NEIG	NEIG	Heterociklinis junginys	Dažiklis, gamtinis produktas, vaistų tarpinė medžiaga

	Medžiaga ([a])	CASRN	ER STTA bandymas ([1])		VM7Luc ER TA bandymas ([2])		ER STTA kandidatų poveikis ([4])	ICCVAM ([5]) sutartas klasifikavimas	MeSH ([6]) cheminė klasė	Produkto klasė ([7])
			ER TA aktyvumas	IC_{50} vertė ([b]) (M)	ER TA aktyvumas	IC_{50} vertė ([b]), ([3]) (M)				
8	Atrazinas	1912-24-9	NEIG	—	NEIG	—	NEIG	PN	Heterociklinis junginys	Herbicidas
9	Di-*n*-butilftalatas	84-74-2	NEIG	—	NEIG	—	NEIG	NEIG	Esteris, ftalio rūgšties	Kosmetikos ingredientas, pramoninė cheminė medžiaga, plastifikatorius
10	Fenarimolis	60168-88-9	NEIG	—	NEIG	—	neb	PN	Heterociklinis junginys, pirimidinas	Fungicidas
11	Flavonas	525-82-6	NEIG	—	NEIG	—	PN	PN	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
12	Flutamidas	13311-84-7	NEIG	—	NEIG	—	NEIG	PN	Amidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
13	Genisteinas	446-72-0	NEIG	—	NEIG	—	PN	NEIG	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
14	*p*-*n*-nonilfenolis	104-40-5	NEIG	—	NEIG	—	nebandyta	NEIG	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas

	Medžiaga ([a])	CASRN	ER STTA bandymas ([1])		VM7Luc ER TA bandymas ([2])		ER STTA kandidatų poveikis ([4])	ICCVAM ([5]) sutartas klasifikavimas	MeSH ([6]) cheminė klasė	Produkto klasė ([7])
			ER TA aktyvumas	IC_{50} vertė ([b]) (M)	ER TA aktyvumas	IC_{50} vertė ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratrolis	501-36-0	NEIG	—	NEIG	—	PN	NEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Gamtinis produktas

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; M – molinė koncentracija; IC_{50} – pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos slopinamosios koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; PN – prognozuojama neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga; PT – prognozuojama teigiama medžiaga.

([a]) STTA ir VM7Luc ER TA bandymams naudotos gerai žinomos medžiagos, nurodytos kaip ER antagonistai ar neigiamos medžiagos, kurios buvo naudojamos tikslumui įvertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą (2) (3).

([b]) Didžiausioji bandymo koncentracija, kai nėra apribojimų dėl citotoksiškumo arba netirpumo, buvo 1×10^{-3} M (STTA bandymas) ir 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA bandymas).

([1]) Stabiliai transfekuotos transkripcijos aktyvacijos bandymo ER tarpininkaujamam aktyvumui aptikti patvirtinimo tyrimas, B dalis (2)

([2]) ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaita dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* metodas ER agonistams ir antagonistams identifikuoti (3).

([3]) Vidutinės IC_{50} vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).

([4]) Prielaida dėl ER STTA aktyvumo daroma, atsižvelgiant į praneštus poveikius, žinomus iš prijungimo prie ER receptorių CERI bandymo istorinių duomenų, uterotrofinio bandymo duomenų ir iš atvirų šaltinių surinktos informacijos (2)

([5]) Klasifikavimas kaip ER antagonisto ar neigiamos medžiagos buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymų ICCVAM bendrųjų apžvalginių dokumentų (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31) informacija, taip pat informacija, gauta iš leidinių, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31).

([6]) Cheminės medžiagos buvo priskirtos vienai ar kelioms cheminių medžiagų klasėms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų mediciniių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuota klasifikavimo schemą (pateikta http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų banką (pateikta http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

ER TA BANDYMO KOMPONENTAI

Pagrindiniai bandymo komponentai

11. Šis bandymo metodas taikomas atliekant bandymus, naudojančius stabiliai transfekuotą arba endogeninį ERα receptorių ir stabiliai transfekuoto reporterinio geno darinį, kontroliuojamą vieno arba kelių estrogenų atsako elementų; tačiau gali būti kitų receptorių, pvz., ERβ. Tai yra pagrindiniai bandymo komponentai.

Kontroliniai ėminiai

12. Turėtų būti aprašytas kiekvieno agonistų ir antagonistų bandymo siūlomų vienalaikių pamatinių etalonų pasirinkimo pagrindimas. Vienalaikiai kontroliniai ėminiai (neigiami, tirpiklio ir teigiami), jei tinka, naudojami kaip rodiklis, kad bandymas yra veiksmingas bandymo sąlygomis ir sudaro pagrindą bandymus lyginti tarpusavyje; paprastai jie yra tam tikro bandymo priimtinumo kriterijai (1).

Standartinės kokybės kontrolės procedūros

13. Turėtų būti atliekamos kiekvienam bandymui aprašytos standartinės kokybės kontrolės procedūros, siekiant užtikrinti, kad ląstelių linija visą laiką būtų stabili atliekant kartotinius sėjimus, neturėtų mikoplazmų (t. y. nebūtų užkrėsta bakterijomis) ir ilgą laiką išsaugotų gebėjimą duoti tikėtinus ER tarpininkaujamus atsakus. Ląstelių linijos turėtų būti papildomai tikrinamos dėl jų tinkamo identiškumo, taip pat dėl kitų užkratų (pvz., grybelių, mielių grybelio ir virusų).

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

14. Prieš nežinomų cheminių medžiagų bandymus pagal šį bandymo metodą, kiekviena laboratorija turėtų įrodyti kvalifikaciją taikant šį bandymo metodą. Šiuo tikslu kiekviena laboratoriją turėtų bandyti 3 lentelėje išvardytų 14 kvalifikacijai įrodyti skirtų agonistų bandymo medžiagų, ir 4 lentelėje – 10 kvalifikacijai įrodyti skirtų antagonistų bandymo medžiagų. Šis kvalifikacijos tikrinimas taip pat patvirtintų bandymo sistemos jautrį. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas sudaro ERTA bandymams skirtuose naudojimo charakteristikų standartuose pateiktų etaloninių medžiagų rinkinio dalį (6). Šių medžiagų yra prekyboje, jos reprezentuoja cheminių medžiagų klases, paprastai susijusias su ER agonistų ar antagonistų aktyvumu, rodo tinkamą ER agonistams ar antagonistams tikėtino veiksmingumo intervalą (t. y. nuo silpnų iki stiprių) ir jų tarpe yra neigiamų medžiagų. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų bandymas turėtų būti kartojamas skirtingomis dienomis mažiausiai du kartus. Kvalifikacija įrodoma, jei teisingai klasifikuojama kiekviena kvalifikacijai įrodyti skirta medžiaga (teigiama ar neigiama). Kvalifikaciją turėtų pasitikrinti kiekvienas laborantas, kai mokosi atlikti bandymus. Priklausomai nuo ląstelių tipo, kai kurios kvalifikacijai tikrinti skirtos medžiagos gali elgtis kaip atrankieji estrogenų receptorių moduliatoriai ir būti aktyvios kaip agonistai ir antagonistai. Tačiau kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos 3 ir 4 lentelėse klasifikuojamos pagal jų žinomą vyraujantį aktyvumą, į kurį reikėtų atsižvelgti įvertinant kvalifikaciją.

15. Kiekviena laboratorija, siekdama parodyti savo efektyvumą ir kokybės kontrolės tikslais, turėtų sudaryti agonistų ir antagonistų istorinių duomenų bazes, naudojant pamatinio etalono (pvz., 17β-estradiolio ir tamoksifeno), teigiamų ir neigiamų kontrolinių cheminių medžiagų bei tirpiklio kontrolinio ėminio (pvz., DMSO) duomenis. Pradžiai duomenų bazė turėtų būti sukurta pagal ne mažiau kaip 10 agonisto (pvz., 17β-estradiolio) ir 10 antagonisto (pvz., tamoksifeno) nepriklausomų atskirų bandymų rezultatus. Reikėtų įtraukti šių pamatinių etalonų ir tirpiklių kontrolinių ėminių busimų analizių rezultatus, siekiant išplėsti duomenų bazę, kad ilgą laiką būtų užtikrintas laboratorijos biologinio tyrimo atlikimo pastovumas ir efektyvumas.

3 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtų (14) agonistų bandymo medžiagų sąrašas (1)

Nr.º (8)	Medžiaga	CASRN	Numanomas atsakas (2)	STTA bandymas			VM7Luc ER TA bandymas		MeSH cheminė klasė (6)	Produkto klasė (7)
				PC_{10} vertė (M) (3)	PC_{50} vertė (M) (3)	Bandymo konc. intervalas (M)	VM7Luc EC_{50} vertė (M) (4)	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (M) (5)		
14	Dietilstilbestrolis	56-53-1	TEIG	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai, veterinarijos priemonė
12	17*α*-estradiolis	57-91-0	TEIG	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
15	*Mezo*-heksestrolis	84-16-2	TEIG	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
11	4-*tret*-oktilfenolis	140-66-9	TEIG	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
9	Genisteinas	446-72-0	TEIG	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
6	Bisfenolis A	80-05-7	TEIG	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas

Nr.º (8)	Medžiaga	CASRN	Numanomas atsakas (2)	STTA bandymas			VM7Luc ER TA bandymas		MeSH cheminė klasė (6)	Produkto klasė (7)
				PC_{10} vertė (M) (3)	PC_{50} vertė (M) (3)	Bandymo konc. intervalas (M)	VM7Luc EC_{50} vertė (M) (4)	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (M) (5)		
2	Kempferolis	520-18-3	TEIG	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas
3	Butilbenzilftalatas	85-68-7	TEIG	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboksirūgšties esteris, ftalio rūgšties	Plastifikatorius, pramoninė cheminė medžiaga
4	*p,p'*-metoksichloras	72-43-5	TEIG	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Angliavandenilis (halogenintas)	Pesticidas, veterinarijos priemonė
1	Etilparabenas	120-47-8	TEIG	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboksirūgštis, fenolis	Vaistai, konservantas
17	Atrazinas	1912-24-9	NEIG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterociklinis junginys	Herbicidas
20	Spironolaktonas	52-01-7	NEIG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktonas, steroidas	Vaistai

Nr.º (8)	Medžiaga	CASRN	Numanomas atsakas (2)	STTA bandymas			VM7Luc ER TA bandymas		MeSH cheminė klasė (6)	Produkto klasė (7)
				PC_{10} vertė (M) (3)	PC_{50} vertė (M) (3)	Bandymo konc. intervalas (M)	VM7Luc EC_{50} vertė (M) (4)	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (M) (5)		
21	Ketokonazolas	65277-42-1	NEIG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterociklinis junginys	Vaistai
22	Rezerpinas	50-55-5	NEIG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterociklinis junginys, indolas	Vaistai, veterinarijos priemonė

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris. EC_{50} – pusė didžiausiosios efektyviosios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga; PC_{10} (ir PC_{50}) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant atsakas yra 10 % (arba 50 %, kai PC_{50}) teigiamos kontrolinės medžiagos (E2, 1 nm) atsako kiekvienoje plokštelėje.

(1) Klasifikavimas kaip teigiamo ar neigiamo ER agonisto aktyvumo buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymų ICCVAM bendraisiais apžvalginiais dokumentais (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31), taip pat empiriniais duomenimis ir kita informacija, gauta iš nuorodose pateiktų bandymų, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Vertės, paskelbtos bandymo *Stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (TA) bandymas estrogeniniam aktyvumui aptikti. Žmogaus estrogenų receptoriaus alfa tarpininkaujamas reporterinio geno bandymas, naudojant hER-HeLa-9903 ląstelių liniją* parengiamojo patvirtinimo ir tarplaboratorinio patvirtinimo ataskaitos projekte (30) (30).

(3) Vidutinės EC_{50} vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).

(4) Praneštos koncentracijos buvo didžiausios bandymo koncentracijos (intervalo nustatymo), atliekant VM7Luc ER TA bandymo patvirtinimą. Jei laboratorijų naudojamos koncentracijos skiriasi, pranešama didžiausioji koncentracija. Žr. ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaitos 4-10 lentelę; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodas: *In vitro* bandymas cheminių medžiagų, kaip žmogaus estrogenų receptorių agonistų ir antagonistų, aktyvumui identifikuoti (3).

(5) Cheminės medžiagos buvo priskirtos vienai ar kelioms cheminių medžiagų klasėms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų mediciniių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuota klasifikavimo schemą (paskelbta http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų bazę (paskelbta http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

(7) Iš naudojimo charakteristikų standartų (6) 1 lentelės (ER agonistų tikslumo įvertinimo etaloninių cheminių medžiagų sąrašas (22)).

(8) Jei kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų nebėra prekyboje, gali būti naudojama tokios pačios klasės ir palyginamo veiksmingumo, veikimo būdo ir tos pačios cheminių medžiagų klasės medžiaga.

4 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtų (10) antagonistų bandymo medžiagų sąrašas

	Medžiaga ([a])	CASRN	ER STTA bandymas ([1])			VM7Luc ER TA bandymas ([2])			ER STTA ([1]) kandidatų poveikis	ICCVAM ([5]) sutartas klasifikavimas	MeSH ([6]) Cheminė klasė	Produkto klasė ([7])
			ER TA aktyvumas	IC_{50} (M)	Bandymo konc. intervalas (M)	ER TA aktyvumas	IC_{50} ([3]) (M)	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (M) ([4])				
1	4-hidroksitamoksifenas	68047-06-3	TEIG	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12} – 10^{-7}	TEIG	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
2	Raloksifeno hidrochloridas	82640-04-8	TEIG	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12} – 10^{-7}	TEIG	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	vidutinė TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
3	Tamoksifenas	10540-29-1	TEIG	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10} – 10^{-5}	TEIG	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	TEIG	TEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai
4	17β-estradiolis	50-28-2	NEIG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEIG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	turėtų būti neigiama (*)	PN	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
5	Apigeninas	520-36-5	NEIG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEIG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEIG	NEIG	Heterociklinis junginys	Dažiklis, gamtinis produktas, vaistų tarpinė medžiaga
6	Di-*n*-butilftalatas	84-74-2	NEIG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEIG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEIG	NEIG	Esteris, ftalio rūgšties	Kosmetikos ingredientas, pramoninė cheminė medžiaga, plastifikatorius

	Medžiaga ([a])	CASRN	ER STTA bandymas ([1])			VM7Luc ER TA bandymas ([2])			ER STTA ([1]) kandidatų poveikis	ICCVAM ([5]) sutartas klasifikavimas	MeSH ([6]) Cheminė klasė	Produkto klasė ([7])
			ER TA aktyvumas	IC_{50} (M)	Bandymo konc. intervalas (M)	ER TA aktyvumas	IC_{50} ([3]) (M)	Didžiausioji intervalo nustatymo konc. (M) ([4])				
7	Flavonas	525-82-6	NEIG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEIG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	turėtų būti neigiama (*)	PN	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
8	Genisteinas	446-72-0	NEIG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEIG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	turėtų būti neigiama (*)	NEIG	Flavonoidas, heterociklinis junginys	Gamtinis produktas, vaistai
9	*p-n*-nonilfenolis	104-40-5	NEIG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEIG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nebandyta	NEIG	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
10	Resveratrolis	501-36-0	NEIG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEIG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	turėtų būti neigiama (*)	NEIG	Angliavandenilis (ciklinis)	Gamtinis produktas

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; M – molinė koncentracija; IC_{50} – pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos slopinamosios koncentracijos; NEIG – neigiama medžiaga; PN – prognozuojama neigiama medžiaga; TEIG – teigiama medžiaga.

(*) Klasifikuojama kaip neigiama pagal literatūros apžvalgą (2).

([a]) STTA ir VM7Luc ER TA bandymams naudotos gerai žinomos medžiagos, nurodytos kaip ER antagonistai ar neigiamos medžiagos, kurios buvo naudojamos tikslumui įvertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą (2) (3).

([1]) Stabiliai transfekuotos transkripcijos aktyvacijos bandymo ER tarpininkaujamam aktyvumui aptikti patvirtinimo tyrimas, B dalis (2)

([2]) ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaita dėl LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodo: *In vitro* metodas ER agonistams ir antagonistams identifikuoti (3).

([3]) Vidutinės IC_{50} vertės buvo apskaičiuotos pagal VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą atlikusių laboratorijų (XDS, ECVAM ir Hiyoshi) paskelbtas vertes (3).

([4]) Praneštos koncentracijos buvo didžiausios bandymo koncentracijos (intervalo nustatymo), atliekant VM7Luc ER TA bandymo patvirtinimą. Jei laboratorijų naudojamos koncentracijos skiriasi, pranešama didžiausioji koncentracija. Žr. ICCVAM bandymo metodo įvertinimo ataskaitos 4-11 lentelę; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) bandymo metodas: *in vitro* bandymas cheminių medžiagų, kaip žmogaus estrogenų receptorių agonistų ir antagonistų, aktyvumui identifikuoti (3).

([5]) Klasifikavimas kaip ER antagonisto ar neigiamos medžiagos buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymo metodų ICCVAM bendrųjų apžvalginių dokumentų (angl. *Background Review Documents*, BRD) (31) informacija, taip pat informacija, gauta iš leidinių, paskelbtų ir peržiūrėtų baigus rengti ICCVAM BRD (2) (3) (18) (31).

([6]) Cheminės medžiagos buvo priskirtos vienai ar kelioms cheminių medžiagų klasėms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuota klasifikavimo schemą (pateikta http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų banką (pateikta http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Atskiro bandymo priimtinumo kriterijai

16. Atskiro bandymo priėmimas arba atmetimas grindžiamas kiekvieno bandymo pamatinių etalonų ir kontrolinių ėminių rezultatų įvertinimu. Pamatinių etalonų PC_{50} (EC_{50}) arba IC_{50} vertės turėtų atitikti priimtinumo kriterijus, numatytus pasirinktam bandymui (STTA, žr. 2 priedėlį, VM7Luc ER TA, žr. 3 priedėlį), ir visos teigiamos ir (arba) neigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti tinkamai klasifikuojami atliekant kiekvieną priimtą bandymą. Gebėjimas nuosekliai atlikti bandymą turėtų būti įrodytas sukuriant ir tvarkant pamatinių etalonų ir kontrolinių medžiagų istorinių duomenų bazę (žr. 15 pastraipą). Kaip laboratorijos atkuriamumo matą galima naudoti kartotinių bandymų skaičiui gautų pamatinių etalonų kreivės priderinimo parametrų vidurkių standartinius nuokrypius (SN) arba variacijos koeficientus (VK). Be to, reikėtų atitikti šiuos priimtinumo kriterijams taikomus principus:

— duomenų turėtų pakakti ER aktyvinimo (agonistų bandymo) arba slopinimo (antagonistų bandymo) (t. y. efektyvumo ir veiksmingumo) kiekybiniam vertinimui;

— siekiant užtikrinti reikiamą jautrį, etaloninės koncentracijos etaloninio estrogeno vidutinis reporterio aktyvumas bent turėtų būti lygus mažiausiam aktyvumui, nurodytam nešiklio (tirpiklio) kontrolinių ėminių bandymams. STTA ir VM7Luc ER TA bandymų atveju jis yra keturis kart didesnis nei vidutinio nešiklio kontrolinio ėminio kiekvienoje plokštelėje.

— Bandymo koncentracijos turėtų atitikti bandomųjų cheminių medžiagų tirpumo intervalą ir neturėtų sukelti citotoksiškumo.

Duomenų analizė

17. Klasifikuojant kiekvieno bandymo teigiamą ir neigiamą atsaką turėtų būti naudojama nustatyta duomenų aiškinimo procedūra.

18. Atitiktis priimtinumo kriterijams (16 pastraipa) rodo tinkamą bandymo atlikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų atskirą bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo atskiro bandymo rezultatų pakartojimas yra geriausias tikslių duomenų gavimo rodiklis. Jie dviejų atskirų bandymų rezultatai yra atkuriami (pvz., abiejų atskirų bandymų rezultatai rodo, kad cheminė medžiaga yra teigiama), trečiasis atskiras bandymas nėra būtinas.

19. Jei dviejų atskirų bandymų rezultatai nėra atkuriami (pvz., bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama pagal vieną atskirą bandymą ir neigiama pagal kitą atskirą bandymą), arba jei reikia didesnio šio bandymo rezultatų tikrumo laipsnio, reikėtų atlikti ne mažiau kaip tris nepriklausomus bandymus. Šiuo atveju klasifikavimas nustatomas pagal du sutampančius bandymus iš trijų.

Bendrieji duomenų aiškinimo kriterijai

20. Šiuo metu nėra visuotinai sutarto ER TA duomenų aiškinimo metodo. Tačiau ER tarpininkaujamo aktyvumo kokybinius (pvz., teigiama ar neigiama) ir (arba) kiekybinius (pvz., EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) vertinimo rezultatus reikėtų pagrįsti empiriniais duomenimis ir svariais moksliniais įrodymais. Jei įmanoma, teigiamus rezultatus reikėtų apibūdinti poveikio dydžiu palyginti su nešiklio (tirpiklio) kontroliniu ėminiu arba su etaloniniu estrogenu ir poveikio atsiradimo koncentracija (pvz., EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} ir kt.).

Bandymo ataskaita

21. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandymas:

— naudotas bandymas;

— kontrolinė medžiaga, pamatinis etalonas, bandomoji cheminė medžiaga;

— šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;

— pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;

— pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

— apibūdinimas (tipas, tiekėjas ir partija);

— tirpiklio ir (arba) nešiklio pasirinkimo pagrindimas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje ar nešiklyje, jei yra žinomas.

Ląstelės:

— ląstelių tipas ir šaltinis:

  • ar yra endogeninė ER ekspresija? Jei ne, kuris (-ie) receptorius (-iai) buvo transfekuotas (-i)?

  • naudotas (-i) reporterio darinys (-iai) (įskaitant šaltinio rūšį);

  • transfekavimo metodas;

  • pasirinktas stabilaus transfekavimo užtikrinimo metodas (jei tinka);

  • ar transfekavimo metodas tinka stabilioms linijoms?

— sėjimų skaičius (po atitirpinimo);

— ląstelių sėjimo numeris po atitirpinimo;

— ląstelių kultūros priežiūros metodai.

Bandymo sąlygos:

— tirpumo apribojimai;

— taikomų gyvybingumo vertinimo metodų aprašymas;

— terpių sudėtis, CO_2 koncentracija;

— Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės;

— nešiklio ir pridėtos bandomosios cheminės medžiagos tūris;

— inkubavimo temperatūra ir drėgmė;

— apdorojimo trukmė;

— ląstelių tankis apdorojimo pradžioje ir jo metu;

— teigiamas ir neigiamas pamatinis etalonas;

— reporterio reagentai (produkto pavadinimas, tiekėjas ir partija);

— atskirų bandymų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinų kriterijai.

Priimtinumo tikrinimas:

— kiekvienai bandymo plokštelei gautas indukcijos pokytis kartais ir jo atitiktis mažiausiam bandymui reikiamam padidėjimui, atsižvelgiant į istorinius kontrolinių ėminių duomenis;

— faktinės priimtinumo kriterijų vertės, pvz., $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ ir vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių ir (arba) pamatinių etalonų Hillo krypties koeficiento vertės.

Rezultatai:

— neapdoroti ir normalizuotieji duomenys;

— didžiausiasis indukcijos pokyčio kartais lygis;

— citotoksiškumo duomenys;

— mažiausioji efektyvioji koncentracija (LEC), jei yra;

— RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} ir (arba) EC_{50} vertės, jei tinka;

— koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,

— statistinės analizės duomenys, jei yra, kartu su paklaidų ir pasikliovimo matu (pvz., vidurkio standartinė paklaida, SN, VK arba 95 % pasikliovimo intervalas) ir šių verčių gavimo būdo aprašymas.

Rezultatų aptarimas

Išvada

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 Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro, In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS IR SANTRUMPOS

Priimtinumo kriterijai– minimalūs reikalavimai, keliami bandymo kontrolinių ėminių ir pamatinių etalonų bandymo rezultatams. Būtina atitikti visus priimtinumo kriterijus, kad bandymą būtų galima laikyti tinkamu.

Tikslumas (sutapimas)– bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (1).

Agonistas– medžiaga, kuri duoda atsaką, pvz., transkripciją, kai ji prijungiama prie specifinio receptoriaus.

Antagonistas– tam tikro tipo receptoriaus ligandas arba cheminė medžiaga, kuri prijungta prie receptoriaus pati nesukelia biologinio atsako, bet blokuoja arba slopina agonistų tarpininkaujamus atsakus.

Antiestrogeninis aktyvumas– cheminės medžiagos gebėjimas slopinti 17β-estradiolio veikimą per estrogenų receptorius, kaip tarpininkus.

Ląstelių morfologija– audinio kultūros plokštelės vieno šulinėlio monosluoksnyje auginamų ląstelių forma ir išvaizda. Žūstančios ląstelės dažnai yra nenormalios morfologijos.

CF– endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema.

Apdorojimas dekstranu dengtomis medžio anglimis– ląstelių kultūrai naudojamo serumo apdorojimas. Apdorojant dekstranu dengtomis medžio anglimis (apdorojimas dažnai vadinamas stripingu) pašalinami endogeniniai hormonai ir hormonus jungiantys baltymai.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Citotoksiškumas– ląstelių struktūrai ar funkcijai daromas kenksmingas poveikis, galintis sukelti ląstelių žūtį, ir jį gali rodyti mažesnis šulinėlyje esančių ląstelių skaičius ekspozicijos laikotarpio pabaigoje arba gebėjimo sumažėjimas matuojant ląstelių funkciją palyginti su vienalaikiu nešiklio kontroliniu ėminiu.

VK– variacijos koeficientas.

DCC-FBS– galvijų vaisiaus kraujo serumas, apdorotas dekstranu dengtomis medžio anglimis.

DMEM– *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė.

DMSO– dimetilsulfoksidas.

E2– 17β-estradiolis.

EC50– pusė didžiausiosios efektyviosios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

ED– endokrininės sistemos ardymas.

hERα– žmogaus estrogenų receptoriaus alfa.

hERβ– žmogaus estrogenų receptoriaus beta.

EFM– estrogenų neturinti terpė. *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM), papildyta 4,5 % dekstranu dengtų medžio anglių apdorotu FBS, 1,9 % L-glutamino ir 0,9 % penicilino bei streptomicino.

ER– estrogenų receptorius.

ERE– estrogenams jautrus elementas.

Estrogeninis aktyvumas– cheminės medžiagos gebėjimas rodyti panašias į 17*β*-estradiolio jungimosi prie estrogenų receptorių ir jų aktyvinimo savybes. hERα tarpininkaujamas estrogeninis aktyvumas gali būti aptiktas šiuo bandymo metodu.

ERTA– estrogenų receptoriaus transaktyvacija.

FBS– galvijų vaisiaus kraujo serumas.

HeLa– imortalizuotų žmogaus gimdos kaklelio ląstelių linija.

HeLa9903– HeLa ląstelės subklonas, į kurį yra stabiliai transfekuotas hERαα ir liuciferazės reporterinis genas.

IC_{50}– pusė didžiausiosios efektyviosios slopinančios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

ICCVAM– alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas.

Atkuriamumas tarp laboratorijų– laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, naudodamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas, atliekant parengiamąjį patvirtinimą ir tinkamumo patvirtinimą, ir rodo laipsnį, kuriuo bandymas gali būti sėkmingai perkeliamas tarp laboratorijų; taip pat vadinamas tarplaboratoriniu atkuriamumu (1).

Atkuriamumas laboratorijoje– laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, skirtingu metu naudodami tam tikrą protokolą, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (1).

LEC– mažiausioji efektyvioji koncentracija yra mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant gaunamas atsakas (t. y. mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant indukcijos pokytis kartais statistiškai skiriasi nuo vienalaikio nešiklio kontrolinio ėminio).

„Aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymas– šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriniu ir funkciniu požiūriu panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Vartojamas kaip lygiavertis terminui „panašus bandymo metodas“.

MT– metalotioneinas.

MMTV– pelių pieno liaukų auglio virusas.

OHT– 4-hidroksitamoksifenas.

PBTG– į rezultatus orientuotos bandymo gairės.

PC (teigiama kontrolinė medžiaga)– didelio aktyvumo medžiaga, pageidautina 17β-estradiolis, įtraukiama į visus bandymus, kad būtų užtikrinta reikiama bandymo eiga.

PC10– bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant išmatuotas aktyvumas, gautas atliekant agonistų bandymą, yra 10 % didžiausio PC (E2 1 nM, STTA bandymas) kiekvienoje plokštelėje sukelto aktyvumo.

PC_{50}– bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant išmatuotas aktyvumas, gautas atliekant agonistų bandymą, yra 50 % didžiausio PC (bandymo metode nurodytos E2 etaloninės koncentracijos) kiekvienoje plokštelėje sukelto aktyvumo.

PC_{Max}– RPCMax sukelianti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Naudojimo charakteristikų standartai– patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: 1) esminiai bandymo metodo komponentai; 2) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir 3) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (1).

Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos– į naudojimo charakteristikų standartus įtrauktų etaloninių medžiagų, kurias laboratorijos gali naudoti, norėdamos įrodyti standartizuoto bandymo metodo taikymo techninę kompetenciją, rinkinio dalis. Šių medžiagų atrankos kriterijus paprastai sudaro jų atitiktis atsakų intervalui, galimybė jų nusipirkti ir aukštos kokybės etaloninių duomenų buvimas.

Kvalifikacija– įrodytas gebėjimas tinkamai atlikti bandymą prieš bandant nežinomas medžiagas.

Etaloninis estrogenas (teigiama kontrolinė medžiaga, PC)– 17β-estradiolis (E2, CAS 50-28-2).

Pamatinis etalonas– etaloninė medžiaga, naudojama bandymo tinkamumui įrodyti. 17β-estradiolis yra pamatinis etalonas, atliekant STTA ir VM7Luc ER TA bandymus.

Pamatiniai bandymo metodai– bandymai, kuriais pagrįstos PBTG 455.

Tinkamumas– santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (1).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų.

RLU– santykiniai šviesos vienetai.

RNR– ribonukleino rūgštis.

RPC_{Max}– didžiausiasis bandomosios cheminės medžiagos sukelto atsako lygis, išreikštas kaip tos pačios plokštelės 1 nM E2 tirpalo sukelto atsako procentinė dalis.

RPMI– RPMI 1 640 terpė, papildyta 0,9 % penicilino ir streptomicino bei 8,0 % galvijų vaisiaus kraujo serumu (FBS)

Atskiras bandymas– pavienis bandymas, kuriuo įvertinama cheminės medžiagos įtaka bandymo biologiniam rezultatui. Kiekvienas atskiras bandymas yra visas bandymas, atliekamas su vienu metu iš vieno šaltinio pasėtų ląstelių kartotiniais šulinėliais.

Nepriklausomas bandymas– atskiras nepriklausomas bandymas, kuriuo įvertinama cheminės medžiagos įtaka bandymo biologiniam rezultatui, naudojant skirtingo šaltinio ląsteles ir naujai atskiestas chemines medžiagas, ir kuris atliekamas skirtingomis dienomis arba tą pačią dieną, bet kito personalo.

SN– standartinis nuokrypis.

Jautris– visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (1).

Specifiškumas– visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (1).

Stabilus transfekavimas– toks DNR transfekavimo į auginamas ląsteles būdas, kai DNR stabiliai integruojama į ląstelių genomą, gaunant stabilią transfekuotų genų ekspresiją. Stabiliai transfekuotų ląstelių klonai atrenkami stabiliais žymekliais (pvz., pagal atsparumą G418).

STTA bandymas– stabiliai transfekuotos transaktyvacijos bandymas, ER*α* transkripcijos aktyvacijos bandymas naudojant HeLa 9 903 ląstelių liniją.

Tyrimas– visos apimties eksperimentinis darbas, skirtas atskirai konkrečiai medžiagai įvertinti, atliekant tam tikrą bandymą. Tyrimas aprėpia visus etapus, įskaitant bandomosios medžiagos skiedimo bandymo terpėje bandymus, parengiamuosius intervalo nustatymo atskirus bandymus, visus būtinus galutinius bandymus, duomenų analizę, kokybės užtikrinimą, citotoksiškumo vertinimą ir kt. Baigus tyrimą galima klasifikuoti bandomosios cheminės medžiagos aktyvumą kaip toksinės medžiagos (t. y. aktyvi, neaktyvi arba nėra rezultato), kuris yra įvertinamas atliekant bandymą, ir gauti veiksmingumo įvertį palyginti su teigiama etalonine chemine medžiaga.

Medžiaga– pagal REACH ([1]) cheminė medžiaga apibrėžiama kaip natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties; Labai panaši apibrėžtis naudojama JT GHS (1).

TA (transaktyvacija)– mRNR sintezės iniciacija kaip atsakas į specifinį cheminį signalą, pvz., estrogeno prijungimą prie estrogenų receptoriaus.

Bandymas– pagal šį bandymo metodą, bandymas yra viena iš procedūrų, kuri laikoma tinkama atsižvelgiant į nurodytus veiksmingumo kriterijus. Bandymo komponentai yra, pavyzdžiui, tam tikra ląstelių liniją ir susijusios jų auginimo sąlygos, tam tikra bandymo atlikimo terpė, plokštelės schemos sąlygos, bandomųjų cheminių medžiagų išdėstymas ir skiedimo koncentracijos, taip pat visos kitos būtinos kokybės kontrolės priemonės ir susiję duomenų įvertinimo veiksmai.

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Transkripcija– mRNR sintezė.

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas– bandymo metodas, kurio tinkamumo tam tikram tikslui pasiekti patvirtinimo tyrimai buvo atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti (1).

Tinkamumo patvirtinimas– tam tikro būdo, metodo, bandymo, proceso ar vertinimo patikimumo ir tinkamumo nurodytam tikslui nustatymo procesas (1).

VC (nešiklio kontrolinis ėminys)– bandomųjų ir kontrolinių cheminių medžiagų tirpiklis, bandomas tik kaip jų nešiklis be ištirpintos cheminės medžiagos.

VM7– imortalizuota adenokarcinomos ląstelė, kuri endogeniškai ekspresuoja estrogenų receptorių.

VM7Luc4E2– VM7Luc4E2 ląstelių linija buvo gauta iš VM7 imortalizuotų žmogaus adenokarcinomos ląstelių, kurios endogeniškai ekspresuoja abi estrogenų receptoriaus formas (ERα ir ERβ), ir buvo stabiliai transfekuotos plazmide pGudLuc7.ERE. Šią plazmidę sudaro keturios sintetinio oligonukleotido kopijos, turinčios estrogenų atsako elementą prieš pelių pieno liaukų auglio viruso (MMTV) promotorių ir jonvabalių liuciferazės geną.

Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga– iš etaloninių medžiagų sąrašo pasirinkta mažo aktyvumo medžiaga, įtraukiama į visus bandymus, kad būtų užtikrinta reikiama bandymo eiga.

([1]) 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantis Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantis Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantis Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB ir 2000/21/EB (OL L 304, 2007 11 22, p. 1).

2 priedėlis

STABILIAI TRANSFEKUOTO ŽMOGAUS ESTROGENŲ RECEPTORIAUS A TRANSAKTYVACIJOS BANDYMAS CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ KAIP ESTROGENŲ AGONISTŲ IR ANTAGONISTŲ AKTYVUMUI APTIKTI, NAUDOJANT HERA-HELA-9903 LĄSTELIŲ LINIJĄ

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Atliekant šį transaktyvacijos (TA) bandymą, naudojama hERα-HeLa-9 903 ląstelių linija estrogeniniam agonistų aktyvumui aptikti, kaip tarpininką naudojant žmogaus estrogenų receptorių alfa (hERα). Stabiliai transfekuotos transaktyvacijos (STTA) bandymo patvirtinimo tyrimas, atliktas Japonijos cheminių medžiagų įvertinimo ir tyrimų institute (CERI), naudojant hERα-HeLa-9 903 ląstelių liniją ir žmogaus estrogenų receptorių alfa (hERα) kaip tarpininką estrogeniniam agonistų ir antagonistų aktyvumui aptikti, įrodė bandymo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (1).

2. Šis bandymas yra specialiai sukurtas hERα tarpininkaujamai TA aptikti, matuojant biologinę liuminescenciją kaip vertinamąją baigtį. Tačiau pranešama, kad esant didesnei kaip 1 μM fitoestrogenų koncentracijai atsiranda ne receptoriaus tarpininkaujamos liuminescencijos signalai dėl per didelės liuciferazės reporterinio geno aktyvacijos (2) (3). Nors dozės ir atsako kreivė rodo, kad tikra ER sistemos aktyvacija vyksta esant mažesnėms koncentracijoms, luciferazės ekspresiją, gautą esant didelėms fitoestrogenų arba panašių junginių, įtariamų sukeliant per didelę fitoestrogenų tipo luciferazės reporterinio geno aktyvaciją, koncentracijoms, reikia atidžiai ištirti stabiliai transfekuotos ER TA bandymo sistemose (1 priedėlis).

3. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti skirsnius *BENDRASIS ĮVADAS* IR *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI*. Šiose bandymo gairėse vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 2.1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS (TAIP PAT ŽR. *BENDRĄJĮ ĮVADĄ*)

4. Bandymas naudojamas ligando prijungimui prie estrogenų receptoriaus patvirtinti. Po ligando prijungimo vyksta receptoriaus ir ligando komplekso translokacija į branduolį, kuriame jis prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir transaktyvina jonvabalio liuciferazės reporterinį geną, dėl ko padidėja ląstelių liuciferazės fermento ekspresija. Liuciferinas yra substratas, liuciferazės fermento paverčiamas bioliuminescenciniu produktu, kurį galima kiekybiškai išmatuoti liuminometru. Liuciferazės aktyvumas gali būti įvertintas greitai ir nebrangiai naudojant kelis prekyboje esančius bandymo rinkinius.

5. Bandymo sistema naudoja hERα-HeLa-9 903 ląstelių liniją, gautą iš žmogaus gimdos kaklelio auglio su dviem stabiliai įterptais dariniais: i) hERαα ekspresijos darinių (koduojantis viso ilgio žmogaus receptorių) ir ii) jonvabalio liuciferazės reporteriniu dariniu, turinčio penkias vitelogenino estrogenams jautraus elemento (ERE) tandemines kartotines sekas, valdomas pelių metalotioneino (MT) promotoriaus TATA elementu. Buvo parodyta, kad geriausi rezultatai gaunami su pelių MT TATA geno dariniu, ir todėl jis yra dažniausiai naudojamas. Taigi naudojant šią hERα-HeLa-9 903 ląstelių linija galima išmatuoti bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti hERα tarpininkaujamą liuciferazės geno ekspresijos transaktyvaciją.

6. ER agonistų bandymo atveju duomenų aiškinimas pagrįstas tuo, ar didžiausiasis bandomosios cheminės medžiagos sukeltas atsako lygis yra lygus ar didesnis nei agonisto atsakas, lygus 10 % didžiausiosios (1 nM) teigiamo kontrolinio ėminio (PC) 17β-estradiolio (E2) koncentracijos sukelto atsako (t. y. PC10). ER antagonisto atveju duomenų aiškinimas pagrįstas tuo, ar atsakas rodo, ar nerodo ne mažesnį kaip 30 % aktyvumo sumažėjimą palyginti su sodrinimo kontroliniu ėminiu (25 pM E2) sukeltu atsaku, kai nėra citotoksiškumo. Duomenų analizė ir aiškinimas išsamiai aptariami 34–48 pastraipose.

PROCEDŪRA

Ląstelių linijos

7. Atliekant bandymą turėtų būti naudojama stabiliai transfekuotų hERα-HeLa-9 903 ląstelių linija. Ląstelių liniją galima gauti iš Japonijos tiriamųjų biologinių išteklių (JCRB) ląstelių banko ([1]), pasirašius medžiagų perdavimo sutartį (MTA).

8. Atliekant bandymus reikėtų naudoti tik mikoplazmomis neužkrėstas ląsteles. RT-PCR (realiojo laiko polimerazės grandininė reakcija) pasirenkama kaip jautrus mikoplazmų užkrato aptikimo metodas (4) (5) (6).

Ląstelių linijos stabilumas

9. Siekiant stebėti ląstelių linijos stabilumą, kaip pamatinius etalonus agonistų bandymui reikėtų naudoti E2, 17*α*-estradiolį, 17*α*-metiltetosteroną, ir kiekvieną kartą atliekant bandymą mažiausiai vieną kartą reikėtų gauti visą atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę 1 lentelėje nurodytame bandymo koncentracijos intervale, ir rezultatai turėtų atitikti 1 lentelėje pateiktus rezultatus.

10. Atliekant antagonistų bandymą, reikėtų gauti viso ilgio dviejų pamatinių etalonų, tamoksifeno ir flutamido, koncentracijos kreives vienu metu su kiekvienu atskiru bandymu. Reikėtų stebėti, ar abi cheminės medžiagos teisingai kokybiškai klasifikuojamos kaip teigiama ar neigiama medžiaga.

Ląstelių auginimo ir sėjimo sąlygos

11. Ląstelės turėtų būti auginamos *Eagle* minimalios mitybos terpėje (EMEM) be fenolio raudonojo, papildytoje 60 mg/l antibiotiko kanamicino ir 10 % galvijų vaisiaus kraujo serumu, apdorotu dekstranu dengtomis medžio anglimis (DCC-FBS), CO2 inkubatoriuje (5 % CO2), 37±1 °C temperatūroje. Ląstelėms pasiekus 75–90 % susiliejimo laipsnį, jas galima persėti, 10 ml 0,4 × 105 – 1 × 105 ląstelių/ml sėjant į 100 mm ląstelių kultūros lėkštelę. Reikėtų paruošti ląstelių suspensiją 10 % FBS-EMEM (kuri yra tokia pati terpė, kaip EMEM su DCC-FBS) ir jas pasėti į mikroplokštelės šulinėlius esant tankiui 1 × 104 ląstelių/(100 µl vienam šulinėliui). Prieš apdorojant chemine medžiaga ląsteles reikėtų inkubuoti 3 h 5 % CO2 inkubatoriuje 37 °± °C temperatūroje. Plastikiniai indai neturėtų rodyti estrogeninio aktyvumo.

12. Siekiant užtikrinti atsako vientisumą, atitirpinto pradinio šaltinio ląsteles reikėtų auginti kondicionuotoje terpėje daugiau nei vieną sėjimą ir jos neturėtų būti persėjamos daugiau kaip 40 kartų. Jei tai hERα-HeLa-9 903 ląstelių linija, šis laikas būtų trumpesnis kaip trys mėnesiai. Tačiau ląstelių naudojimo trukmė gali sumažėti, jei jos auginamos netinkamomis terpės sąlygomis.

13. DCC-FBS galima paruošti, kaip aprašyta 2.2 priedėlyje, arba pirkti.

Priimtinumo kriterijai

Teigiami ir neigiami ER agonistų bandymo pamatiniai etalonai

14. Prieš tyrimą ir jo metu reikėtų tikrinti bandymo sistemos jautrį, naudojant atitinkamų koncentracijų stiprų estrogeną E2, silpną estrogeną (17*α*-estradiolį), labai silpną agonistą (17*α*-metiltestosteroną) ir neigiamą medžiagą (kortikosteroną). Priimtinos intervalo vertės, gautos atliekant patvirtinimo tyrimą (1), pateiktos 1 lentelėje. Šie vienu metu naudojami 4 pamatiniai etalonai turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą ir gauti rezultatai turėtų atitikti nurodytas priimtinas ribas. Jei taip nėra, reikėtų nustatyti neatitikties priimtinumo kriterijams priežastį (pvz., ląstelių auginimo sąlygos, serumo ir antibiotikų kokybė bei koncentracija), ir bandymą pakartoti. Jei priimtinumo kriterijai įvykdyti, svarbu pastoviu būdu naudoti ląstelių auginimo medžiagas, kad būtų užtikrintas mažiausias EC_{50}, PC_{50} ir PC_{10} verčių

([1]) JCRB ląstelių bankas: *National Institute of Biomedical Innovation*, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonija, faksas: +81-72-641-9812.

kintamumas. Keturi vienalaikiai pamatiniai etalonai, kurie turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą (atliekamą vienodomis sąlygomis, įskaitant medžiagas, ląstelių sėjimo lygį ir laborantus), gali užtikrinti bandymo jautrumą, nes trijų teigiamų pamatinių etalonų PC_{10} vertės turėtų atitikti priimtiną intervalą, kaip ir PC_{50} bei EC_{50} vertės, jei jas galima apskaičiuoti (žr. 1 lentelę).

1 lentelė

ER agonistų bandymo keturių pamatinių etalonų priimtinos intervalo vertės

Pavadinimas	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillo kryptie koeficientas	Bandymo intervalas
17β-estradiolis (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-estradiolis 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
Kortikosteronas CAS Nr. 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4} M
17α-metiltestosteronas CAS Nr. 58-18-4	–6,0~–5,1	–8,0~–6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5} M

Teigiami ir neigiami ER agonistų bandymo pamatiniai etalonai

15. Prieš tyrimą ir jo metu reikėtų tikrinti bandymo sistemos jautrį, naudojant atitinkamos koncentracijos teigiamą medžiagą (tamoksifeną) ir neigiamą medžiagą (flutamidą). Priimtinos intervalo vertės, gautos atliekant patvirtinimo tyrimą (1), pateiktos 2 lentelėje. Šie vienu metu naudojami du pamatiniai etalonai turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą ir gauti rezultatai turėtų būti tinkamai įvertinti atsižvelgiant į kriterijus. Jei taip nėra, reikėtų nustatyti neatitikties kriterijams priežastį (pvz., ląstelių auginimo sąlygos, serumo ir antibiotikų kokybė bei koncentracija), ir bandymą pakartoti. Be to, reikėtų apskaičiuoti teigiamos medžiagos (tamoksifeno) IC_{50} vertes ir gauti rezultatai turėtų atitikti nurodytas priimtinas ribas. Jei priimtinumo kriterijai įvykdyti, svarbu pastoviu būdu naudoti ląstelių auginimo medžiagas, kad būtų užtikrintas mažiausias IC50 verčių kintamumas. Du vienalaikiai pamatiniai etalonai, kurie turėtų būti įtraukti į kiekvieną bandymą (atliekamą vienodomis sąlygomis, įskaitant medžiagas, ląstelių sėjimo lygį ir laborantus), gali užtikrinti bandymo jautrumą (žr. 2 lentelę).

2 lentelė

ER antagonistų bandymo dviejų pamatinių etalonų kriterijai ir priimtinos intervalo vertės

Pavadinimas	Kriterijai	$LogIC_{50}$	Bandymo intervalas
Tamoksifenas CAS Nr. 10 540-29-1	Teigiama medžiaga: IC_{50} turėtų būti apskaičiuota	–5,942 ~ –7,596	10^{-10} ~ 10^{-5} M
Flutamidas CAS Nr. 13 311-84-7	Neigiama medžiaga: IC_{30} neturėtų būti apskaičiuota	—	10^{-10} ~ 10^{-5} M

Teigiami ir nešiklio kontroliniai ėminiai

16. Kiekvienoje plokštelėje turėtų būti bandomas teigiamas kontrolinis ėminys (PC), ER agonistų bandymo (1 nM E2) ir ER antagonistų bandymo (10 μM TAM), imant ne mažiau kaip tris kartotinius ėminius. Bandomajai cheminei medžiagai tirpinti naudojamas nešiklis turėtų būti bandomas kiekvienoje plokštelėje kaip nešiklio kontrolinis ėminys (VC), imant ne mažiau kaip tris kartotinius ėminius. Jei PC ir bandomosios cheminės medžiagos nešikliai yra skirtingi, be šio VC toje pačioje plokštelėje kaip ir PC turėtų būti bandomi ne mažiau kaip trys kito VC kartotiniai ėminiai.

ER agonistų bandymo kokybės kriterijai

17. Vidutinis teigiamos kontrolinės medžiagos (1 nM E2) liuciferazės aktyvumas kiekvienoje plokštelėje turėtų būti ne mažiau kaip 4 kartus didesnis nei vidutinis VC aktyvumas. Šis kriterijus nustatytas atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo vertinamųjų baigčių verčių patikimumą (istoriniai duomenys – nuo 4 iki 30 kartų).

18. Kalbant apie bandymo kokybės kontrolę, indukcijos pokytis kartais, atitinkantis vienalaikio PC (1 nM E2) PC10 vertę, turėtų būti didesnis kaip vienalaikio VC indukcijos pokyčio kartais vertės (=1) 1+2SN. Pirmumo nustatymo tikslais PC10 vertė gali būti naudinga siekiant supaprastinti reikiamą duomenų analizę palyginti su statistine analize. Nors statistinė analizė pateikia informaciją apie reikšmingumą, tokia analizė nėra kiekybinis parametras atsižvelgiant į su koncentracija susijusį potencialą, todėl yra mažiau naudinga pirmumo nustatymo tikslais.

ER antagonistų bandymo kokybės kriterijai

19. Vidutinis sodrinimo kontrolinio ėminio (25 pM E2) liuciferazės aktyvumas kiekvienoje plokštelėje turėtų būti ne mažiau kaip 4 kartus didesnis nei vidutinis VC aktyvumas. Šis kriterijus nustatytas atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo vertinamųjų baigčių verčių patikimumą.

20. Kalbant apie bandymo kokybės kontrolę, 1 nM E2 santykinė transkripcijos aktyvacija (RTA) turėtų būti didesnė kaip 100 %, 1 μM 4-hidroksitamoksifeno (OHT) RTA turėtų būti mažesnė kaip 40,6 % ir 100 μM digitonino (Dig) RTA turėtų būti mažesnė kaip 0 %.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas (žr. šio bandymo metodo *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 14 pastraipą ir 3 bei 4 lenteles).

Nešiklis

21. Kaip vienalaikį VC reikėtų naudoti dimetilsulfoksidą (DMSO) arba reikiamą tirpiklį tokios pačios koncentracijos, kokios jis naudojamas skirtingiems teigiamiems bei neigiamiems kontroliniams ėminiams ir bandomosioms cheminėms medžiagoms. Bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti tirpinamos tirpiklyje, kuris soliubilizuoja tą bandomąją cheminę medžiagą ir yra maišus su ląstelių terpe. Tinkami nešikliai yra vanduo, etanolis (nuo 95 % iki 100 % grynumo) ir DMSO. Jei naudojamas DMSO, jo koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 0,1 % (V/V). Naudojant bet kurį nešiklį reikėtų įrodyti, kad naudojant didžiausią jo tūrį jis nėra citotoksiškas ir nėra bandymo atlikimo trukdžių.

Bandomųjų cheminių medžiagų ruošimas

22. Paprastai bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti DMSO ar kitame tinkamame tirpiklyje ir skiesti jas tuo pačiu tirpikliu bendruoju santykiu 1:10, kad būtų galima paruošti terpe skiedžiamus tirpalus.

Tirpumas ir citotoksiškumas. Intervalo nustatymo aspektai

23. Reikėtų atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima nustatyti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalą ir įsitikinti, ar bandomoji cheminė medžiaga neturi tirpumo ir citotoksiškumo problemų. Iš pradžių cheminės medžiagos bandomos, būdamos didžiausiosios 1 μl/ml, 1 mg/ml arba 1 mM koncentracijos, pasirenkant mažiausią. Atsižvelgiant į parengiamojo bandymo metu gautus citotoksiškumo laipsnio arba mažo tirpumo rezultatus, iš pradžių cheminę medžiagą reikėtų bandyti, esant logaritminės eilutės koncentracijos vertėms, pradedant didžiausia priimtina koncentracija (pvz., 1 mM, 100 μM, 10 μM ir kt.), ir pažymėti drumstumo arba nuosėdų ar citotoksiškumo buvimą. Antrojo ir, jei reikia, trečiojo atskiro bandymo koncentracijos turėtų būti tinkamai pakoreguotos, kad būtų gauta geriau išreikšta atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė ir nebūtų naudojamos nustatytos didesnės nei medžiagos tirpumo arba per didelio citotoksiškumo koncentracijos.

24. ER agonistų ir antagonistų atveju dėl vis didesnio citotoksiškumo lygio gali reikšmingai pakisti arba išnykti tipinis sigmoidės formos atsakas ir į tai reikėtų atsižvelgti aiškinant rezultatus. Reikėtų taikyti citotoksiškumo bandymo metodus, kurie gali pateikti 80 % ląstelių gyvybingumo informaciją, atliekant laboratorijos patirtimi pagrįstą bandymą.

25. Jei citotoksiškumo bandymo rezultatai rodytų, kad dėl tokios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ląstelių skaičius sumažėjo 20 % arba daugiau, tokios koncentracijos medžiagą reikėtų laikyti citotoksiška, ir tokią arba didesnę koncentraciją neturėtų būti įvertinama.

Apdorojimas chemine medžiaga ir išdėstymo bandymo plokštelėje schema

26. Cheminių medžiagų atskiestų tirpalų gavimo (1 ir 2 žingsniai) ląstelių apdorojimo (3 žingsnis) procedūra gali būti atliekama taip:

1 žingsnis. Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti vienu santykiu skiedžiama DMSO arba atitinkamu tirpikliu ir įpilama į mikrotitravimo plokštelės šulinėlius, kad būtų gautos galutinės vieno santykio koncentracijos, nustatytos atliekant parengiamąjį intervalo nustatymo bandymą (paprastai kaip geometrinė progresija, pavyzdžiui, 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM ir 10 pM (10^{-3}–10^{-11} M)), ir atliekami trys kartotiniai bandymai.

2 žingsnis. Cheminės medžiagos skiedimas: iš pradžių 1,5 μl bandomosios cheminės medžiagos tirpiklyje skiedžiama iki gaunama 500 μl terpės.

3 žingsnis. Ląstelių apdorojimas chemine medžiaga: 50 μl terpe skiesto tirpalo (paruošto pagal 2 žingsnį) įpilama į bandymo šulinėlį, kuriame yra 10^4 ląstelių/100 μl/šulinėliui.

Rekomenduojamas reikiamas galutinis kiekvieno šulinėlio terpių tūris yra 150 μl. Bandomieji ėminiai ir pamatiniai etalonai gali būti priskirti kaip pateikta 3 ir 4 lentelėje.

3 lentelė

Pamatinių etalonų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER agonistų bandymą

Eilutė	17α-metiltestosteronas			Kortikosteronas			17α-estradiolis			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 – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO); PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nM E2).

27. Pamatiniai etalonai (E2, 17α-estradiolis, 17α-metiltestosteronas ir kortikosteronas) turėtų būti bandomi atliekant kiekvieną atskirą bandymą ttKiekvieno bandymo plokštelėje turėtų būti PC šulinėliai su 1 nM E2, kuriuose galima gauti didžiausia E2 indukciją, ir VC šulinėliai, apdoroti vien tik DMSO (arba reikiamu tirpikliu) (4 lentelė). Jei atliekant tą patį bandymą naudojamos skirtingų šaltinių ląstelės (pvz., skirtingo sėjimo numerio, skirtingos partijos ir kt.), pamatiniai etalonai turėtų būti bandomi kiekvienam ląstelių šaltiniui.

4 lentelė

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO); PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nM E2)

Eilutė	Bandomoji cheminė medžiaga 1			Bandomoji cheminė medžiaga 2			Bandomoji cheminė medžiaga 3			Bandomoji cheminė medžiaga 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	→	→	→	→	→

Bandomųjų cheminių medžiagų ir plokštelės kontrolinių cheminių medžiagų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER agonistų bandymą

5 lentelė

Pamatinių etalonų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER antagonistų bandymą

Eilutė	Tamoksifenas			Flutamidas			Bandomoji cheminė medžiaga 1			Bandomoji cheminė medžiaga 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 – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO), PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nM E2), OHT – 4-hidroksitamoksifenas, Dig – digitoninas.

– sodrinta 25 pM E2.

28. Siekiant įvertinti cheminių medžiagų antagonistinį aktyvumą, į bandymo šulinėlius, esančius nuo A iki G eilutėse, reikėtų pridėti 25 pM E2. Pamatiniai etalonai (tamoksifenas ir flutamidas turėtų būti bandomi atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Kiekvienoje bandymo plokštelėje turėtų būti 1 nM E2 apdoroti PC šulinėliai, kurie gali būti naudojami hERα-HeLa-9 903 ląstelių linijos kokybės kontrolei, VC šulinėliai, apdoroti DMSO (ar tinkamu tirpikliu), 0,1 % DMSO šulinėliai, apdoroti DMSO, atitinkančio E2 pridėto kiekio kontrolinį ėminį, šulinėliai, apdoroti galutinės 1 μM koncentracijos OHT, ir šulinėliai, apdoroti 100 μM Dig (5 lentelė). Paskesnės bandymo plokštelės schema turėtų atitikti pirmiau nurodytą be pamatinio etalono šulinėlių (6 lentelė). Jei atliekant tą patį bandymą naudojamos skirtingų šaltinių ląstelės (pvz., skirtingo sėjimo numerio, skirtingos partijos ir kt.), pamatiniai etalonai turėtų būti bandomi kiekvienam ląstelių šaltiniui.

6 lentelė

Bandomųjų cheminių medžiagų ir plokštelės kontrolinių cheminių medžiagų koncentracijos priskyrimo bandymo plokštelėje pavyzdys, atliekant ER antagonistų bandymą

Eilutė	Bandomoji cheminė medžiaga 1			Bandomoji cheminė medžiaga 2			Bandomoji cheminė medžiaga 3			Bandomoji cheminė medžiaga 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 – nešiklio kontrolinis ėminys (0,1 % DMSO), PC – teigiamas kontrolinis ėminys (1 nM E2), OHT – 4-hidroksitamoksifenas, Dig – digitoninas.

– sodrinta 25 pM E2.

29. Reikėtų patvirtinti pakraščio reiškinių nebuvimą, jei tinka, ir, jei pakraščio reiškiniai įtariami, plokštelės schema turėtų būti pakeista, kad tokių reiškinių nebūtų. Pavyzdžiui, galima naudoti plokštelės schemą su tuščiais kraštiniais šulinėliais.

30. Bandymo plokštelės su įpiltomis cheminėmis medžiagomis turėtų būti inkubuojamos 20–24 h 5 % CO2 inkubatoriuje 37±1 °C temperatūroje, kad atsirastų reporterinio geno produktai.

31. Reikėtų atkreipti ypatingą dėmesį į labai lakius junginius. Tokiais atvejais šalia esantiems šulinėliams gali būti gauti klaidingai teigiami rezultatai ir į tai reikėtų atsižvelgti, turint omenyje tikėtinas ir istorines kontrolinių ėminių vertes. Tais retais atvejais, kai lakumas gali būti pVCroblema, efektyviai atskirti atskirus šulinėlius bandymo metu galėtų „plokštelių sandarikliai“ ir todėl juos rekomenduojama naudoti tokiais atvejais.

32. Kartotiniai galutiniai tos pačios cheminės medžiagos bandymai turėtų būti atliekami skirtingomis dienomis, kad būtų užtikrinta jų nepriklausomybė.

Liuciferazės bandymas

33. Atliekant bandymą galima naudoti prekyboje esantį liuciferazės bandymo reagentą (pvz., Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, arba lygiavertę)) arba standartinę liuciferazės bandymo sistemą (pvz., Promega, E1500, arba lygiavertę), jei reagentai atitinka priimtinumo kriterijus. Bandymo reagentai turėtų būti pasirenkami, atsižvelgiant į naudojamo liuminometro jautrį. Kai naudojama standartinė liuciferazės bandymo sistema, prieš dedant substrato reikėtų naudoti ląstelių lizės reagentą (pvz., Promega, E1531, arba lygiavertį). Liuciferazės reagentas turėtų būti naudojamas pagal gamintojo instrukcijas.

DUOMENŲ ANALIZĖ

ER agonistų bandymas

34. Jei atliekant ER agonistų bandymą reikia gauti santykinį transkripcijos aktyvumą PC (1 nM E2) atžvilgiu, tos pačios plokštelės liuminescencijos signalai gali būti analizuojami atliekant šiuos žingsnius (taip pat yra priimtini kiti matematiniai procesai):

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis.

3 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė normalizuoto PC vertė.

4 žingsnis. Kiekvieno plokštelės šulinėlio normalizuota vertė dalijama iš vidutinės normalizuoto PC vertės (PC=100 %).

Kiekvienam šulinėliui gauta galutinė vertė yra to šulinėlio santykinis transkripcijos aktyvumas palyginti su PC atsaku.

5 žingsnis. Apskaičiuojama bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos grupės vidutinė santykinio transkripcijos aktyvumo vertė. Yra du atsako matmenys: vidutinis transkripcijos aktyvumas (atsakas) ir koncentracija, kuriai esant atsakas gaunamas (žr. tolesnį skirsnį).

EC_{50}, PC_{50} ir PC_{10} gavimo aspektai

35. Reikia turėti visą atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę, kad būtų galima apskaičiuoti EC50, bet ją ne visuomet galima ar įmanoma gauti dėl koncentracijos intervalo apribojimų (pavyzdžiui, dėl citotoksiškumo arba tirpumo problemų). Tačiau, kadangi EC50 ir didžiausiasis indukcijos lygis (atitinkantis Hill lygties viršutinę vertę) yra informatyvūs parametrai, šie parametrai turėtų būti pateikti ataskaitoje, jei įmanoma. EC50 ir didžiausiam indukcijos lygiui apskaičiuoti turėtų būti naudojama tinkama statistinės analizės programa (pvz., Graphpad Prism statistinės analizės programa).Jei atsako priklausomybės nuo koncentracijos duomenims tinka Hillo logistinė lygtis, EC50 turėtų būti skaičiuojama pagal šią lygtį (7):

Y = Apačia + (Viršus − Apačia)/(1+10 exp ((log EC50 − X) × Hillo krypties koeficientas)) Čia:

X – koncentracijos logaritmas; ir

Y – atsakas, kuris prasideda *Apačioje* ir eina iki sigmoidės *Viršaus*. Hillo logistinėje lygtyje *Apačia* yra nustatyta lygi nuliui.

36. Reikėtų turėti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos:

RPCMax – didžiausiąjį bandomosios cheminės medžiagos sukelto atsako lygį, išreikštą kaip tos pačios plokštelės 1 nM E2 tirpalo sukelto atsako procentinė dalis, taip pat PC_{Max} (koncentraciją, susijusią su RPCMax); ir

teigiamų cheminių medžiagų koncentraciją, kuriai gaunama PC10 ir, jei tinka, PC50.

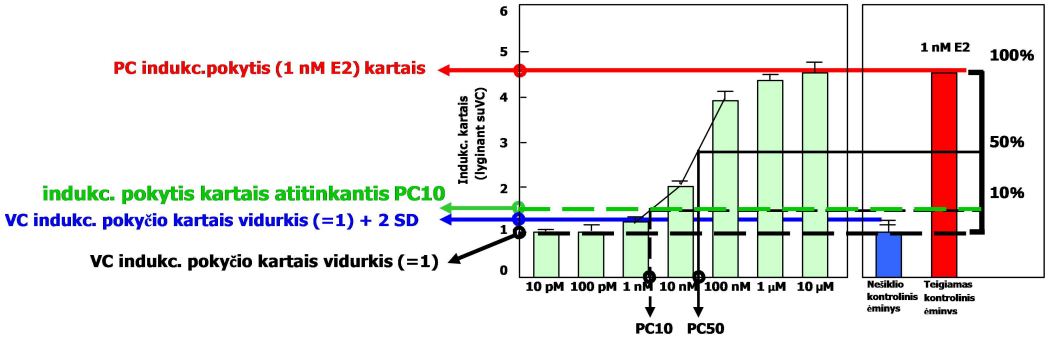
37. PC_x vertė gali būti apskaičiuota atliekant interpoliaciją tarp X ir Y koordinačių 2 taškų, kurių vienas yra šiek tiek aukščiau, o kitas – žemiau PC_x vertės. Jei šiek tiek aukščiau ir žemiau PC_x vertės esančių duomenų taškų koordinatės yra (a, b) ir (c, d), PC_x vertė gali būti apskaičiuota pagal šią lygtį:

$$\log[PC_x] = \log[c]+(x - d)/(d - b)$$

38. PC verčių apibūdinimas pateiktas toliau 1 paveiksle.

1 paveikslas

PC verčių gavimo pavyzdys. PC (1 nM E2) yra įtrauktas į kiekvieną badymo plokštelę



ER antagonistų bandymas

39. Jei atliekant ER antagonistų bandymą reikia gauti santykinį transkripcijos aktyvumą (RTA) sodrinimo kontrolinio ėminio (25 pM E2) atžvilgiu, tos pačios plokštelės liuminescencijos signalai gali būti analizuojami atliekant šiuos žingsnius (taip pat yra priimtini kiti matematiniai procesai):

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis. 3 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė normalizuoto sodrinimo kontrolinio ėminio vertė.

4 žingsnis. Kiekvieno plokštelės šulinėlio normalizuota vertė dalijama iš vidutinės normalizuoto sodrinimo kontrolinio ėminio vertės (sodrinimo kontrolinio ėminio = 100 %).

Kiekvienam šulinėliui gauta galutinė vertė yra to šulinėlio santykinis transkripcijos aktyvumas palyginti su sodrinimo kontrolinio ėminio atsaku.

5 žingsnis. Apskaičiuojama kiekvieno apdoroto ėminio vidutinė santykinio transkripcijos aktyvumo vertė.

IC_{30} ir IC_{50} gavimo aspektai

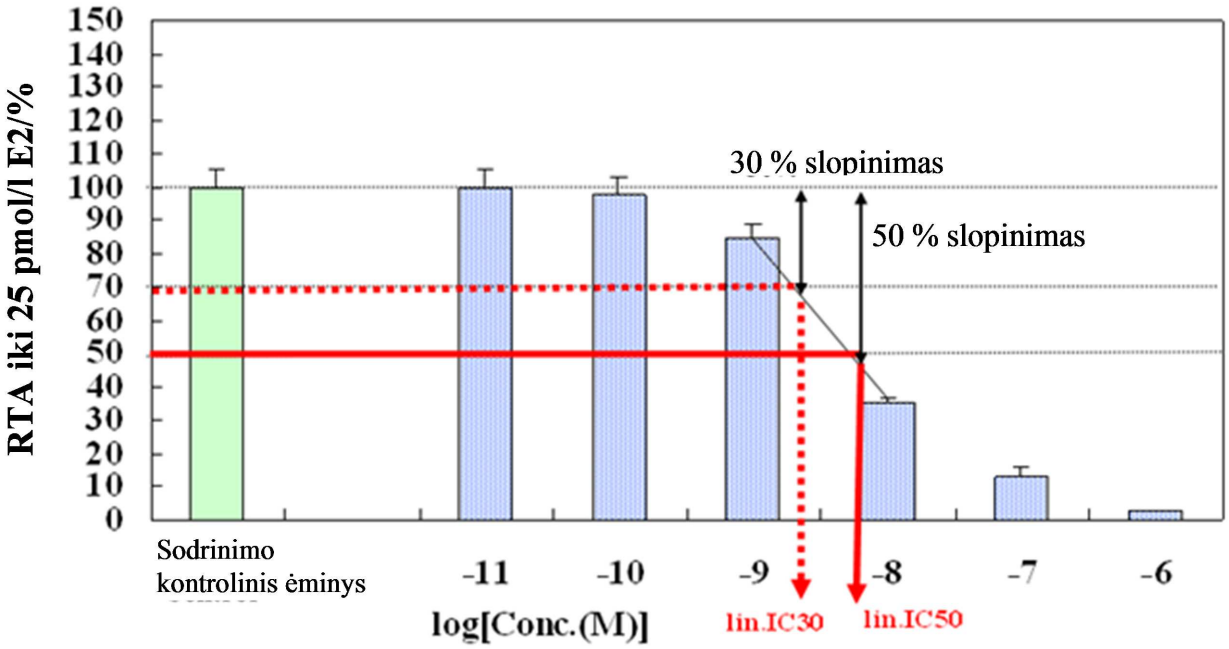
40. Reikėtų gauti teigiamų kontrolinių medžiagų koncentracijos vertes, kurioms gaunama IC_{30} ir, jei tinka, IC_{50}.

41. IC_x vertė gali būti apskaičiuota atliekant interpoliaciją tarp X ir Y koordinačių 2 taškų, kurių vienas yra vos aukščiau, o kitas vos žemiau IC_x vertės. Jei šiek tiek aukščiau ir žemiau IC_x vertės esančių duomenų taškų koordinatės yra (c, d) ir (a, b), IC_x vertė gali būti apskaičiuota pagal šią lygtį:

lin ICx = a − (b − (100 − x)) (a − c)/(b − d)

2 paveikslas

IC verčių gavimo pavyzdys. Sodrinimo kontrolinis ėminys (25 pM E2) yra įtrauktas į kiekvieną badymo plokštelę



RTA – santykinis transkripcijos aktyvumas

42. Rezultatai turėtų būti gauti pagal du (arba tris) nepriklausomus bandymus. Jie dviejų atskirų bandymų rezultatai yra palyginami ir todėl atkuriami, trečiasis atskiras bandymas nėra būtinas. Rezultatai būtų priimtini, jei jie:

— atitinka priimtinumo kriterijus (žr. *Priimtinumo kriterijų* 14–20 pastraipas),

— yra atkuriami.

Duomenų aiškinimo kriterijai

7 lentelė

Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai atliekant ER agonistų bandymą

Teigiamas	Jei ne mažiau kaip dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų gaunama RPC_{Max} yra lygi 10 % teigiamo kontrolinio ėminio atsako arba didesnė.
Neigiamas	Jei ne mažiau kaip dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų negaunama RPC_{Max} , kuri būtų ne mažesnė kaip 10 % teigiamo kontrolinio ėminio atsako.

8 lentelė

Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai atliekant ER antagonistų bandymą

Teigiamas	Jei IC30 apskaičiuojama ne mažiau kaip dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų.
Neigiamas	Jei IC30 negalima apskaičiuoti dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų.

43. Duomenų aiškinimo kriterijai pateikti 7 ir 8 lentelėje. Teigiamus rezultatus apibūdina poveikio dydis ir koncentracija, kuriai esant šis poveikis pasireiškia. Abu šie tikslai įgyvendinami, jei rezultatai išreiškiami kaip koncentracija, kuriai gaunama 50 % (PC_{50}) arba 10 % (PC_{10}) PC vertės, atliekant agonistų bandymą, ir 50 % (IC_{50}) arba 30 % (IC_{30}) sodrinimo kontrolinio ėminio slopinimo vertės, atliekant antagonistų bandymą. Tačiau bandomoji cheminė medžiaga nustatoma kaip teigiama, jei dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų bandomosios cheminės medžiagos sukeltas didžiausias atsakas (RPC_{Max}) yra lygus 10 % PC atsako arba didesnis, ir bandomoji cheminė medžiaga laikoma neigiama, jei dviejuose iš dviejų arba dviejuose iš trijų atskirų bandymų negaunama RPC_{Max}, kuri būtų ne mažesnė kaip 10 % teigiamo kontrolinio ėminio atsako.

44. ER agonistų bandymo PC10, PC50 ir PCMax , ER antagonistų bandymo IC30 ir IC50 galima apskaičiuoti naudojant elektroninę lentelę, pateikta prie bandymo gairių EBPO viešojoje svetainėje ([2]).

45. PC10 arba PC50 ir IC30 arba IC50 vertes pakaktų gauti ne mažiau kaip du kartus. Tačiau, jei tam pačiam koncentracijos intervalui gautos duomenų atskaitos linijos kintamumo variacijos koeficientas (VK; %) yra nepriimtinai didelis, duomenys negali būti laikomi patikimais ir reikėtų identifikuoti didelio kintamumo šaltinį. PC10 apskaičiuoti naudojamų trijų kartotinių ėminių neapdorotų duomenų (t. y. luminescencijos intensyvumo duomenų) VK turėtų būti mažesnis kaip 20 %.

46. Atitiktis priimtinumo kriterijams rodo tinkamą bandymo sistemos veikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų atskirą bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo atskiro bandymo rezultatų pakartojimas yra geriausias būdas užtikrinti tikslių duomenų gavimą.

47. Jei apie teigiamas bandymo chemines medžiagas, ypač PC_{10} – PC_{49} chemines medžiagas, taip pat apie chemines medžiagas, įtariamas per stipriai aktyvinančias liuciferazę, reikia daugiau informacijos nei šių bandymo gairių atrankos ir pirmumo nustatymo tikslams, ER agonistų bandymo atveju galima patvirtinti, kad stebimas liuciferazės aktyvumas yra tik ER*α* specifinis atsakas, naudojant ER*α* antagonistą (žr. 2.1 priedėlį).

BANDYMO ATASKAITA

48. Žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 20 pastraipą.

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, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al*. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

2.1 priedėlis

KLAIDINGAI TEIGIAMI REZULTATAI. NE RECEPTORIAUS TARPININKAUJAMŲ LIUMINESCENCIJOS SIGNALŲ VERTINIMAS

1. ER agonistų bandymo klaidingai teigiami rezultatai gali būti gauti dėl ne ER tarpininkaujamo liuciferazės geno aktyvinimo arba dėl tiesioginio geno produkto aktyvinimo arba dėl nesusijusios fluorescencijos. Tokius reiškinius rodo gauta ne visa arba neįprasta atsako priklausomybės nuo dozės kreivė. Jei tokie reiškiniai įtariami, reikėtų ištirti ER antagonisto (pvz., 4-hidroksitamoksifeno (OHT), ne toksinės koncentracijos) įtaką atsakui. Grynas antagonistas ICI 1827 80 negali tikti šiam tikslui, nes esant pakankamai ICI 1827 80 koncentracijai gali sumažėti VC vertė ir tai turėtų įtakos duomenų analizei.

2. Siekiant užtikrinti šio metodo tinkamumą, toje pačioje plokštelėje reikia bandyti:

   — nežinomos cheminės medžiagos kaip antagonisto aktyvumą su 10 μM OHT ir be jo;

   — VC (tris kartotinius ėminius);

   — OHT (tris kartotinius ėminius);

   — 1 nM E2, kaip agonisto PC (tris kartotinius ėminius);

   — 1 nM E2 + OHT (tris kartotinius ėminius).

Duomenų aiškinimo kriterijai

Pastaba. Visi šulinėliai turėtų būti apdoroti vienos koncentracijos nešikliu.

— Jei nežinomos cheminės medžiagos apdorojimas antagonistu NETURI įtakos jos kaip agonisto aktyvumui, ji klasifikuojama kaip „neigiama“.

— Jei nežinomos cheminės medžiagos aktyvumas kaip agonisto yra visiškai slopinamas, taikomi sprendimo priėmimo kriterijai.

— Jei nežinomos cheminės medžiagos kaip agonisto aktyvumas, esant mažiausiajai koncentracijai, yra lygus PC10 atsakui arba didesnis, ji slopinama esant PC10 lygiam arba didesniam atsakui. Skaičiuojamas skirtumas tarp ER antagonistu neapdorotų ir apdorotų šulinėlių ir šis skirtumas turėtų būti laikomas tikru atsaku ir jį reikėtų naudoti skaičiuojant atitinkamus parametrus, kad būtų galima priimti sprendimą dėl klasifikavimo.

Duomenų analizė

Tikrinamas naudojimo charakteristikų standartas.

Tikrinamas vienodomis sąlygomis apdorotų šulinėlių VK.

1. Skaičiuojamas VC vidurkis.

2. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvienos OHT **ne**apdoroto šulinėlio vertės.

3. Skaičiuojamas OHT vidurkis.

4. Vidutinė VC vertė atimama iš kiekvienos OHT apdoroto šulinėlio vertės.

5. Skaičiuojamas PC vidurkis.

6. Apskaičiuojamas visų su PC susijusių šulinėlių vidutinis transkripcijos aktyvumas.

2.2 priedėlis

DEKSTRANU DENGTOMIS MEDŽIO ANGLIMIS (DCC) APDOROTO SERUMO RUOŠIMAS

1. Serumo apdorojimas dekstranu dengtomis medžio anglimis (DCC) yra bendrasis estrogenų šalinimo iš į ląstelių terpę dedamo serumo, kad neatsirastų atsako sistemingoji paklaida, susijusi su estrogenų likučiais serume. Taikant šią procedūrą galima apdoroti 500 ml galvijų vaisiaus kraujo serumo (FBS).

Komponentai

2. Reikia turėti šias medžiagas ir įrangą:

Medžiagos

Aktyvintosios medžio anglys

Dekstranas

Magnio chlorido heksahidratas ($MgCl_2$ $6H_2O$)

Sacharozė

1 M HEPES buferinis tirpalas (pH 7,4)

Ypač grynas vanduo, gautas naudojant filtravimo sistemą

Įranga

Stiklinis autoklavuojamas indas (reikiamo tūrio); Bendrosios paskirties laboratorinė centrifuga (kurią būtų galima nustatyti 4 °C temperatūrai).

Procedūra

3. Nustatyta tokia procedūra naudojant 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlius:

[1 diena] Ruošiama dekstranu dengtų medžio anglių suspensija 1 l ypač gryno vandens, turinčio 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sacharozės, 2,5 g akmens anglių, 0,25 g dekstrano ir 5 mM HEPES, ir maišoma ant purtyklės per naktį 4 °C temperatūroje.

[2 diena] Suspensija išpilstoma į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlius ir 10 min centrifuguojama 10 000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Skystis virš nuosėdų pašalinamas ir pusė akmens anglių nuosėdų kiekio laikoma 4 °C temperatūroje, kad jas būtų galima naudoti 3 dieną. Iš kitos akmens anglių nuosėdų kiekio pusės ruošiama suspensija su FBS, kuris buvo lėtai atitirpintas, kad būtų išvengta nuosėdų susidarymo, 30 min inaktyvinamas šiluma 56 °C temperatūroje ir supilamas į autoklavuojamą stiklinį indą, pvz., kūginę kolbą. Ši suspensija nestipriai maišoma ant purtyklės per naktį 4 °C temperatūroje.

[3 diena] Suspensija su FBS išpilstoma į centrifugavimo mėgintuvėlius ir 10 min centrifuguojama 10 000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. FBS surenkamas ir supilamas į 2 dieną paruoštas ir laikomas naujas akmens anglių nuosėdas. Gaunama akmens anglių suspensija ir nestipriai maišoma ant purtyklės per naktį 4 °C temperatūroje autoklavuojamame stikliniame inde.

[4 diena] Suspensija išpilstoma į centrifugavimo mėgintuvėlius, 10 min centrifuguojama 10 000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje ir skystis virš nuosėdų sterilizuojamas filtruojant per 0,2 μm sterilų filtrą. Šį DCC apdorotą FBS reikėtų laikyti −20 °C temperatūroje ir jį galima naudoti ne ilgiau kaip metus.

3 Priedėlis

VM7LUC ESTROGENŲ RECEPTORIAUS TRANSAKTYVACIJOS BANDYMAS ESTROGENŲ RECEPTORIAUS AGONISTAMS IR ANTAGONISTAMS IDENTIFIKUOTI

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Šiam bandymui naudojama VM7Luc4E2 ląstelių linija ([1]). Jį patvirtino *Tarpžinybinis nacionalinės toksikologijos programos alternatyvių toksikologinių metodų įvertinimo centras* (NICEATM) ir *Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas* (ICCVAM) (1). VM7Luc ląstelių linijos daugiausia ekspresuoja endogeninį ERα ir nedidelį kiekį endogeninio ERβ (2) (3) (4).

2. Šis bandymas tinka didelei grupei medžiagų, kurios tirpsta dimetilsulfokside (DMSO; CASRN 67-68-5), nereaguoja su DMSO arba su ląstelių kultūros terpe ir nėra citotoksiškos esant bandymo koncentracijai. Jei DMSO naudojimas neįmanomas, galima naudoti kitą nešiklį, pvz., etanolį arba vandenį (žr. 12 pastraipą). Įrodytos VM7Luc ER TA (ant)agonistų bandymo charakteristikos leidžia daryti prielaidą, kad šio bandymo duomenys gali duoti informacijos apie ER tarpininkaujamus veikimo mechanizmus ir jie galėtų būti naudojami medžiagų pirmumui dėl tolesnių bandymų nustatyti.

3. Šis bandymas yra specialiai sukurtas hERα ir hERβ tarpininkaujamai TA aptikti, matuojant chemiliuminescenciją kaip vertinamąją baigtį. Chemiliuminescencija plačiai naudojama atliekant biologinius tyrimus dėl didelio liuminescencijos signalo ir fono santykio. Tačiau jonvabalio liuciferazės aktyvumas atliekant bandymus su ląstelėmis gali būti iškreiptas medžiagų, kurios slopina liuciferazės fermentą, sukeldamos tariamąjį slopinimą arba padidėjusią liuminescenciją dėl baltymų stabilizavimo. Be to, pranešama, kad atliekant kai kuriuos liuciferaze pagrįstus ER reporterinio geno bandymus, kai fitoestrogenų koncentracija yra didesnė kaip 1 μM, atsiranda ne receptoriaus tarpininkaujamos liuminescencijos signalai dėl per didelės liuciferazės reporterinio geno aktyvacijos. Nors atsako priklausomybės nuo dozės kreivė rodo, kad faktinė ER sistemos aktyvacija vyksta esant mažesnėms koncentracijoms, liuciferazės ekspresiją, gautą esant didelėms fitoestrogenų arba panašių junginių, įtariamų sukeliant per didelę fitoestrogenų tipo liuciferazės reporterinio geno aktyvaciją, koncentracijoms, reikia atidžiai ištirti stabiliai transfekuotos ER TA bandymo sistemose (žr. 2 priedėlį).

4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti *BENDRASIS ĮVADAS* ir *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI*. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS (TAIP PAT ŽR. BENDRASIS ĮVADAS)

5. Biologinis tyrimas naudojamas siekiant parodyti ligandų prijungimą prie ER, po kurio vyksta receptoriaus ir ligando komplekso translokacija į branduolį. Branduolyje receptoriaus ir ligando kompleksas prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir atlieka jonvabalio liuciferazės reporterinio geno (*luc*) transkripcijos aktyvaciją, dėl ko gaminama liuciferazė ir skleidžiama šviesa, kurią galima kiekybiškai įvertinti liuminometru. Liuciferazės aktyvumas gali būti įvertintas greitai ir nebrangiai naudojant kelis prekyboje esančius rinkinius. VM7Luc ER TA naudojama atsaku ER pasižyminčia žmogaus krūtų karcinomos ląstelių linija VM7, kuri yra stabiliai transfekuota jonvabalio *luc* reporteriniu dariniu, valdomu keturiais estrogenų atsako elementais prieš pelių pieno liaukų auglio viruso (MMTV) promotorių,

([1]) Iki 2016 m. birželio mėn. ši ląstelių linija buvo vadinama BG1Luc ląstelių linija. BG-1 ląsteles pirmi aprašė Geisinger *et al*. (1998) (12) ir vėliau apibūdino Nacionalinio aplinkos higienos mokslų instituto (NIEHS) tyrėjai (13). Palyginti neseniai buvo nustatyta, kad yra du skirtingi tyrėjų naudojamų BG-1 ląstelių variantai, BG-1 Fr ir BG-1 NIEHS. Šių dviejų BG-1 variantų ląstelių linijų gilesnė analizė, įskaitant DNR bandymus, atlikta Li ir bendradarbių (2014) (14), parodė, kad BG-1 Fr buvo unikali linija ir kad BG-1 NIEHS, t. y. bandymui tobulinti naudojama pradinė ląstelių linija buvo ne BG1 žmogaus kiaušidžių karcinomos ląstelių linija, bet MCF7 žmogaus krūtų vėžio ląstelių linijos variantas. Atliekant bandymą naudota ląstelių linija, pirmiau nurodoma kaip BG1Luc4E2 (15), dabar bus žymima VM7Luc4E2 („V" – variantas; „M7" – MCF7 ląstelės). Panašiai bandymas bus pažymėtas VM7Luc ER TA. Nors dėl to pasikeičia ląstelių linijos, kuria yra pagrįstas bandymas, kilmė, tai neturi įtakos jau paskelbtiems patvirtinimo tyrimams ar šio bandymo naudingumui ir taikymui, atliekant estrogeninių arba antiestrogeninių cheminių medžiagų atranką.

kad būtų aptiktos *in vitro* ER agonistų arba antagonistų aktyvumo medžiagos. Šis MMTV promotorius rodo tik nedidelį kryžminį reaktyvumą su kitais steroidiniais ir nesteroidiniais hormonais (8). Duomenų aiškinimo kriterijai išsamiai aprašyti 41 pastraipoje. Trumpai sakant, teigiamas atsakas identifikuojamas pagal atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę, turinčią ne mažiau kaip tris taškus, kurių paklaidos brūkšneliai (vidurkis ± SN) nepersikloja, taip pat pagal amplitudės pokytį (normalizuoto santykinio šviesos vieneto (RLU) ne mažesnės kaip 20 % agonistų bandymo pamatinio etalono (17β-estradiolio (E2; CASRN 50-28-2), antagonistų bandymo – raloksifeno HCl (Ral; CASRN 84 449-90-1)/E2 didžiausiosios vertės).

PROCEDŪRA

Ląstelių linija

6. Atliekant bandymą turėtų būti naudojama stabiliai transfekuotų VM7Luc4E2 ląstelių linija. Šiuo metu ląstelių liniją galima gauti pagal techninio licencijų išdavimo sutartį tik iš Kalifornijos Universiteto (Deivisas, Kalifornija, JAV) ([2]) ir iš *Xenobiotic Detection Systems Inc.* (Daramas, Šiaurės Karolina, JAV) ([3]).

Ląstelių linijos stabilumas

7. Siekiant užtikrinti ląstelių linijos stabilumą ir vientisumą, atitirpinto pradinio šaltinio ląsteles reikėtų auginti ląstelių kultūros terpėje daugiau nei vieną sėjimą (žr. 9 pastraipą). Ląstelės neturėtų būti persėjamos daugiau kaip 30 kartų. VM7Luc4E2 ląstelių linijos 30 persėjimų trukmė yra maždaug trys mėnesiai.

Ląstelių auginimo ir sėjimo sąlygos

8. Reikėtų laikytis procedūrų, nurodytų geros ląstelių auginimo praktikos rekomendacijose (5) (6), siekiant užtikrinti visų medžiagų ir metodų kokybė, kad būtų išsaugotas atliekamų darbų vientisumas, tinkamumas ir atkuriamumas.

9. VM7Luc4E2 ląstelės auginamos RPMI 1 640 terpėje, papildytoje 0,9 % penicilino ir streptomicino bei 8,0 % galvijų vaisiaus kraujo serumu (FBS), specialiame audinių auginimo inkubatoriuje, esant 37 ^{o}C ± 1 ^{o}C, 90 % ± 5 % drėgmei ir 5,0 % ± 1 % CO_2 ore.

10. Pasiekus ~ 80 % susiliejimą, VM7Luc4E2 ląstelės persėjamos į aplinką be estrogenų ir 48 h kondicionuojamos prieš jas sėjant į 96 šulinėlių plokšteles, kuriose ląsteles būtų galima apdoroti bandomosiomis cheminėmis medžiagomis ir analizuoti sukeltą nuo estrogenų priklausomą liuciferazės aktyvumą. Estrogenų neturinčią terpę (EFM) sudaro *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM) be fenolio raudonojo, papildyta 4,5 % dekstranu dengtomis medžio anglimis apdorotu FBS, 1,9 % L-glutamino bei 0,9 % penicilino ir streptomicino. Visi plastikiniai indai neturėtų rodyti estrogeninio aktyvumo (žr. išsamų protokolą (7)).

Priimtinumo kriterijai

11. Bandymo priėmimas arba atmetimas grindžiamas kiekvieno bandymo 96 šulinėlių plokštelėje pamatinio etalono ir kontrolinių ėminių rezultatų įvertinimu. Kiekvienas pamatinis etalonas bandomas kelių koncentracijų ir yra kartotiniai kiekvienos pamatinio etalono ir kontrolinių medžiagų koncentracijos ėminiai. Šių parametrų rezultatai lyginami su

([2]) *Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis,* CA 95616, e. paštas msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([3]) *Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham* NC, 27704 JAV, e. paštas: info@dioxins.com, telefonas 919-688-4804, faksas 919-688-4404.

kokybės kontrolinių ėminių rezultatais, paimtais iš agonistų ir antagonistų istorinių duomenų bazių, kurias kiekviena laboratorija sukuria, atlikdama kvalifikacijos įrodymo bandymus. Istorinių duomenų bazės yra nuolat atnaujinamos pamatinių etalonų ir kontrolinių ėminių vertėmis. Dėl įrangos arba laboratorijos sąlygų pakeitimo gali prireikti sukurti atnaujintų istorinių duomenų bazes.

Agonistų bandymas

Intervalo nustatymo bandymas

- Indukcija: indukciją plokštelėje reikėtų matuoti dalijant vidutinę didžiausiąją E2 pamatinio etalono santykinio šviesos vieneto (RLU) vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės. Paprastai gaunamas indukcijos pokytis penkis kartus, bet priimtinumo tikslu indukcija turėtų padidėti keturis kartus arba daugiau.

- DMSO kontrolinio ėminio rezultatai: tirpiklio kontrolinio ėminio RLU vertės turėtų būti istorinės tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės 2,5 standartinio nuokrypio intervale.

- Jei bandymas neatitinka kurio nors iš priimtinumo kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Galutinis bandymas

Jį sudaro agonistų intervalo nustatymo bandymo priimtinumo kriterijai ir:

- Pamatinio etalono rezultatai: E2 pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sigmoidės formos ir ne mažiau kaip trys vertės turėtų būti tiesiojoje atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivės dalyje.

- Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai: metoksichloro kontrolinės medžiagos RLU vertės turėtų būti didesnės nei DMSO vidurkio ir trijų DMSO vidurkio standartinių nuokrypių suma.

- Jei bandymas neatitinka kurio nors vieno iš priimtinumo kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Antagonistų bandymas

Intervalo nustatymo bandymas

- Sumažėjimas: sumažėjimas plokštelėje matuojamas dalijant vidutinę didžiausiąją Ral/E2 pamatinio etalono RLU vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės. Paprastai gaunamas sumažėjimas penkis kartus, bet priimtinumo tikslu sumažėjimas turėtų būti tris kartus arba didesnis.

- E2 kontrolinio ėminio rezultatai: E2 kontrolinio ėminio RLU vertės turėtų būti istorinės E2 kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės 2,5 standartinio nuokrypio intervale.

- DMSO kontrolinio ėminio rezultatai: tirpiklio kontrolinio ėminio RLU vertės turėtų būti istorinės tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės 2,5 standartinio nuokrypio intervale.

• Jei bandymas neatitinka kurio nors vieno iš priimtinumo kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Galutinis bandymas

Jį sudaro antagonistų intervalo nustatymo bandymo priimtinumo kriterijai ir:

• Pamatinio etalono rezultatai: Ral/E2 pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sigmoidės formos ir ne mažiau kaip trys vertės turėtų būti tiesiojoje atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivės dalyje.

• Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai: tamoksifeno/E2 kontrolinės medžiagos RLU vertės turėtų būti mažesnės nei E2 kontrolinio ėminio vidurkio ir trijų E2 kontrolinio ėminio vidurkio standartinių nuokrypių skirtumas.

• Jei bandymas neatitinka kurio nors vieno iš priimtinumo kriterijų, jis turėtų būti atmestas ir pakartotas.

Pamatiniai etalonai, teigiamas ir nešiklio kontroliniai ėminiai

Nešiklio kontrolinis ėminys (agonistų ir antagonistų bandymai)

12. Bandomosioms cheminėms medžiagoms tirpinti naudojamas nešiklis turėtų būti bandomas kaip nešiklio kontrolinis ėminys. Kaip nešiklis atliekant VM7Luc ER TA bandymo patvirtinimą buvo naudojamas 1 % (V/V) dimetilsulfoksidas (DMSO, CASRN 67-68-5) (žr. 24 pastraipą). Jei naudojamas kitas nei DMSO nešiklis, visi pamatiniai etalonai, kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos naudojant tą patį nešiklį, jei tinka.

Pamatinis etalonas (agonistų intervalo nustatymas)

13. Pamatinis etalonas yra E2 (CASRN 50-28-2). Atliekant intervalo nustatymo bandymą, pamatinį etaloną sudaro vienu santykiu atskiestų keturių koncentracijos verčių E2 tirpalai ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ ir $2,87 \times 10^{-12}$ M), kiekvienos koncentracijos tirpalą bandant dviejuose šulinėliuose.

Pamatinis etalonas (galutinis agonistų bandymas)

14. Atliekant galutinį E2 bandymą, jį sudaro 1:2 santykiu atskiestų vienuolikos koncentracijos verčių E2 tirpalai (nuo $3,67 \times 10^{-10}$ iki $3,59 \times 10^{-13}$ M), bandant kiekvieną tirpalą dviejuose šulinėliuose.

Pamatinis etalonas (antagonistų intervalo nustatymas)

15. Pamatinis etalonas yra Ral (CASRN 84 449-90-1) ir E2 (CASRN 50-28-2) derinys. Atliekant Ral/E2 intervalo nustatymo bandymą, jį sudaro vienu santykiu atskiestų trijų koncentracijos verčių Ral tirpalai ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$, ir $1,92 \times 10^{-10}$M) ir vienos koncentracijos ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 tirpalas, bandant kiekvieną tirpalą dviejuose šulinėliuose.

Pamatinis etalonas (galutinis antagonistų bandymas)

16. Atliekant galutinį Ral/E2 bandymą, jį sudaro 1:2 santykiu atskiestų devynių koncentracijos verčių Ral tirpalai (nuo $2,45 \times 10^{-8}$ iki $9,57 \times 10^{-11}$ M) ir vienos koncentracijos ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 tirpalas, bandant kiekvieną tirpalą dviejuose šulinėliuose.

Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga (agonistas)

17. Silpno teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos ėminys yra 9,06 S 10^{-6} M *p,p'*-metoksichloro (metoksichloras; CASRN 72-43-5) tirpalas EFM.

Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga (antagonistas)

18. Silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga yra 3,36 S 10^{-6} M tamoksifeno (CASRN 10 540-29-1) ir 9,18 × 10^{-11} M E2 tirpalas EFM.

E2 kontrolinis ėminys (tik antagonistų bandymas)

19. E2 kontrolinis ėminys yra 9,18 × 10^{-11} M E2 tirpalas EFM ir naudojamas kaip neigiamų kontrolinių ėminių atskaitos linija.

Indukcijos padidėjimas kartais (agonistas)

20. Pamatinio etalono (E2) liuciferazės aktyvumo indukcija matuojama dalijant vidutinę didžiausiąją E2 pamatinio etalono RLU vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės ir rezultatas turėtų būti didesnis nei keturi kartai.

Sumažėjimas kartais (antagonistas)

21. Vidutinis pamatinio etalono (Ral/E2) liuciferazės aktyvumas matuojamas dalijant vidutinę didžiausiąją Ral/E2 pamatinio etalono RLU vertę iš vidutinės DMSO kontrolinio ėminio RLU vertės ir jis turėtų būti didesnis nei trys kartai.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas (žr. šio bandymo metodo *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 14 pastraipą ir 3 bei 4 lenteles).

Nešiklis

22. Bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti tirpinamos tirpiklyje, kuris soliubilizuoja bandomąją cheminę medžiagą ir yra maišus su ląstelių terpe. Tinkami nešikliai yra vanduo, etanolis (nuo 95 % iki 100 % grynumo) ir DMSO. Jei naudojamas DMSO, jo koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 % (V/V). Naudojant bet kurį nešiklį reikėtų įrodyti, kad naudojant didžiausią jo tūrį jis nėra citotoksiškas ir nėra bandymo atlikimo trukdžių. Pamatiniai etalonai ir kontrolinės medžiagos tirpinamos 100 % tirpiklyje ir toliau skiedžiamos iki reikiamos koncentracijos EFM.

Bandomųjų cheminių medžiagų ruošimas

23. Bandomosios cheminės medžiagos tirpinamos 100 % DMSO (arba tinkamame tirpiklyje) ir toliau skiedžiamos iki reikiamos koncentracijos EFM. Reikėtų palaukti, kol visos bandomosios cheminės medžiagos prieš jas tirpinant ir skiedžiant pasiekia kambario temperatūrą. Kiekvienam bandymui reikėtų ruoši naujus bandomųjų cheminių medžiagų tirpalus. Tirpaluose neturi būti pastebimų nuosėdų arba drumstumo. Galima ruošti didelius pamatinių etalonų ir kontrolinių medžiagų pradinių tirpalų tūrius; tačiau galutinius pamatinių etalonų, kontrolinių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų atskiestus tirpalus reikėtų ruošti iš naujo prieš kiekvieną bandymą ir panaudoti per 24 h nuo paruošimo.

Tirpumas ir citotoksiškumas. Intervalo nustatymo aspektai

24. Intervalo nustatymo bandymą sudaro septyni 1:10 santykiu atskiesti tirpalai, bandomi du kartus. Iš pradžių, atliekant agonistų bandymus, bandomosios cheminės medžiagos bandomos didžiausiosios 1 mg/ml (~1 mM) koncentracijos, o atliekant antagonistų bandymus – 20 µg/ml (~10 µM). Intervalo nustatymo bandymai atliekami, kad būtų galima nustatyti:

— pradines bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas, kurias reikėtų naudoti atliekant galutinį bandymą;

— atskiestų (1:2 arba 1:5) tirpalų koncentracijos vertes, kurias reikėtų naudoti atliekant galutinį bandymą.

25. Ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo vertinimas yra įtrauktas į agonistų ir antagonistų bandymo protokolus (7) ir sudaro intervalo nustatymo bei galutinių bandymų dalį. Citotoksiškumo nustatymo metodas, taikytas ląstelių gyvybingumui vertinti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimą (1), buvo palyginamasis kokybinis vizualaus stebėjimo metodas; tačiau galima taikyti kiekybinį citotoksiškumo nustatymo metodą (žr. protokolą (7)). Negalima naudoti duomenų, gautų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, kuriai esant gyvybingumas sumažėja daugiau kaip 20 %.

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga ir išdėstymo bandymo plokštelėje schema

26. Ląstelės skaičiuojamos ir sėjamos 96 šulinėlių audinių kultūros plokštelėse (2×10^5 ląstelių šulinėliui) EFM ir inkubuojamos 24 h, kad ląstelės galėtų prisitvirtinti prie plokštelės. EFM pašalinama, pakeičiama bandomosiomis ir etaloninėmis cheminėmis medžiagomis EFM ir plokštelės inkubuojamos 19–24 h. Reikėtų atkreipti ypatingą dėmesį į labai lakias medžiagas, nes šalia jų esantiems kontrolinių ėminių šulinėliams gali būti gauti klaidingai teigiami rezultatai. Efektyviai atskirti atskirus šulinėlius bandymo metu galėtų „plokštelių sandarikliai“ ir todėl juos rekomenduojama naudoti tokiais atvejais.

Intervalo nustatymo bandymai

27. Atliekant intervalo nustatymo bandymą naudojami visi 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai, kad būtų galima bandyti iki šešių bandomųjų cheminių medžiagų kaip 1:10 santykiu atskiestų septynių tirpalų du kartotinius ėminius (žr. 1 ir 2 paveikslus).

— Atliekant *agonisto* intervalo nustatymo bandymą, naudojami E2, kaip pamatinio etalono, keturių koncentracijos verčių du kartotiniai ėminiai ir DMSO kontrolinio ėminio keturi kartotinių ėminių šulinėliai.

— Atliekant *antagonisto* intervalo nustatymo bandymą, naudojami trijų Ral/E2 koncentracijos verčių ir $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, kaip pamatinio etalono, du kartotiniai ėminiai ir po tris E2 bei DMSO kartotinius kontrolinius ėminius.

1 paveikslas.

Agonistų intervalo nustatymo bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: nuo E2-1 iki E2-4 – E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC1-1 iki TC1-7 – 1 bandomosios cheminės medžiagos (TC1) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-7 – 2 bandomosios cheminės medžiagos (TC2) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC3-1 iki TC3-7 – 3 bandomosios cheminės medžiagos (TC3) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC4-1 iki TC4-7 – 4 bandomosios cheminės medžiagos (TC4) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC5-1 iki TC5-7 – 5 bandomosios cheminės medžiagos (TC5) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC6-1 iki TC6-7 – 6 bandomosios cheminės medžiagos (TC6) koncentracija (nuo didelės iki mažos); VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

2 paveikslas.

Antagonistų intervalo nustatymo bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: E2 – E2 kontrolinis ėminys; nuo Ral-1 iki Ral-3 – raloksifeno/E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC1-1 iki TC1-7 – 1 bandomosios cheminės medžiagos (TC1) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-7 – 2 bandomosios cheminės medžiagos (TC2) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC3-1 iki TC3-7 – 3 bandomosios cheminės medžiagos (TC3) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC4-1 iki TC4-7 – 4 bandomosios cheminės medžiagos (TC4) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC5-1 iki TC5-7 – 5 bandomosios cheminės medžiagos (TC5) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC6-1 iki TC6-7 – 6 bandomosios cheminės medžiagos (TC6) koncentracija (nuo didelės iki mažos); VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

Pastaba. Visos bandomosios cheminės medžiagos bandomos esant $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.28.
Rekomenduojamas reikiamas galutinis kiekvieno šulinėlio terpių tūris yra 200 µl. Naudojamos tik tos bandymo plokštelės, kuriose visų šulinėlių ląstelių gyvybingumas yra 80 % ir didesnis.

29. Galutinio ***agonistų*** bandymo pradinių koncentracijų nustatymas nuodugniai aprašytas agonistų bandymo protokole (7). Trumpai tariant, naudojami tokie kriterijai:

— jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje nėra taškų, kurių vertė yra didesnė nei vidurkio ir trijų DMSO kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių suma, galutiniai bandymai būtų atliekami naudojant 1:2 santykiu atskiestų 11 tirpalų, pradedant didžiausiojo tirpumo koncentracija;

— jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje yra taškų, kurių vertė yra didesnė nei vidurkio ir trijų DMSO kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių suma, pradinė koncentracija, kurią reikia naudoti 11 taškų skiedimo schemoje, atliekant galutinį bandymą, turėtų būti vienu logaritmo vienetu didesnė nei koncentracija, kuriai gaunama didžiausia pakoreguota RLU vertė, atliekant intervalo nustatymo bandymą. 11 taškų skiedimo schema būtų pagrįsta skiedimu santykiu 1:2 arba 1:5 atsižvelgiant į šiuos kriterijus:

turėtų būti naudojami visi 1:2 santykiu atskiesti 11 tirpalai, jei gautas koncentracijos intervalas aprėptų visą atsakų intervalą, atsižvelgiant į intervalo nustatymo bandyme gauta atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę. Priešingu atveju skiedžiama santykiu 1:5;

— jei atliekant intervalo nustatymo bandymą bandomajai cheminei medžiagai gaunama dviejų krypčių atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė, reikėtų gauti atsakymą dėl abiejų kreivės dalių, atliekant galutinį bandymą.

30. Galutinio ***antagonistų*** bandymo pradinių koncentracijų nustatymas nuodugniai aprašytas antagonistų bandymo protokole (7). Trumpai tariant, naudojami tokie kriterijai:

— jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje nėra taškų, kurių vertė yra mažesnė nei vidurkio ir trijų E2 kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių skirtumas, galutiniai bandymai atliekami naudojant 1:2 santykiu atskiestų 11 tirpalų, pradedant didžiausiojo tirpumo koncentracija;

— jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivėje yra taškų, kurių vertė yra mažesnė nei vidurkio ir trijų E2 kontrolinio ėminio standartinių nuokrypių skirtumas, pradinė koncentracija, naudojama 11 taškų skiedimo schemoje, atliekant galutinį bandymą, turėtų būti viena iš šių:

• koncentracija, kuriai gaunama mažiausia pakoreguota RLU vertė, atliekant intervalo nustatymo bandymą;

• didžiausioji tirpumo koncentracija (žr. antagonistų protokolo (7) 14-2 paveikslą)

• mažiausioji citotoksiškumo koncentracija (žr. antagonistų protokolo (7) 14-3 paveikslo atitinkamą pavyzdį);

— 11 taškų skiedimo schema būtų pagrįsta skiedimu santykiu 1:2 arba 1:5 atsižvelgiant į šiuos kriterijus:

turėtų būti naudojami visi 1:2 santykiu atskiesti 11 tirpalai, jei gautas koncentracijos intervalas aprėptų visą atsakų intervalą, atsižvelgiant į intervalo nustatymo bandyme gauta atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę. Priešingu atveju reikėtų skiesti santykiu 1:5.

Galutiniai bandymai

31. Galutiniai bandymai atliekami naudojant vienu santykiu atskiestų 11 tirpalų (1:2 arba 1:5 santykiu atskiestų tirpalų, atsižvelgiant į galutinių bandymų pradinės koncentracijos kriterijus), kai kiekviena koncentracija bandoma trijuose 96 šulinėlių plokštelės šulinėliuose (žr. 3 ir 4 paveikslus).

— Atliekant *agonistų* galutinį bandymą, kaip pamatinis etalonas naudojamas 11 koncentracijos verčių E2, imant po du kartotinius ėminius. Į kiekvieną plokštelę įtraukti keturi DMSO kontrolinio ėminio kartotiniai šulinėliai ir keturi metoksichloro kontrolinio ėminio ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M) kartotiniai šulinėliai.

— Atliekant *antagonistų* galutinį bandymą, kaip pamatinis etalonas naudojamas Ral/E2, devynių Ral koncentracijos verčių ir $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, imant po du kartotinius ėminius, keturi kartotiniai $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 kontrolinio ėminio šulinėliai, keturi kartotiniai DMSO kontrolinių ėminių šulinėliai ir keturi $3{,}36 \times 10^{-6}$ M tamoksifeno kartotiniai šulinėliai.

3 paveikslas.

Agonistų galutinio bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: nuo TC1-1 iki TC1-11 – 1 bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-11 – 2 bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo E2-1 iki E2-11 – E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); Meth – p, p'-metoksichloras, silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga; VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).

4 paveikslas.

Antagonistų galutinio bandymo 96 šulinėlių plokštelės schema

	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

Santrumpos: E2 – E2 kontrolinis ėminys; nuo Ral-1 iki Ral-9 – raloksifeno/E2 pamatinio etalono koncentracija (nuo didelės iki mažos); Tam – tamoksifeno/E2 silpno teigiamo poveikio kontrolinė medžiaga; nuo TC1-1 iki TC1-11 – 1 bandomosios cheminės medžiagos (TC1) koncentracija (nuo didelės iki mažos); nuo TC2-1 iki TC2-11 – 2 bandomosios cheminės medžiagos (TC2) koncentracija (nuo didelės iki mažos); VC – nešiklio kontrolinis ėminys (DMSO 1 % V/V EFM).
Pastaba. Kaip pažymėta, visuose etaloninių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų šulinėliuose yra pastovi E2 koncentracija ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).

32. Kartotiniai galutiniai tos pačios cheminės medžiagos bandymai turėtų būti atliekami skirtingomis dienomis, kad būtų užtikrinta jų nepriklausomybė. Reikėtų atlikti ne mažiau kaip du galutinius bandymus. Jei bandymų rezultatai prieštarauja vienas kitam (pvz., vieno bandymo rezultatas yra teigiamas, kito – neigiamas) arba vienas iš bandymų neatitiko reikalavimų, turėtų būti atliekamas trečiasis papildomas bandymas.

Liuminescencijos matavimas

33. Liuminescencija matuojama nuo 300 nm iki 650 nm srityje, naudojant purškiamąjį liuminometrą ir programinę įrangą, kuri reguliuoja įpurškiamą tūrį ir matavimo intervalą (7). Kiekvieno šulinėlio skleidžiama šviesa išreiškiama RLU vienam šulinėliui.

DUOMENŲ ANALIZĖ

EC_{50} arba IC_{50} nustatymas

34. EC_{50} vertė (pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos efektyviosios koncentracijos (agonistų)) ir IC_{50} vertė (pusė didžiausiosios bandomosios cheminės medžiagos efektyviosios slopinamosios koncentracijos (antagonistų)) nustatoma pagal atsako priklausomybės nuo koncentracijos duomenis. Jei vienai arba kelioms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėms gaunamas teigiamas rezultatas, bandomosios cheminės medžiagos pusės didžiausiojo atsako koncentracija (IC_{50} arba EC_{50}) skaičiuojama atliekant Hillo funkcijos analizę arba taikant tinkamą alternatyvų metodą. Hillo funkcija yra keturių parametrų logistinis matematinis modelis, kuris susieja bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją su atsaku (paprastai pagal sigmoidę) pagal tokią lygtį:

$$Y = apačia + \frac{(viršus - apačia)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hillo\ krypties\ koef.}$$

Čia:
Y- atsakas (t. y. RLU);
X- koncentracijos logaritmas;
Apačia- mažiausiasis atsakas;

Viršus- didžiausiasis atsakas;

lg EC_{50} (arba lg IC_{50})- X, kaip atsako nuo viršaus iki apačios vidurio, logaritmas;

Hillo krypties koeficientas- kreivės statumas.

Taikant modelį skaičiuojama viršaus, apačios, Hillo krypties koeficiento geriausia atitiktis ir IC_{50} bei EC_{50} parametrai. EC_{50} ir IC_{50} vertėms apskaičiuoti turėtų būti naudojama tinkama statistinės analizės programa (pvz., Graphpad Prism^{R} statistinės analizės programa).

Riktų nustatymas

35. Tinkamas statistinis pagrindimas būtų lengvesnis, įtraukiant (bet juo neapsiribojant) Q kriterijų (žr. agonistų ir antagonistų protokolus (7) apie tai, kaip nustatyti „netinkamus“ šulinėlius, kurie būtų pašalinti iš duomenų analizės).

36. Jei tai E2 pamatinio etalono kartotiniai ėminiai (imtį sudaro du ėminiai), tam tikros E2 koncentracijos kartotinio ėminio pakoreguota RLU vertė laikoma riktu, jei ši vertė yra daugiau kaip 20 % didesnė arba mažesnė nei tos pačios koncentracijos pakoreguota RLU vertė iš istorinių duomenų bazės.

Liuminometro duomenų rinkimas ir koregavimas atliekant intervalo nustatymo bandymą

37. Neapdorotus liuminometro duomenis reikėtų perkelti į bandymui sukurtą elektroninę lentelę. Reikėtų nustatyti, ar yra duomenų taškai kaip riktai, kuriuos reikia pašalinti. (Žr. bandymo priimtinumo kriterijai dėl analizės metu nustatomų parametrų). Reikėtų atlikti tokius skaičiavimus:

Agonistas

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO nešiklio kontrolinio ėminio (VC) vertė.

2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis

3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (E2) vidutinis indukcijos pokytis kartais.

4 žingsnis. Apskaičiuojama bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė EC_{50} vertė.

Antagonistas

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis

3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (Ral/E2) vidutinis sumažėjimas kartais.

4 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė pamatinio etalono E2 vertė.

5 žingsnis. Apskaičiuojama bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė IC_{50} vertė.

Liuminometro duomenų rinkimas ir koregavimas atliekant galutinį bandymą

38. Neapdorotus liuminometro duomenis reikėtų perkelti į bandymui sukurtą elektroninę lentelę. Reikėtų nustatyti, ar yra duomenų taškai kaip riktai, kuriuos reikia pašalinti. (Žr. bandymo priimtinumo kriterijai dėl analizės metu nustatomų parametrų). Atliekami tokie skaičiavimai:

Agonistas

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis

3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (E2) vidutinis indukcijos pokytis kartais.

4 žingsnis. Apskaičiuojama E2 ir bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė EC_{50} vertė.

5 žingsnis. Apskaičiuojama pakoreguota vidutinė metoksichloro RLU vertė.

Antagonistas

1 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė DMSO VC vertė.

2 žingsnis. Vidutinė DMSO VC vertė atimama iš kiekvieno šulinėlio vertės, kad būtų galima normalizuoti duomenis

3 žingsnis. Apskaičiuojamas pamatinio etalono (Ral/E2) vidutinis indukcijos pokytis kartais.

4 žingsnis. Apskaičiuojama Ral/E2 ir bandomųjų cheminių medžiagų vidutinė IC_{50} vertė.

5 žingsnis. Apskaičiuojama pakoreguota vidutinė tamoksifeno RLU vertė.

6 žingsnis. Apskaičiuojama vidutinė pamatinio etalono E2 vertė.

Duomenų aiškinimo kriterijai

39. VM7Luc ER TA yra numatytas kaip įrodomosios vertės analizės metodo dalis, kad būtų lengviau nustatyti pirmumą dėl endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymo *in vivo*. Šios pirmumo nustatymo procedūros dalis bus bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimas kaip teigiamos ar neigiamos, atsižvelgiant į ER agonisto ar antagonisto aktyvumą. Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai, taikyti atliekant VM7Luc ER TA patvirtinimo tyrimą, aprašyti 1 lentelėje.

1 lentelė.

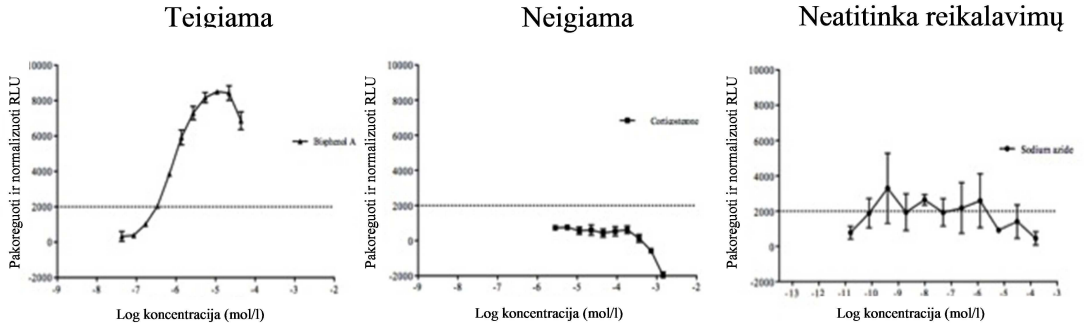
Teigiamo ir neigiamo sprendimo kriterijai

AGONISTŲ AKTYVUMAS	
Teigiamas	— Visų bandomųjų cheminių medžiagų, klasifikuojamų kaip *teigiamos* dėl ER agonistų aktyvumo, atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sudaryta iš atskaitos linijos, teigiamo krypties koeficiento linijos ir baigtis gulste arba smaile. Kai kuriais atvejais galima apibrėžti tik dvi iš šių charakteristikų (atskaitos liniją – teigiamo krypties koeficiento liniją arba teigiamo krypties koeficiento liniją – smailę). — Teigiamo krypties koeficiento liniją turėtų būti gauta per ne mažiau kaip tris taškus su nepersiklojančiais paklaidos brūkšneliais (vidurkis ± SN). Atskaitos liniją sudarantys taškai pašalinami, bet į tiesinę kreivės dalį galima įtraukti smailę arba pirmąjį gulstės tašką. — Teigiamam klasifikavimui reikia, kad atsako amplitudė, kaip skirtumas tarp atskaitos linijos ir smailės, būtų ne mažesnė kaip 20 % didžiausiosios pamatinio etalono E2 vertės (t. y. 2000 RLU arba daugiau, kai didžiausioji pamatinio etalono [E2] atsako vertė nustatoma 10 000 RLU). — Jei įmanoma, reikėtų apskaičiuoti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos EC_{50} vertę.
Neigiamas	Tam tikros koncentracijos vidutinis koreguotas RLU yra lygus DMSO kontrolinio ėminio vidutinės RLU vertės ir DMSO RLU trijų standartinių nuokrypių sumai arba mažesnis.
Neatitinka reikalavimų	Jei neįmanoma paaiškinti, ar duomenys tinka aktyvumo buvimui ar nebuvimui įrodyti dėl didelių kokybinių ar kiekybinių apribojimų, jie laikomi neatitinkančiais reikalavimų ir negali būti naudojami nustatant, ar bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama ar neigiama. Chemines medžiagas reikėtų bandyti iš naujo.
ANTAGONISTŲ AKTYVUMAS	
Teigiamas	— Pagal bandomosios cheminės medžiagos duomenis gaunama atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė, sudaryta iš atskaitos linijos ir neigiamo krypties koeficiento linijos. — Neigiamo krypties koeficiento liniją turėtų būti gauta per ne mažiau kaip tris taškus su nepersiklojančiais paklaidos brūkšneliais; atskaitos liniją sudarantys taškai pašalinami, bet į tiesinę kreivės dalį galima įtraukti pirmąjį gulstės tašką. — Turėtų būti ne mažesnis kaip 20 % aktyvumo sumažėjimas palyginti su pamatinio etalono Ral/E2 didžiausiąja verte (t. y. 8 000 RLU arba mažiau, kai didžiausioji pamatinio etalono [Ral/E2] atsako vertė nustatoma 10 000 RLU). — Didžiausioji citotoksiškumo nesukelianti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti mažesnė arba lygi 1×10^{-5} M. — Jei įmanoma, reikėtų apskaičiuoti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos IC_{50} vertę.
Neigiamas	Visi duomenų taškai yra virš EC_{80} vertės (80 % E2 atsako arba 8 000 RLU), kai koncentracija yra mažesnė kaip $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Neatitinka reikalavimų	Jei neįmanoma paaiškinti, ar duomenys tinka aktyvumo buvimui ar nebuvimui įrodyti dėl didelių kokybinių ar kiekybinių apribojimų, jie laikomi neatitinkančiais reikalavimų ir negali būti naudojami nustatant, ar bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama ar neigiama. Cheminę medžiagą reikėtų bandyti iš naujo.

40. Teigiamus rezultatus apibūdina poveikio dydis ir koncentracija, kuriai esant šis poveikis pasireiškia, jei įmanoma. Teigiamų, neigiamų ir reikalavimų neatitinkančių duomenų pavyzdžiai pateikti 5 ir 6 paveiksluose.

5 paveikslas.

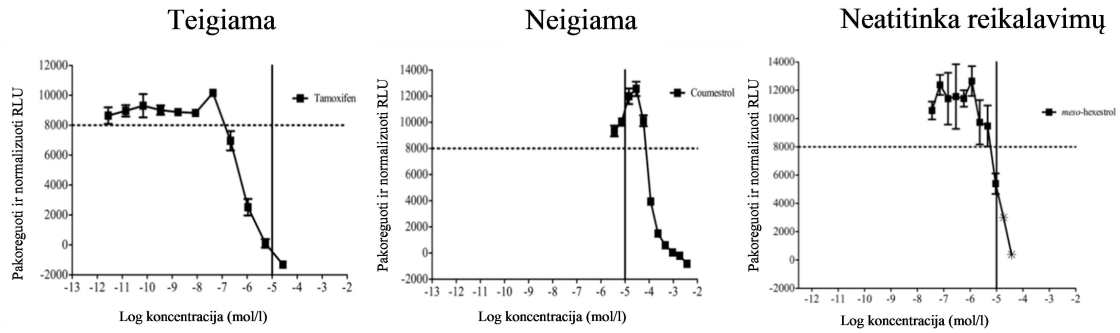
Agonistų pavyzdžiai: teigiami, neigiami ir reikalavimų neatitinkantys duomenys



Brūkšninė linija rodo 20 % E2 atsako, 2000 pakoreguotų ir normalizuotų RLU.

6 paveikslas.

Antagonistų pavyzdžiai: teigiami, neigiami ir reikalavimų neatitinkantys duomenys



Brūkšninė linija rodo 80 % Ral/E2 atsako, 8 000 pakoreguotų ir normalizuotų RLU.
Ištisinė linija rodo 1,00 x 10^{-5} M. Atsakas būtų laikomas teigiamu, jei jis būtų žemiau 8 000 RLU linijos ir esant mažesnei kaip 1,00 x 10^{-5} M koncentracijai.
Žvaigždute pažymėtos *mezo*-heksestrolio grafiko koncentracijos vertės rodo 2 balų arba didesnį gyvybingumą.
Mezo-heksestrolio bandymo rezultatai laikomi reikalavimų neatitinkančiais duomenimis, nes vienintelis mažesnis kaip 8 000 RLU atsakas gaunamas esant 1,00 x 10^{-5} M koncentracijai.

41. EC_{50} ir IC_{50} galima apskaičiuoti naudojant keturių parametrų Hillo funkciją (daugiau duomenų pateikta agonistų protokole ir antagonistų protokole (7)). Atitiktis priimtinumo kriterijams rodo tinkamą sistemos veikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų atskirą bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo atskiro bandymo rezultatų pakartojimas yra geriausias būdas užtikrinti tikslių duomenų gavimą (žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 19 pastraipą).

BANDYMO ATASKAITA

42. Žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 20 pastraipą.

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): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

4 Priedėlis

STABILIAI TRANSFEKUOTO ŽMOGAUS ESTROGENŲ RECEPTORIAUS A TRANSAKTYVACIJOS BANDYMAS CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ KAIP ESTROGENŲ AGONISTŲ IR ANTAGONISTŲ AKTYVUMUI APTIKTI, NAUDOJANT ERA CALUX LĄSTELIŲ LINIJĄ

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. BENDRASIS ĮVADAS)

1. Atliekant ERα CALUX transaktyvacijos bandymą, naudojama žmogaus U2OS ląstelių linija, kad būtų galima aptikti estrogeninį agonistų ir antagonistų aktyvumą, kaip tarpininką naudojant žmogaus estrogenų receptorių alfa (hERα). *BioDetection Systems* BV (Amsterdamas, Nyderlandai) atliktas stabiliai transfekuotų ERα CALUX biologinio tyrimo patvirtinimo tyrimas įrodė bandymo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (1). ERα CALUX ląstelių linija ekspresuoja tik stabiliai transfekuotą žmogaus ERα (2) (3).

2. Šis bandymas yra specialiai sukurtas hERα tarpininkaujamai transaktyvacijai aptikti, matuojant biologinę liuminescenciją kaip vertinamąją baigtį. Biologinė liuminescencija paprastai naudojama atliekant biologinius tyrimus dėl didelio signalo ir triukšmo santykio (4).

3. Pranešama, kad esant didesnei kaip 1 μM fitoestrogenų koncentracijai atsiranda ne receptoriaus tarpininkaujama liuminescencija dėl per didelio liuciferazės reporterinio geno aktyvinimo (5) (6) (7). Todėl fitoestrogenų ar kitų panašių junginių didesnės koncentracijos, galinčios per daug aktyvinti luciferazės ekspresiją, turi būti kruopščiai ištirtos atliekant stabiliai transfekuotų ER transaktyvacijos bandymus (žr. 2 priedėlį).

4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti *BENDRASIS ĮVADAS* IR *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI*. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS (TAIP PAT ŽR. BENDRASIS ĮVADAS)

5. Biologinis tyrimas naudojamas ligandų prijungimui prie ER ir paskesnei receptoriaus bei ligando komplekso translokacijai į branduolį vertinti. Branduolyje receptoriaus ir ligando kompleksas prisijungia prie specifinių DNR atsako elementų ir transaktyvina jonvabalio liuciferazės reporterinį geną, dėl ko padidėja ląstelių liuciferazės fermento ekspresija. Pridėjus liuciferazės substrato liuciferino, pastarasis virsta bioliuminescenciniu produktu. Gautą šviesą nesunku aptikti ir kiekybiškai įvertinti liuminometru.

6. Bandymo sistema naudoja stabiliai transfekuotas ERα CALUX ląstelės. ERα CALUX ląstelės gautos iš žmogaus osteoblastinės osteosarkomos U2OS ląstelių linijos. Žmogaus U2OS ląstelės buvo stabiliai transfekuotos 3xHRE-TATA-Luc ir pSG5-neo-hERα, taikant nusodinimo kalcio fosfatu metodą. U2OS ląstelių linija buvo pasirinkta kaip geriausia atsako į estrogenus (ir kitus steroidinius hormonus) reporterinė ląstelių linija, atsižvelgiant į stebėjimo rezultatus, kad U2OS ląstelių linija rodo mažą endogeninių receptorių aktyvumą arba jo visai neturi. Endogeninių receptorių nebuvimas buvo vertinamas naudojant tik liuciferazės reporterines plazmides, nerodančias aktyvumo, kai pridedama receptorių ligandų. Be to, ši ląstelių linija palaikė stiprius hormonų tarpininkaujamus atsakus, kai laikinai buvo įvesti susiję receptoriai (2) (3) (8).

7. Cheminių medžiagų estrogeninio arba antiestrogeninio aktyvumo bandymus naudojant ERα CALUX ląstelių liniją sudaro parengiamasis atskiras bandymas ir galutiniai atskiri bandymai. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, nustatomas bandomųjų cheminių medžiagų tirpumas, citotoksiškumas ir galutiniams bandymams patikslintas koncentracijos intervalas. Atliekant ERα CALUX biologinių tyrimų galutinius atskirus bandymus, bandomos patikslintų koncentracijos intervalų bandomosios cheminės medžiagos ir toliau atliekamas bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimas dėl agonizmo ar antagonizmo.

8. Duomenų aiškinimo kriterijai išsamiai aprašyti 59 pastraipoje. Trumpai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma teigiama dėl agonizmo, jei ne mažiau kaip dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms gaunamas atsakas, lygus 10 % pamatinio etalono 17β-estradiolio didžiausiojo atsako (PC_{10}), arba didesnis. Bandomoji cheminė medžiaga laikoma teigiama dėl antagonizmo, jei ne mažiau kaip dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms gaunamas atsakas, lygus 80 % pamatinio etalono tamoksifeno didžiausiojo atsako (PC_{80}), arba mažesnis.

PROCEDŪRA

Ląstelių linijos

9. Atliekant bandymą turėtų būti naudojama stabiliai transfekuotų U2OS ERα CALUX ląstelių linija. Ląstelių liniją galima gauti iš *BioDetection Systems BV*, Amsterdamas, Nyderlandai, pagal techninio licencijų išdavimo sutartį.

10. Reikėtų naudoti tik mikoplazmomis neužkrėstas ląstelių kultūras. Naudojamos ląstelių partijos turėtų būti sertifikuotos, kad nėra užkrėstos mikoplazmomis, arba prieš naudojant reikėtų atlikti bandymą dėl mikoplazmų nebuvimo. Reikėtų naudoti RT-PCR (realiojo laiko polimerazės grandininę reakciją), kaip jautrų mikoplazmų užkrato aptikimo metodą (9).

Ląstelių linijos stabilumas

11. Siekiant užtikrinti CALUX ląstelių stabilumą ir vientisumą, jas reikėtų laikyti skystajame azote (–80 °C). Po ląstelių atitirpinimo prieš pradedant auginti naują kultūrą jas reikėtų persėti ne mažiau kaip du kartus, kad ląstelės būtų tinkamos cheminių medžiagų agonistų ir antagonistų estrogeniniam aktyvumui vertinti. Ląstelės neturėtų būti persėjamos daugiau kaip 30 kartų.

12. Ląstelių linijos stabilumui stebėti ilgą laiką tikrinamas agonistų ir antagonistų bandymo sistemos jautris, įvertinant pamatinio etalono EC_{50} arba IC_{50}. Be to, reikėtų stebėti teigiamo kontrolinio ėminio (PC) ir neigiamo kontrolinio ėminio (NC) santykinę indukciją. Rezultatai turėtų atitikti agonistų (3C lentelė) arba antagonistų (4C lentelė) ERα CALUX biologinio tyrimo priimtinumo kriterijus. Agonistinio ir antagonistinio poveikio pamatiniai etalonai, teigiami ir neigiami kontroliniai ėminiai pateikti 1 ir 2 lentelėse.

Ląstelių auginimo ir sėjimo sąlygos

13. U2OS ląstelės turėtų būti auginamos kultūros terpėje (DMEM/F12 (1:1) terpėje su fenolio raudonuoju kaip pH indikatoriumi, papildytoje galvijų vaisiaus kraujo serumu (7,5 %), pakeičiamosiomis amino rūgštimis (1 %), 10 vienetų/ml penicilino, streptomicino ir geneticino (G-418) kaip atrankos žymeklio). Ląstelės turėtų būti dedamos į CO_2 inkubatorių (5 % CO_2) 37 °C temperatūroje, esant 100 % drėgmei. Ląstelėms pasiekus 85–95 % susiliejimo laipsnį, jos gali būti persėjamos arba ruošiamos pasėti į 96 šulinėlių mikrotitravimo plokšteles. Pastarųjų atveju reikėtų paruošti 1×10^5 ląstelių/ml suspensiją estrogenų neturinčioje bandymo terpėje (DMEM/F12 (1:1) terpėje be fenolio raudonojo, papildytoje galvijų vaisiaus kraujo serumu, apdorotu dekstranu dengtomis medžio anglimis (5 % V/V), pakeičiamosiomis amino rūgštimis (1 % V/V), 10 vienetų/ml penicilino ir streptomicino) ir ją pasėti į 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelių šulinėlius (100 µl homogenizuotos ląstelių suspensijos). Prieš apdorojant medžiaga ląstelės turėtų būti inkubuojamos 24 h CO_2 inkubatoriuje (5 % CO_2, 37 °C, 100 % drėgmė). Plastikiniai indai turėtų būti be estrogenų.

Priimtinumo kriterijai

14. Bandomosios (-ųjų) cheminės (-ų) medžiagos (ų) agonistinis ir antagonistinis aktyvumas bandomas atliekant bandymų serijas. Bandymų seriją sudaro ne daugiau kaip 6 mikrotitravimo plokštelės. Kiekvieną bandymų seriją sudaro mažiausiai viena visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, teigiamas kontrolinis ėminys, neigiamas kontrolinis ėminys ir tirpiklio kontroliniai ėminiai. 1 ir 2 paveiksluose pateikta agonistų ir antagonistų bandymų serijos plokštelės schema.

15. Pamatinių etalonų ir bandomųjų cheminių medžiagų kiekvienos koncentracijos tirpalas, visi tirpiklio kontroliniai ėminiai, teigiami ir neigiami kontroliniai ėminiai turėtų būti analizuojami imant tris kartotinius ėminius. Kiekviena iš trijų kartotinių analizių turėtų atitikti 3A ir 4A lentelėse pateiktus reikalavimus.

16. Atliekant kiekvieną bandymų seriją, pirmoje plokštelėje matuojama visa pamatinio etalono (17β-estradiolio – dėl agonizmo; tamoksifeno – dėl antagonizmo) praskiestų tirpalų serija. Visose kitose 5 mikrotitravimo plokštelėse turėtų būti 3 kontroliniai ėminiai: tirpiklio kontrolinis ėminys, bandomo pamatinio etalono didžiausios koncentracijos ėminys ir pamatinio etalono apytikrės EC_{50} (agonizmas) arba IC_{50} (antagonizmas) ėminys, kad jų rezultatus būtų galima palyginti su pirmosios mikrotitravimo plokštelės rezultatais, kuriuos sudaro visa pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė. Pirmosios plokštelės ir kitų 5 plokštelių kontrolinių ėminių vidurkio santykis turėtų atitikti reikalavimus, pateiktus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).

17. Apskaičiuojamas bandymų serijos kiekvienos mikrotitravimo plokštelės z faktorius (10). z faktorių reikėtų apskaičiuoti pagal didžiausiai ir mažiausiai pamatinio etalono koncentracijai gautą atsaką. Mikrotitravimo plokštelė laikoma tinkama, jei ji atitinka reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).

18. Pamatinio etalono atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivė turėtų būti sigmoidė. Pagal pamatinio etalono atskiestų tirpalų serijos atsaką gauta EC_{50} arba IC_{50} turėtų atitikti reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).

19. Į kiekvieną bandymų seriją turėtų būti įtrauktas teigiamas kontrolinis ėminys ir neigiamas kontrolinis ėminys. Apskaičiuota teigiamo ir neigiamo kontrolinių ėminių santykinė indukcija turėtų atitikti reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).

20. Atliekant visus matavimus, didžiausios koncentracijos pamatinio etalono indukcijos faktorius turėtų būti matuojamas dalijant vidutinę didžiausiąją 17β-estradiolio pamatinio etalono standartinę santykinio šviesos vieneto (RLU) vertę iš vidutinės tirpiklio kontrolinio ėminio RLU vertės. Šis indukcijos faktorius turėtų atitikti indukcijos pokyčiui kartais keliamus mažiausius reikalavimus, nurodytus 3C lentelėje (agonizmas) arba 4C lentelėje (antagonizmas).

21. Tik tos mikrotitravimo plokštelės, kurios atitinka visus pirmiau minėtus priimtinumo kriterijus, laikomos tinkamomis ir gali būti naudojamos bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti.

22. Priimtinumo kriterijai taikomi parengiamiesiems ir galutiniams atskiriems bandymams.

1 lentelė.

Agonistų CALUX biologinio tyrimo pamatinio etalono, teigiamo kontrolinio ėminio (PC) ir neigiamo kontrolinio ėminio (NC) koncentracijos vertės

	Medžiaga	CASRN	Bandymo koncentracijos intervalas (M)
Pamatinis etalonas	17-β-estradiolis	50-28-2	$1 \times 10^{-13} – 1 \times 10^{-10}$
Teigiamas kontrolinis ėminys (PC)	17α-metiltestosteronas	58-18-4	3×10^{-6}
Neigiamas kontrolinis ėminys (NC)	kortikosteronas	50-22-6	1×10^{-8}

2 lentelė.

Antagonistų CALUX biologinio tyrimo pamatinio etalono, teigiamo kontrolinio ėminio (PC) ir neigiamo kontrolinio ėminio (NC) koncentracijos vertės

	Medžiaga	CASRN	Bandymo koncentracijos intervalas (M)
Pamatinis etalonas	tamoksifenas	10540-29-1	$3 \times 10^{-9} – 1 \times 10^{-5}$
Teigiamas kontrolinis ėminys (PC)	4-hidroksitamoksifenas	68047-06-3	1×10^{-9}
Neigiamas kontrolinis ėminys (NC)	resveratrolis	501-36-0	1×10^{-5}

3 lentelė.

Agonistų ERα CALUX biologinio tyrimo priimtinumo kriterijai

A – atskiri ėminiai plokštelėje		**Kriterijus**
1	Trijų kartotinių šulinėlių (NC, PC, kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos ir pamatinio etalono praskiesto tirpalo, išskyrus C0) didžiausias SN, %	< 15 %
2	Trijų kartotinių šulinėlių (pamatinio etalono ir bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinių ėminių (C0, SC)) didžiausias SN, %	< 30 %
3	Didžiausias LDH nuotėkis, kaip citotoksiškumo matas.	< 120 %
B – vienos mikrotitravimo plokštelės		
4	Pamatinio etalono tirpiklio kontrolinio ėminio (C0; 1 plokštelė) ir bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinio ėminio (SC; nuo 2 iki x plokštelės) santykis	nuo 0,5 iki 2,0
5	Apytikrės EC_{50} ir didžiausios pamatinio etalono koncentracijos 1 plokštelėje bei apytikrės EC_{50} ir didžiausių pamatinio etalono koncentracijų nuo 2 iki x plokštelėse (C4, C8) santykis	nuo 0,70 iki 1,30
6	Kiekvienos plokštelės z faktorius	> 0,6
C – vienos analizės serijos (visos vienos serijos plokštelės)		
7	Pamatinio etalono sigmoidė	Taip (17-β-estradiolis)
8	Pamatinio etalono 17β-estradiolio EC_{50} intervalas	4×10^{-12} – 4×10^{-11} M
9	Didžiausiai 17β-estradiolio koncentracijai gautas mažiausias indukcijos pokytis kartais palyginti su pamatinio standartinio tirpiklio kontroliniu ėminiu.	5
10	PC santykinė indukcija (%)	> 30 %
11	NC santykinė indukcija (%)	< 10 %

Apyt. – apytikris; PC – teigiamas kontrolinis ėminys; NC – neigiamas kontrolinis ėminys; SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys; C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys; SN – standartinis nuokrypis; LDH – laktato dehidrogenazė.

4 lentelė.

Antagonistų ERα CALUX biologinio tyrimo priimtinumo kriterijai

	A – atskiri ėminiai plokštelėje	**Kriterijus**
1	Trijų kartotinių šulinėlių (NC, PC, kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos ir pamatinio etalono praskiesto tirpalo, tirpiklio kontrolinio ėminio (C0)) didžiausias SN, %	< 15 %
2	Trijų kartotinių šulinėlių (nešiklio kontrolinio ėminio (VC) ir didžiausios pamatinio etalono koncentracijos (C8)) didžiausias SN, %	< 30 %
3	Didžiausiasis LDH nuotėkis, kaip citotoksiškumo matas.	< 120 %
	B – vienos mikrotitravimo plokštelės	
4	Pamatinio etalono tirpiklio kontrolinio ėminio (C0; 1 plokštelė) ir bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinio ėminio (SC; nuo 2 iki x plokštelės) santykis	nuo 0,70 iki 1,30
5	Didžiausių pamatinio etalono koncentracijų 1 plokštelėje apytikrės EC_{50} ir didžiausių pamatinio etalono koncentracijų nuo 2 iki x plokštelėse (C4) apytikrės EC_{50} santykis	nuo 0,70 iki 1,30
6	Didžiausių pamatinio etalono koncentracijų 1 plokštelėje ir didžiausių pamatinio etalono koncentracijų nuo 2 iki x plokštelėse (C8) santykis	nuo 0,50 iki 2,0
7	Kiekvienos plokštelės z faktorius	> 0,6
	C – vienos analizės serijos (visos vienos serijos plokštelės)	
8	Pamatinio etalono sigmoidė	Taip (tamoksifenas)
9	Pamatinio etalono (tamoksifeno) EC_{50} intervalas	1×10^{-8} – 1×10^{-7} M
10	Mažiausias pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinio ėminio indukcijos pokytis kartais palyginti su didžiausios tamoksifeno koncentracijos ėminiu.	2,5
11	PC santykinė indukcija (%)	< 70 %
12	NC santykinė indukcija (%)	> 85 %

Apyt. – apytikris; PC – teigiamas kontrolinis ėminys; NC – neigiamas kontrolinis ėminys; VC – nešiklio kontrolinis ėminys (tirpiklio kontrolinis ėminys, nesant pastovios agonisto pamatinio etalono koncentracijos); SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys. C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys. SN – standartinis nuokrypis; LDH – laktato dehidrogenazė.

Tirpiklio ir (arba) nešiklio kontrolinis ėminys, pamatiniai etalonai, teigiami kontroliniai ėminiai, neigiami kontroliniai ėminiai

23. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą ir galutinius atskirus bandymus, reikėtų naudoti tą patį tirpiklio arba nešiklio kontrolinį ėminį, pamatinių etalonų ėminius, teigiamus kontrolinius ėminius ir neigiamus kontrolinius ėminius. Be to, pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių ėminių ir neigiamų kontrolinių ėminių koncentracija turėtų būti tokia pati.

Tirpiklio kontrolinis ėminys

24. Kaip tirpiklio kontrolinis ėminys turėtų būti bandomas bandomųjų cheminių medžiagų tirpiklis. Atliekant ERα CALUX biologinio tyrimo patvirtinimą kaip nešiklis buvo naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO, 1 % (V/V); CASRN 67-68-5). Jei naudojamas kitas nei DMSO tirpiklis, visi pamatiniai etalonai, kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos naudojant tą patį nešiklį. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad antagonistams tirti skirtas tirpiklio kontrolinis ėminys turi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17β-estradiolio (maždaug EC_{50} koncentracijos). Reikėtų paruošti ir bandyti nešiklio kontrolinį ėminį, kad būtų galima bandyti antagonistų tyrimams naudojamą tirpiklį.

Nešiklio kontrolinis ėminys (antagonizmas)

25. Bandant antagonistus, bandymo terpė papildoma pastovios koncentracijos agonisto pamatiniu etalonu 17β-estradioliu (maždaug EC_{50} koncentracijos). Norint bandyti dėl antagonizmo bandomų cheminių medžiagų tirpiklį, reikėtų paruošti bandymo terpę be pastovios koncentracijos agonistų pamatinio etalono 17β-estradiolio. Šis kontrolinis ėminys pažymimas kaip nešiklio kontrolinis ėminys. Atliekant ERα CALUX biologinio tyrimo patvirtinimą kaip nešiklis buvo naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO, 1 % (V/V); CASRN 67-68-5). Jei naudojamas kitas nei DMSO tirpiklis, visi pamatiniai etalonai, kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos naudojant tą patį nešiklį.

Pamatiniai etalonai

26. Agonisto pamatinis etalonas yra 17-β-estradiolis (1 lentelė). Pamatinius etalonus sudaro aštuonių koncentracijos verčiu vienu santykiu atskiesti 17β-estradiolio tirpalai (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. Agonisto pamatinis etalonas yra tamoksifenas (2 lentelė). Pamatinius etalonus sudaro aštuonių koncentracijos verčiu vienu santykiu atskiesti tamoksifeno tirpalai (3×10^{-9}, 1×10^{-8}, 3×10^{-8}, 1×10^{-7}, 3×10^{-7}, 1×10^{-6}, 3×10^{-6}, 1×10^{-5} M). Kiekvienos koncentracijos antagonistų pamatinis etalonas inkubuojamas kartu su pastovios koncentracijos agonistų pamatiniu etalonu 17β-estradioliu (3×10^{-12} M).

Teigiamas kontrolinis ėminys

28. Agonistų tyrimų teigiama kontrolinė medžiaga yra 17α-metiltestosteronas (1 lentelė).

29. Antagonistų tyrimų teigiama kontrolinė medžiaga yra 4-hidroksitamoksifenas (2 lentelė). Antagonistų teigiamas kontrolinis ėminys inkubuojamas kartu su pastovios koncentracijos agonistų pamatiniu etalonu 17β-estradioliu (3×10^{-12} M).

Neigiamas kontrolinis ėminys

30. Agonistų tyrimų neigiama kontrolinė medžiaga yra kortikosteronas (1 lentelė).

31. Antagonistų tyrimų neigiama kontrolinė medžiaga yra resveratrolis (2 lentelė). Antagonistų neigiamas kontrolinis ėminys inkubuojamas kartu su pastovios koncentracijos agonistų pamatiniu etalonu 17β-estradioliu (3×10^{-12} M).

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas (žr. šio bandymo metodo *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 14 pastraipą ir 3 bei 4 lenteles).

Nešiklis

32. Bandomųjų cheminių medžiagų tirpiklis turėtų visiškai soliubilizuoti bandomąją cheminę medžiagą ir būti maišus su ląstelių terpe. Tinkami tirpikliai yra DMSO, vanduo ir etanolis (nuo 95 % iki 100 % grynumo). Jei kaip tirpiklis naudojamas DMSO, jo didžiausia koncentracija inkubavimo metu neturėtų būti didesnė kaip 1 % (V/V). Prieš naudojimą tirpiklis turėtų būti patikrintas dėl citotoksiškumo ir trukdžių atliekant bandymus nebuvimo.

Pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių ėminių, neigiamų kontrolinių ėminių ir bandomųjų cheminių medžiagų ruošimas

33. Pamatiniai etalonai, teigiami kontroliniai ėminiai, neigiami kontroliniai ėminiai ir bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos 100 % DMSO (arba reikiamame tirpiklyje). Toliau ruošiami atitinkamų koncentracijų (vienu santykiu atskiesti) tirpalai tame pačiame tirpiklyje. Reikėtų palaukti, kol visos medžiagos prieš jas tirpinant pasiekia kambario temperatūrą. Tik ką paruoštuose pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių medžiagų, neigiamų kontrolinių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpaluose neturėtų būti pastebimų nuosėdų arba drumstumo. Galima ruošti didelius pamatinių etalonų ir kontrolinių medžiagų pradinių tirpalų tūrius. Bandomųjų cheminių medžiagų pradiniai tirpalai turėtų būti ruošiami iš naujo prieš kiekvieną bandymą. Galutinius pamatinių etalonų, teigiamų kontrolinių medžiagų, neigiamų kontrolinių medžiagų ir bandomųjų cheminių medžiagų atskiestus tirpalus reikėtų ruošti iš naujo prieš kiekvieną bandymą ir panaudoti per 24 h nuo paruošimo.

Tirpumas, citotoksiškumas ir intervalo nustatymas

34. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, nustatomas bandomųjų cheminių medžiagų tirpumas pasirinktame tirpiklyje. Ruošiamas didžiausios 0,1 M koncentracijos pradinis tirpalas. Jei esant šiai koncentracijai kyla tirpumo problemų, reikėtų ruošti mažesnės koncentracijos tirpalą tol, kol bandomosios cheminės medžiagos yra visiškai soliubilizuotos. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, bandomi vienu 1:10 santykiu atskiesti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai. Atliekant agonistų arba antagonistų bandymą didžiausia bandymo koncentracija yra 1 M. Po parengiamojo bandymo gaunamas patikslintas reikiamas koncentracijos intervalas, kuris turėtų būti naudojamas atliekant galutinius atskirus bandymus. Galutiniams bandymams naudojami 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x ir 3000x atskiesti tirpalai.

35. Citotoksiškumo bandymas įtraukiamas į agonistų ir antagonistų bandymo protokolą (11). Citotoksiškumo bandymas įtraukiamas į parengiamąjį atskirą bandymą ir į galutinius atskirus bandymus. Bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdorotų ląstelių citotoksiškumo vertinimo metodas atliekant ERα CALUX biologinio tyrimo patvirtinimą buvo laktato dehidrogenazės (LDH) nuotėkio bandymas kartu su kokybine ląstelių apžiūra (žr. 4.1 priedėlį). Tačiau citotoksiškumui nustatyti gali būti taikomi kiti kiekybiniai metodai (pvz., tetrazoliniu pagrįstas kolorimetrinis (MTT) bandymas arba CALUX citotoksiškumo biologinis tyrimas). Apskritai, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja daugiau kaip 20 %, laikoma citotoksiška ir todėl negali būti naudojama duomenims įvertinti. Atliekant LDH nuotėkio bandymą, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija laikoma citotoksiška, kai LDH nuotėkio procentinė dalis yra didesnė kaip 120 %.

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga ir išdėstymo bandymo plokštelėje schema

36. Iš kolboje auginamų susiliejusių ląstelių po apdorojimo tripsinu ruošiama nauja 1×10^5 ląstelių/ml suspensija estrogenų neturinčioje bandymo terpėje. Po 100 µl naujos suspensijos ląstelių sėjama į 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės vidinius šulinėlius. Į išorinius šulinėlius įpilama 200 µl fiziologinio tirpalo fosfatiniame buferiniame tirpale (PBS) (žr. 1 ir 2 paveikslus). Pasėtos ląstelės inkubuojamos 24 h CO_2 inkubatoriuje (5 % CO_2, 37 °C, 100 % drėgmė).

37. Po parengiamojo inkubavimo plokštelės apžiūrimos citotoksiškumui (žr. 4.1 priedėlį), užkrėtimui ir susiliejimui nustatyti. Bandymui naudojamos tik tos plokštelės, kuriose vizualiai nesimato toksiškumo, užkrėtimo ir kurių susiliejimas yra ne mažesnis kaip 85 %. Vidinių šulinėlių terpė kruopščiai pašalinama ir pakeičiama 200 µl estrogenų neturinčios bandymo terpės su reikiamos koncentracijos pamatinių etalonų, bandomųjų cheminių medžiagų,

teigiamų kontrolinių ėminių, neigiamų kontrolinių ėminių ir tirpiklio kontrolinių ėminių atskiestais tirpalais (5 lentelė – agonistų tyrimų; 6 lentelė – antagonistų tyrimų). Visi pamatiniai etalonai, bandomosios cheminės medžiagos, teigiami kontroliniai ėminiai, neigiami kontroliniai ėminiai ir tirpiklio kontroliniai ėminiai bandomi imant tris kartotinius ėminius. 1 paveiksle pateikta agonistų bandymo plokštelės schema. 2 paveiksle pateikta antagonistų bandymo plokštelės schema. Parengiamojo bandymo ir galutinio bandymo plokštelės schema yra identiška. Bandant antagonistus, visi vidiniai šulinėliai, išskyrus nešiklio kontrolinio ėminio šulinėlius (VC), taip pat turi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17β-estradiolio (3×10^{-12} M). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad pamatinius etalonus C8 ir C4 reikėtų dėti į kiekvieną TC plokštelę.

38. Po ląstelių apdorojimo visomis cheminėmis medžiagomis, 96 šulinėlių mikrotitravimo plokšteles reikėtų inkubuoti dar 24 h CO_2 inkubatoriuje (5 % CO_2, 37 °C, 100 % drėgmė).

1 paveikslas.

96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelių schema atliekant parengiamąjį bandymą ir agonistų poveikio vertinimą

1 plokštelė

	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-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Kitos plokštelės

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
F		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 – pamatinis standartinis tirpiklis;

C(1–8) – pamatinių standartinių tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos).

PC – teigiamas kontrolinis ėminys;

NC – neigiamas kontrolinis ėminys;

TCx-(1–8) – bandomosios cheminės medžiagos tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos), atliekant parengiamąjį atskirą bandymą ir vertinant bandomosios cheminės medžiagos x agonistinį poveikį.

SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys (optimaliai turėtų būti tas pats tirpiklis kaip C0, bet galbūt iš kitos partijos).

Pilkos spalvos langeliai – išoriniai šulinėliai, pripildyti 200 µl PBS.

2 paveikslas.

96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelių schema atliekant antagonistų parengiamąjį bandymą ir antagonistų poveikio vertinimą

1 plokštelė

	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-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Kitos plokštelės

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
F		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 – pamatinis standartinis tirpiklis;

C(1–8) – pamatinių standartinių tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos).

NC – neigiamas kontrolinis ėminys;

PC – teigiamas kontrolinis ėminys;

TCx-(1–8) – bandomosios cheminės medžiagos tirpalų koncentracijos (1–8, nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijos), atliekant parengiamąjį atskirą bandymą ir vertinant bandomosios cheminės medžiagos x agonistinį poveikį.

SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys (optimaliai turėtų būti tas pats tirpiklis kaip C0, bet galbūt iš kitos partijos).

VC – nešiklio kontrolinis ėminys (tirpiklio kontrolinis ėminys, nesant pastovios agonisto pamatinio etalono, 17β-estradiolio koncentracijos);

Pilkos spalvos langeliai – išoriniai šulinėliai, pripildyti 200 µl PBS.

Pastaba. Visi vidiniai šulinėliai, išskyrus nešiklio kontrolinio ėminio šulinėlius (VC), taip pat turi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17β-estradiolio ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Liuminescencijos matavimas

39. Liuminescencijos matavimas išsamiai aprašytas agonistų ir antagonistų bandymo protokole (10). Terpė iš šulinėlių turėtų būti pašalinta ir kitas inkubavimo 24 h atliekama ląstelių lizė, kad atsidarytų ląstelių membrana ir būtų galima matuoti liuciferazės aktyvumą.

40. Liuminescencijos matavimo procedūrai reikia turėti liuminometrą su 2 injektoriais. Liuciferazės reakcija prasideda įpurškiant liuciferino substrato. Reakcija sustabdoma pridedant 0,2 M NaOH. Reakcija sustabdoma, kad būtų išvengta liuminescencijos pernešimo iš vieno šulinėlio į kitą.

41. Kiekvieno šulinėlio skleidžiama šviesa išreiškiama santykiniais šviesos vienetais (RLU) vienam šulinėliui.

Parengiamasis atskiras bandymas

42. Parengiamosios analizės rezultatai naudojami bandomųjų cheminių medžiagų patikslintam galutinių bandymų koncentracijos intervalui nustatyti. Parengiamosios analizės rezultatų įvertinimas ir bandomųjų cheminių medžiagų patikslinto galutinių bandymų koncentracijos intervalo nustatymas nuodugniai aprašytas agonistų ir antagonistų bandymo protokole (10). Toliau pateikiama trumpa agonistų ir antagonistų bandymams naudojamų bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos intervalo nustatymo procedūrų santrauka. 5 ir 6 lentelėje pateikti nurodymai dėl skiedimo vienu santykiu schemos.

Koncentracijų parinkimas agonistų poveikiui vertinti

43. Atliekant parengiamąjį atskirą bandymą, bandomąsias chemines medžiagas reikėtų bandyti naudojant vienu santykiu atskiestus tirpalus, kaip nurodyta 5 lentelėje (agonizmas) ir 6 lentelėje (antagonizmas). Visos koncentracijos turėtų būti bandomos naudojant tris kartotinius šulinėlius pagal plokštelės schemą, kaip nurodyta 1 paveiksle (agonizmas) arba 2 paveiksle (antagonizmas).

44. Tik tie analizės rezultatai, kurie atitinka priimtinumo kriterijus (3 lentelė), laikomi tinkamais ir gali būti naudojami bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti. Jei viena arba daugiau analizės serijos mikrotitravimo plokštelių neatitinka priimtinumo kriterijų, atitinkamas mikrotitravimo plokšteles reikėtų analizuoti iš naujo. Jei pirmoji plokštelė, kurią sudaro visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, neatitinka priimtinumo kriterijų, visa bandymų serija (6 plokštelės) reikia analizuoti iš naujo.

45. Reikėtų koreguoti pradinius bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos intervalus ir pakartoti parengiamąjį atskirą bandymą, jei:

— stebimas citotoksiškumas. Parengiamojo bandymo procedūrą reikėtų pakartoti naudojant citotoksiškumo nesukeliančią bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją;

— atliekant bandomosios cheminės medžiagos parengiamąjį bandymą, ne visuomet gaunama visa atsako priklausomybės nuo dozės kreivė, nes esant bandomai koncentracijai sukeliama didžiausia indukcija. Parengiamąjį atskirą bandymą reikėtų pakartoti naudojant mažesnės koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą.

46. Kai nustatoma tinkama atsako nuo dozės priklausomybė, reikėtų pasirinkti (mažiausią) citotoksiškumo nesukeliančią koncentraciją, kuriai stebima didžiausia indukcija. Didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri turi būti naudojama atliekant galutinius bandymus, turėtų būti 3 kartus didesnė nei pasirinkta koncentracija.

47. Visa patikslinta bandomosios cheminės medžiagos atskiestų tirpalų serija turėtų būti paruošta atliekant 5 lentelėje nurodytus skiedimo veiksmus, pradedant pirmiau nustatyta didžiausia koncentracija.

48. Jokio agonistinio poveikio nesukelianti bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma atliekant galutinį bandymą, pradedant nuo citotoksiškumo nesukeliančios didžiausios koncentracijos, nustatytos atliekant parengiamąjį bandymą.

Koncentracijų parinkimas antagonistų poveikiui vertinti

49. Tik tie analizės rezultatai, kurie atitinka priimtinumo kriterijus (4 lentelė), laikomi tinkamais ir gali būti naudojami bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti. Jei viena arba daugiau analizės serijos mikrotitravimo plokštelių neatitinka priimtinumo kriterijų, atitinkamas mikrotitravimo plokšteles reikėtų analizuoti iš naujo. Jei pirmoji plokštelė, kurią sudaro visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, neatitinka priimtinumo kriterijų, visa bandymų seriją (6 plokštelės) reikia analizuoti iš naujo.

50. Reikėtų koreguoti pradinius bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos intervalus ir pakartoti parengiamąjį atskirą bandymą, jei:

— stebimas citotoksiškumas. Parengiamojo bandymo procedūrą reikėtų pakartoti naudojant citotoksiškumo nesukeliančią bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją;

— atliekant bandomosios cheminės medžiagos parengiamąjį bandymą, ne visuomet gaunama visa atsako priklausomybės nuo dozės kreivė, nes esant bandomai koncentracijai sukeliamas didžiausias slopinimas. Parengiamąjį atskirą bandymą reikėtų pakartoti naudojant mažesnės koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą.

51. Kai nustatoma tinkama atsako nuo dozės priklausomybė, reikėtų pasirinkti (mažiausią) citotoksiškumo nesukeliančią koncentraciją, kuriai stebimas didžiausias slopinimas. Didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri turi būti naudojama atliekant galutinius bandymus, turėtų būti 3 kartus didesnė nei pasirinkta koncentracija.

52. Visa patikslinta bandomosios cheminės medžiagos atskiestų tirpalų serija turėtų būti paruošta atliekant 6 lentelėje nurodytus skiedimo veiksmus, pradedant pirmiau nustatyta didžiausia koncentracija.

53. Jokio antagonistinio poveikio nesukelianti bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma atliekant galutinį bandymą, pradedant nuo citotoksiškumo nesukeliančios didžiausios koncentracijos, nustatytos atliekant parengiamąjį bandymą.

Galutiniai atskiri bandymai

54. Po patikslintų koncentracijos intervalų nustatymo, reikėtų atlikti galutinį bandomųjų cheminių medžiagų bandymą, naudojant atskiestų tirpalų serijas, nurodytas 5 lentelėje (agonizmas) ir 6 lentelėje (antagonizmas). Visos koncentracijos turėtų būti bandomos naudojant tris kartotinius šulinėlius pagal plokštelės schemą, kaip parodyta 1 paveiksle (agonizmas) arba 2 paveiksle (antagonizmas).

55. Tik tie analizės rezultatai, kurie atitinka priimtinumo kriterijus (3 ir 4 lentelės), laikomi tinkamais ir gali būti naudojami bandomųjų cheminių medžiagų atsakui įvertinti. Jei viena arba daugiau analizės serijos mikrotitravimo plokštelių neatitinka priimtinumo kriterijų, atitinkamas mikrotitravimo plokšteles reikėtų analizuoti iš naujo. Jei pirmoji plokštelė, kurią sudaro visa pamatinio etalono praskiestų tirpalų serija, neatitinka priimtinumo kriterijų, visa bandymų seriją (6 plokštelės) reikia analizuoti iš naujo.

5 lentelė.

Pamatinių etalonų, kontrolinių ėminių ir bandomųjų cheminių medžiagų, naudojamų atliekant agonistų bandymą, koncentracija ir skiedimas

Pamatinis etalonas – 17β-estradiolis		TCx – parengiamasis atskiras bandymas		TCx - galutinis atskiras bandymas		Kontroliniai ėminiai	
konc. (M)		skiedimas		skiedimas		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PC	3×10^{-6}
C1	1×10^{-13}	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NC	1×10^{-8}
C2	3×10^{-13}	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1×10^{-12}	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3×10^{-12}	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6×10^{-12}	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1×10^{-11}	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3×10^{-11}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1×10^{-10}						

TCx – bandomoji cheminė medžiaga x;
PC – teigiama kontrolinė medžiaga (17α-metiltestosteronas);
NC – neigiama kontrolinė medžiaga (kortikosteronas);
C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys;
SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys.

6 lentelė.

Pamatinių etalonų, kontrolinių ėminių ir bandomųjų cheminių medžiagų, naudojamų atliekant antagonistų bandymą, koncentracija ir skiedimas

Pamatinis etalonas – tamoksifenas		TCx – parengiamasis atskiras bandymas		TCx - galutinis atskiras bandymas		Kontroliniai ėminiai	
konc. (M)		skiedimas		skiedimas		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	1×10^{-9}
C1	3×10^{-9}	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 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	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	3×10^{-7}	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Papildomai pridėtas agonistas**	
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-estradiolis	3×10^{-12}
C8	1×10^{-5}						

TCx – bandomoji cheminė medžiaga x;
PC – teigiamas kontrolinis ėminys (4-hidroksitamoksifenas);
NC – neigiamas kontrolinis ėminys (resveratrolis);
C0 – pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinis ėminys;
SC – bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinis ėminys;
VC – nešiklio kontrolinis ėminys (neturi pastovios koncentracijos agonisto pamatinio etalono 17β-estradiolio ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Duomenų rinkimas ir duomenų analizė

56. Po parengiamojo ir galutinių atskirų bandymų turėtų būti nustatyta bandomosios cheminės medžiagos agonistinių bandymų EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} ir didžiausioji indukcija (TCx_{max}). Reikėtų apskaičiuoti agonistinių bandymų IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} ir mažiausiąją indukciją (TCx_{min}). Šių parametrų grafinis vaizdas pateiktas 3 paveiksle (agonizmas) ir 4 paveiksle (antagonizmas). Reikiami parametrai apskaičiuojami pagal kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos santykinę indukciją (pamatinio etalono didžiausios indukcijos atžvilgiu (=100 %)). Duomenis reikėtų įvertinti naudojant netiesinę regresiją (kintamas krypties koeficientas, 4 parametrai) pagal tokią lygtį:

$$Y = apačia + \frac{(viršus - apačia)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hillo\ krypties\ koef.)})}$$

Čia:

X –dozės arba koncentracijos logaritmas;

Y –atsakas (santykinė indukcija (%));

Viršus –didžiausia indukcija (%);

Apačia –mažiausia indukcija (%);

$LogEC_{50}$ –koncentracijos, kuriai stebima 50 % didžiausiojo atsako, logaritmas;

HillSlope – krypties koeficientas arba Hillo krypties koeficientas.

57. Neapdoroti liuminometro duomenys, išreikšti santykiniais šviesos vienetais (RLU), turėtų būti perkelti į parengiamojo ir galutinio atskirų bandymų duomenų analizės elektroninę lentelę. Neapdoroti duomenys turėtų atitikti priimtinumo kriterijus, nurodytus 3A ir 3B lentelėse (agonizmas) arba 4A ir 4B lentelėse (antagonizmas). Jei neapdoroti duomenys atitinka priimtinumo kriterijus, atliekami tokie veiksmai, kad būtų nustatyti reikiami parametrai:

Agonizmas

— Iš visų pamatinių etalonų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama pamatinio standartinio tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinė RLU vertė.

— Iš visų bandomųjų cheminių medžiagų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio kontrolinio ėminio vidutinė RLU vertė.

— Apskaičiuojama kiekvienos pamatinio etalono koncentracijos santykinė indukcija. Didžiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija prilyginama 100 %.

— Apskaičiuojama bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos santykinė indukcija palyginti su didžiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija, lygia 100 %.

— Analizės rezultatai įvertinami atliekant netiesinę regresiją (kintamas krypties koeficientas, 4 parametrai).

— Nustatoma pamatinio etalono EC_{50} ir EC_{10}.

— Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų EC_{50} ir EC_{10}.

— Nustatoma didžiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija (TC_{max}).

— Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų PC_{10} ir PC_{50}.

Ne visuomet galima gauti visą bandomųjų cheminių medžiagų atsako priklausomybės nuo dozės kreivę, pvz., dėl citotoksiškumo arba tirpumo problemų. Taigi EC_{50}, EC_{10} ir PC_{50} negali būti nustatytos. Tokiu atveju galima nustatyti tik PC_{10} ir TC_{max}.

Antagonizmas

— Iš visų pamatinių etalonų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama didžiausios pamatinio etalono koncentracijos vidutinė RLU vertė.

— Iš visų bandomųjų cheminių medžiagų neapdorotų analizės duomenų verčių atimama didžiausios pamatinio etalono koncentracijos vidutinė RLU vertė.

— Apskaičiuojama kiekvienos pamatinio etalono koncentracijos santykinė indukcija. Mažiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija prilyginama 100 %.

— Apskaičiuojama bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos santykinė indukcija palyginti su mažiausios pamatinio etalono koncentracijos indukcija, lygia 100 %.

— Analizės rezultatai įvertinami atliekant netiesinę regresiją (kintamas krypties koeficientas, 4 parametrai).

— Nustatoma pamatinio etalono IC_{50} ir IC_{20}.

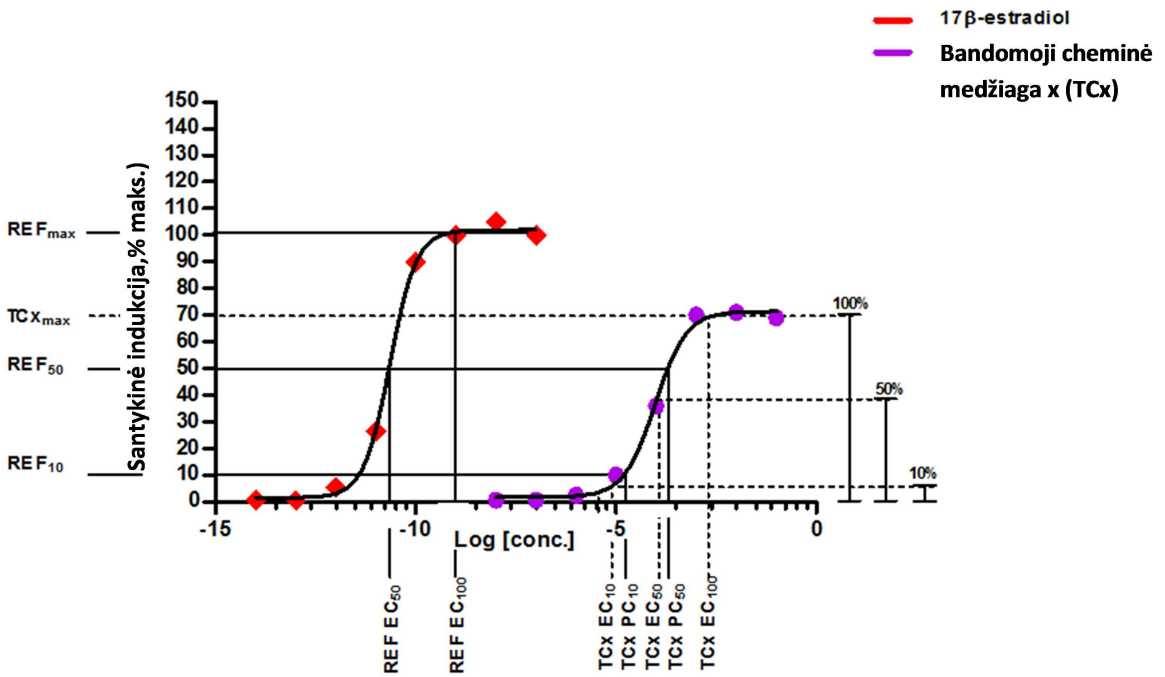
— Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų IC_{50} ir IC_{20}.

— Nustatoma mažiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija (TC_{min}).

— Nustatoma bandomųjų cheminių medžiagų PC_{80} ir PC_{50}.

3 paveikslas.

Atliekant agonistų bandymą nustatytų parametrų apžvalga



EC_{10} – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 10 % jos didžiausio atsako;

EC_{50} – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 50 % jos didžiausio atsako;

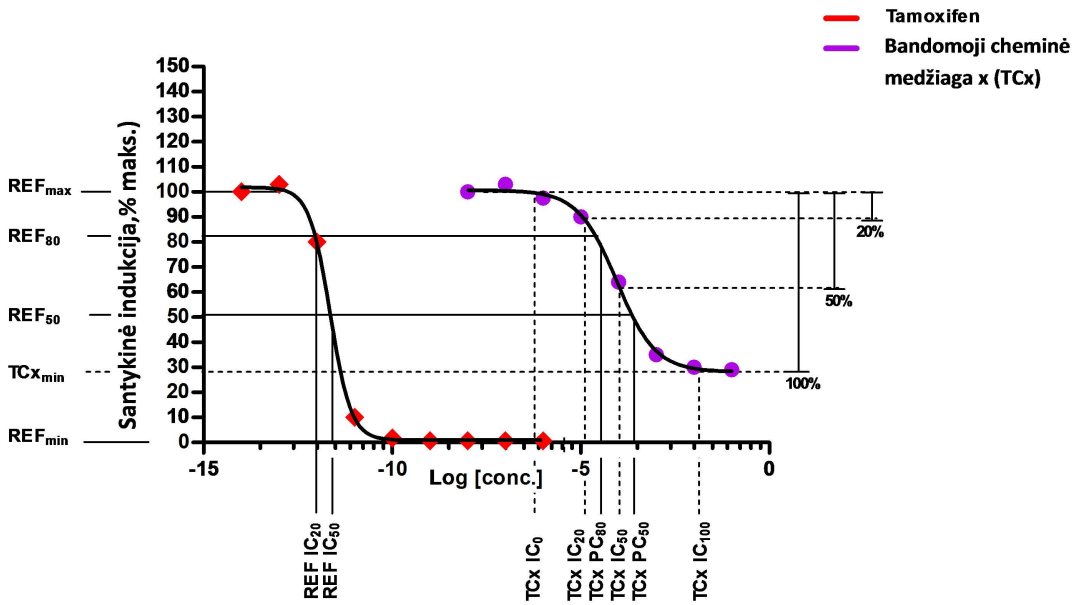
PC_{10} – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono EC_{10};

PC_{50} – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono EC_{50};

TCx_{max} – didžiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija.

4 paveikslas.

Atliekant antagonistų bandymą nustatytų parametrų apžvalga



IC_{20} – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 80 % jos didžiausio atsako (20 % slopinimas);

IC_{50} – medžiagos koncentracija, kuriai esant stebima 50 % jos didžiausio atsako (50 % slopinimas);

PC_{80} – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono IC_{20};

PC_{50} – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jos atsakas yra lygus pamatinio etalono IC_{50};

TCx_{min} – mažiausia santykinė bandomosios cheminės medžiagos indukcija.

Ne visuomet galima gauti visą bandomųjų cheminių medžiagų atsako priklausomybės nuo dozės kreivę, pvz., dėl citotoksiškumo arba tirpumo problemų. Taigi IC_{50}, IC_{20} ir PC_{50} negali būti nustatytos. Tokiu atveju galima nustatyti tik PC_{20} ir TC_{min}.

58. Rezultatai turėtų būti gauti pagal du (arba tris) nepriklausomus atskirus bandymus. Jie dviejų atskirų bandymų rezultatai yra palyginami ir todėl atkuriami, trečiasis atskiras bandymas nėra būtinas. Rezultatai būtų priimtini, jei jie:

— atitiktų priimtinumo kriterijus (žr. *Priimtinumo kriterijų* 14–22 pastraipas),

— būtų atkuriami.

Duomenų aiškinimo kriterijai

59. Aiškinant duomenis ir priimant sprendimą, ar bandomąją cheminę medžiagą reikėtų laikyti teigiama ar neigiama, taikomi tokie kriterijai:

Agonizmas

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **teigiama**, jei:

1 TC_{max} yra lygi arba didesnė kaip 10 % pamatinio etalono didžiausio atsako (REF_{10}).

2 Ne mažiau kaip 2 nuoseklios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba didesnės kaip REF_{10}.

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **neigiama**, jei:

1 TC_{max} nėra didesnė kaip 10 % pamatinio etalono didžiausio atsako (REF_{10}).

2 Mažiau kaip 2 nuoseklios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba didesnės kaip REF_{10}.

Antagonizmas

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **teigiama**, jei:

1 TC_{min} yra lygi arba mažesnė kaip 80 % pamatinio etalono didžiausio atsako (REF_{80} = 20 % slopinimo).

2 Ne mažiau kaip 2 nuoseklios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba mažesnės kaip REF_{80}.

Atliekant atskirą galutinį bandymą, bandomoji cheminė medžiaga laikoma **neigiama**, jei:

1 TC_{min} yra didesnė kaip 80 % pamatinio etalono didžiausio atsako (REF_{80} = 20 % slopinimo).

2 Mažiau kaip 2 nuoseklios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos yra lygios arba mažesnės kaip REF_{80}.

60. Ataskaitoje reikėtų pateikti poveikio dydį (agonizmas: TC_{max}; antagonizmas: TC_{min}) ir koncentracija, kuriai esant šis poveikis pasireiškia (agonizmas: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonizmas: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}), kad būtų galima apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos teigiamo atsako veiksmingumą.

BANDYMO ATASKAITA

61. Žr. *ER TA BANDYMO KOMPONENTAI* 20 pastraipą.

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). Super-rinduction 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

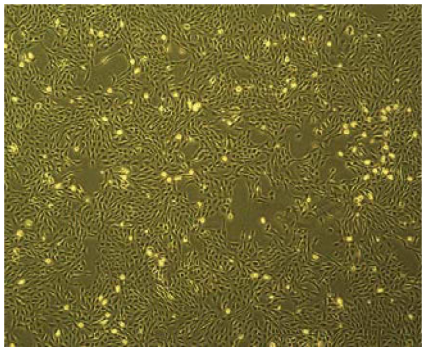
(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

4.1 priedėlis.

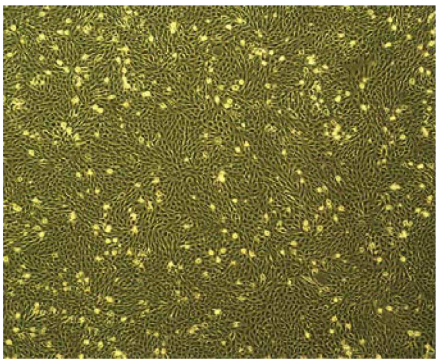
LĄSTELIŲ GYVYBINGUMO VIZUALUS TIKRINIMAS



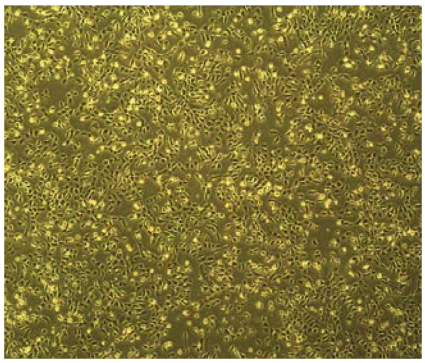
Susiliejimas < 5 %. Ląstelės tik ką pasėtos. Ląstelių gyvybingumas – 100 %. Klasifikavimas: „citotoksiškumo nėra“.



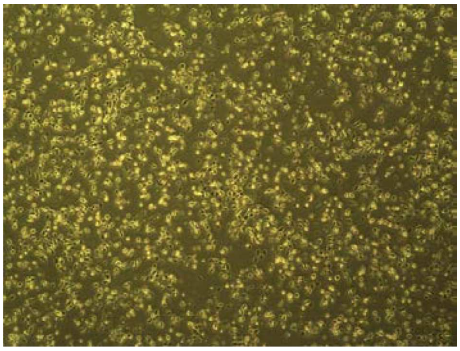
Susiliejimas > 85 %. Šioje pakopoje ląstelės veikiamos bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Ląstelių gyvybingumas – > 95 %.
Klasifikavimas: „citotoksiškumo nėra“



Susiliejimas > 95 %. Ląstelės yra tankiai suspaustos ir pradeda per greitai augti. Ląstelių gyvybingumas – > 95 %.
Klasifikavimas: „citotoksiškumo nėra“.



Ląstelių gyvybingumas – < 25 %. Ląstelės atsiskiria ir sąlytis tarp jų mažėja. Ląstelės suapvalėjo.
Klasifikavimas: „citotoksiškumas“.



Ląstelių gyvybingumas – < 5 %. Ląstelės yra visiškai atsiskyrusios ir sąlyčio tarp jų nėra. Ląstelės suapvalėjo. Medžiaga klasifikuojama kaip „citotoksiška“.

B.67 **ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJOS BANDYMAI *IN VITRO* NAUDOJANT TIMIDINKINAZĖS GENĄ**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires 490 (2016). Bandymų metodai periodiškai peržiūrimi ir taisomi, atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintamus reglamentavimo poreikius ir gyvūnų gerovę. Pelių limfomos bandymas (MLA) ir TK6 bandymas naudojant timidinkinazės (TK) lokusą iš pradžių buvo įtraukti į B.17 bandymo metodą. Vėliau tarptautinių genotoksiškumo bandymų seminarų (IWGT) MLA ekspertų darbo grupė parengė tarptautiniu lygiu suderintas rekomendacijas dėl MLA bandymo priėmimo kriterijų ir duomenų aiškinimo (1) (2) (3) (4) (5), ir šios rekomendacijos įtrauktos į šį naują B.67 bandymo metodą. Šis bandymo metodas parašytas kaip MLA bandymas ir kaip TK6 bandymas, nes taikant šį metodą taip pat naudojamas TK lokusas. MLA yra plačiai naudojamas reglamentavimo tikslais, o TK6 yra naudojamas gerokai rečiau. Reikėtų pažymėti, kad, nežiūrint į vertinamųjų baigčių panašumą, dvi ląstelių linijos nėra sukeičiamos ir reglamentavimo programos gali pagrįstai išreikšti vienos pranašumą prieš kitą konkrečiu naudojimo kaip reglamentavimo priemonės atveju. Pavyzdžiui, atliekant MLA patvirtinimą buvo įrodyta, kad jis tinka aptikti ne tik genų mutaciją, bet ir bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti struktūrinį chromosomų pažeidimą. Šis bandymų metodas yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacija apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių genetinės toksikologijos bandymų EBPO gairių pakeitimų apžvalga (6).

2. *In vitro* žinduolių ląstelių genų mutacijos bandymų tikslas – aptikti cheminių medžiagų sukeltas genų mutacijas. Šiuose bandymuose naudojamos ląstelių linijos skirtos matuoti tiesiogines reporterinių genų mutacijas, konkrečiai, endogeninės timidinkinazės geno (*TK* žmogaus ląstelių ir *Tk* graužikų ląstelių, šiame bandymo metode kartu nurodomų kaip *TK*). Taikant šį bandymo metodą numatyta naudoti dvi ląstelių linijas: L5178Y $TK^{+/-}$–3.7.2C pelių limfomos ląstelių linija (paprastai vadinama L5178Y) ir TK6 žmogaus limfoblastų ląstelių linija (paprastai vadinama TK6). Nors dvi ląstelių linijos skiriasi dėl savo kilmės, ląstelių augimo, p53 būsenos ir kt., *TK* genų mutacijos bandymai gali būti atliekami panašiu būdu abiem ląstelių tipams, kaip aprašyta šiame bandymo metode.

3. Dėl autosominės ir heterozigotinės timidinkinazės geno prigimties galima aptikti gyvybingas kolonijas, kurių ląstelėms trūksta timidinkinazės fermento po mutacijos iš $TK^{+/-}$ į $TK^{-/-}$. Šio trūkumo priežastis gali būti *TK* geną veikiantys genetiniai įvykiai, įskaitant geno mutacijas (taškines mutacijas, rėmelio poslinkio mutacijas, mažas iškritas ir kt.) ir su chromosomomis susijusius įvykius (dideles iškritas, chromosomų pertvarkas ir mitozinę rekombinaciją). Pastarieji įvykiai pasireiškia kaip heterozigotiškumo praradimas, kuris yra įprastas auglių slopinimo genų genetinis pokytis žmogaus auglių genezėje. Teoriškai MLA galima aptikti visos *TK* geną turinčios chromosomos praradimą dėl verpstės struktūros ardymo ir (arba) neatsiskyrimo mitozės metu. Iš tikrųjų, citogenetinės ir molekulinės analizės derinys aiškiai rodo, kad kai kurie MLA TK mutantai yra neatsiskyrimo rezultatas. Tačiau įrodomoji vertė rodo, kad *TK* geno mutacijų bandymais negalima patikimai aptikti aneugenus, kai taikomi standartiniai citotoksiškumo kriterijai (kaip aprašyta šiame bandymo metode) ir todėl šie bandymai nėra tinkami aneugenams aptikti (7) (8) (9).

4. Atliekant *TK* geno mutacijos bandymus, gaunami dviejų skirtingų fenotipų klasių *TK* mutantai; normaliai augantys mutantai, kurie auga tokiu pačiu greičiu kaip TK heterozigotinės ląstelės, ir lėtai augantys mutantai, kurie auga esant ilgesnei dvigubėjimo trukmei. Normaliai augantys ir lėtai augantys mutantai atpažįstami kaip didelių kolonijų ir mažų kolonijų MLA mutantai ir kaip anksti pasirodančių ir vėlai pasirodančių kolonijų TK mutantai. Didelių ir mažų kolonijų MLA mutantų molekulinė ir citogenetinė prigimtis yra detaliai ištirta (8) (10) (11) (12) (13). Anksti pasirodančių ir vėlai pasirodančių TK6 mutantų molekulinė ir citogenetinė prigimtis taip pat yra išsamiai ištirta (14) (15) (16) (17). Abiejų tipų ląstelių lėtai augantys mutantai patyrė genetinį pažeidimą, kuris yra susijęs su tariamu (-ais) augimą reguliuojančiu (-iais) genu (-ais) šalia *TK* lokuso, dėl ko padidėja dvigubėjimo trukmė ir susidaro vėlai pasirodančios arba mažos kolonijos (18). Lėtai augančių mutantų atsiradimas susijęs su cheminėmis medžiagomis, kurios sukelia didelius struktūros pokyčius chromosomų lygiu. Ląstelės, kurių pažeidimas nėra susijęs su tariamu (-ais) augimą reguliuojančiu (-iais) genu (-ais) šalia *TK* lokuso, augimo greitis yra panašus į motininių ląstelių ir jos tampa normaliai augančiais mutantais. Pradžioje normaliai augančių mutantų atsiradimas yra susijęs su cheminėmis medžiagomis, iš pradžių veikiančiomis kaip taškinės mutacijos medžiagos. Todėl yra svarbu suskaičiuoti lėtai augančius ir normaliai augančius mutantus, kad būtų galima atgauti visus mutantus ir šiek tiek suprasti bandomosios cheminės medžiagos (mutagenų ar klastogenų) sukelto pažeidimo tipą (-us) (10) (12) (18) (19).

5. Bandymo metodas sudarytas taip, kad būtų pateikta bendroji informacija, kuri tiktų MLA ir TK6, ir specialieji nurodymai dėl atskirų bandymų.

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

7. Bandymus atliekant *in vitro* paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį. Egzogeninė metabolinio aktyvinimo sistema nevisiškai atkartoja *in vivo* sąlygas.

8. Reikėtų imtis priemonių, kad būtų išvengta sąlygų, kurioms esant galėtų būti gauti klaidingai teigiami rezultatai (t. y. galima sąveika su bandymo sistema), gauti ne dėl tiesioginės sąveikos tarp bandomosios cheminės medžiagos ir ląstelės genetinės medžiagos; tokias sąlygas sudaro pH ar osmolialumo pokyčiai, sąveika su terpės komponentais (20) (21) ar per didelis citotoksiškumo lygis (22) (23) (24). Didesni nei rekomenduojami citotoksiškumo lygiai, kaip apibrėžta 28 pastraipoje, laikomi per dideli MLA ir TK6. Be to, reikėtų pažymėti, kad bandomosios cheminės medžiagos, kurios yra timidino analogai arba elgiasi kaip timidino analogai, gali padidinti mutacijų dažnį dėl atrankiojo spontaninių foninių mutantų augimo ląstelių apdorojimo metu ir tinkamam įvertinimui būtina taikyti kitus bandymo metodus (25).

9. Pramoninėms nanomedžiagoms gali prireikti tam tikrų šio bandymų metodo pakeitimų, kurie šiame bandymų metode neaprašyti.

10. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui bandyti, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

11. Mutantinės ląstelės, kurioms trūksta timidinkinazės fermento aktyvumo dėl $TK^{+/-}$ mutacijos į $TK^{-/-}$, yra atsparios pirimidino analogo trifluortimidino (TFT) citostatiniam poveikiui. Ląstelės, kurioms *TK* netrūksta, yra jautrios TFT, kuris slopina ląstelių metabolizmą bei stabdo tolesnį jų dalijimąsi. Todėl mutantinės ląstelės gali daugintis, esant TFT, ir sudaryti matomas kolonijas, kai TK fermento turinčios ląstelės daugintis negali.

BANDYMO PRINCIPAS

12. Ląstelių suspensija tinkamą laiko tarpą (žr. 33 pastraipą) veikiama bandomąja chemine medžiaga, esant egzogeniniam metabolinio aktyvinimo šaltiniui arba jam nesant (žr. 19 pastraipą), ir ląstelės persėjamos, kad būtų nustatytas citotoksiškumas ir galėtų vykti fenotipo ekspresija prieš mutantų atranką. MLA citotoksiškumas nustatomas pagal santykinį bendrąjį augimą (RTG, žr. 25 pastraipą), TK6 – pagal santykinį išgyvenamumą (RS, žr. 26 pastraipą). Apdorotos kultūros laikomos auginimo terpėje pakankamą laiko tarpą, būdingą kiekvienam ląstelių tipui (žr. 37 pastraipą), kad įvyktų beveik optimali sukeltų mutacijų fenotipo ekspresija. Po fenotipo ekspresijos mutacijų dažnis nustatomas, sėjant žinomą ląstelių skaičių į terpę, turinčią atrankos medžiagą mutantinėms kolonijoms aptikti, ir į terpę be atrankos medžiagos klonavimo efektyvumui (gyvybingumui) nustatyti. Kolonijos suskaičiuojamos, pasibaigus reikiamos trukmės inkubavimui. Mutacijų dažnis apskaičiuojamas pagal mutantinių kolonijų skaičių, pakoreguotą dėl klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Ląstelės

13. MLA: kadangi MLA buvo sukurtas ir apibūdintas naudojant L5178Y ląstelių $TK^{+/-}$–3.7.2C sublinijį, ši specialioji sublinija turi būti naudojama MLA. L5178Y ląstelių linija buvo gauta iš metilcholantreno sukeltos DBA-2 pelių užkrūčio liaukos limfomos (26). Clive ir bendradarbiai apdorojo L5178Y ląsteles (Clive pažymėtas $TK^{+/+}$–3) etilmetansulfonatu ir išskyrė $TK^{-/-}$ (pažymėtą $TK^{-/-}$–3.7) kloną, naudodami bromdeoksiuridiną kaip atrankos medžiagą. Iš $TK^{-/-}$ klono buvo išskirtas ir apibūdintas dėl naudojimo MLA spontaninis $TK^{+/-}$ klonas (pažymėtas $TK^{+/-}$–3.7.2) ir

subklonas (pažymėtas $TK^{+/-}$–3.7.2C) (27). Paskelbtas ląstelių linijos kariotipas (28) (29) (30) (31). Modalinis chromosomų skaičius yra 40. Yra viena metacentrinė chromosoma (t12; 13), kurią reikėtų skaičiuoti kaip vieną chromosomą. Pelės *TK* lokusas yra distaliniame 11 chromosomos gale. L5178Y $TK^{+/-}$–3.7.2C ląstelių linija turi mutacijas abiejuose p53 aleliuose ir duoda mutantinį p53 baltymą (32) (33). $TK^{+/-}$–3.7.2C ląstelių linijos p53 būsena greičiausiai atsako už gebėjimą atliekant bandymą aptikti didelio laipsnio pažeidimą (17).

14. TK6: TK6 yra žmogaus limfoblastų ląstelių linija. Motininių ląstelių linija yra Epstein-Barr virusu transformuota ląstelių linija WI-L2, kuri iš pradžių buvo gauta iš 5 metų amžiaus berniuko, turinčio paveldimąją sferocitozę. Pirmojo gauto klono HH4 ICR191 indukuotos mutacijos būdu buvo gauta *TK* heterozigotinių ląstelių linija TK6 (34). TK6 ląstelės yra beveik visos diploidinės ir tipinis kariotipas yra 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Žmogaus *TK* lokusas yra 17 chromosomos ilgajame petyje. TK6 yra p53 kompetentinė ląstelių linija, nes ji turi laukinio tipo p53 seką abiejuose aleliuose ir išreiškia tik laukinio tipo p53 baltymą (36).

15. Bandymų laboratorijai pirmą kartą gaunant ar papildant MLA ir TK6 pradinę kultūrą, patariama užtikrinti *mikoplazmų* užkrato nebuvimą, nustatyti ląstelių kariotipą arba nudažyti *TK* lokusą supančias chromosomas ir patikrinti populiacijos dvigubėjimo trukmę. Turėtų būti nustatyta bandymo laboratorijoje naudojamų ląstelių normali ląstelių ciklo trukmė ir ji turėtų atitikti paskelbtas ląstelių charakteristikas (16) (19) (37). Ši pradinė ląstelių kultūra visoms darbinėms ląstelių kultūroms ruošti turėtų būti laikoma –150 °C arba žemesnėje temperatūroje.

16. Prieš ruošiant didelį užšaldomų darbinių kultūrų skaičių arba prieš pat bandymo pradžią kultūras gali tekti išvalyti nuo iš anksčiau esančių mutantinių ląstelių (išskyrus atvejus, kai tirpiklio kontrolinių ėminių mutacijų dažnis jau atitinka priimtiną intervalą, žr. 2 lentelę dėl MLA). Tai atliekama naudojant metotreksatą (aminopteriną) TK neturinčioms ląstelėms atskirti ir į kultūrą įdedant timidino, hipoksantino ir glicino (L5178Y) arba 2'-deoksicitidino (TK6), kad būtų užtikrintas optimalus TK kompetentinių ląstelių (19) (38) (39) ir TK6 (40) augimas. Bendrieji ląstelių kultūrų priežiūros geros praktikos patarimai ir konkretus patarimas dėl L5178Y ir TK6 ląstelių yra pateikti (19) (31) (37) (39) (41). Jei laboratorijoms reikia pradinės ląstelių kultūros pradėti auginti MLA ar TK6 arba gauti naujas pradines ląstelių kultūras, yra tinkamai apibūdintų ląstelių saugykla (37).

Terpės ir kultūros auginimo sąlygos

17. Atliekant abu bandymus, prižiūrimoms kultūroms reikėtų naudoti reikiamą kultūros terpę ir inkubavimo sąlygas (pvz., kultūros indus, drėkinamąją 5 % CO_2 atmosferą, 37 °C inkubavimo temperatūrą). Ląstelių kultūros visada turėtų būti laikomos tokiomis sąlygomis, kurios užtikrintų, kad ląstelės auga eksponentinio augimo tarpsniu. Ypač svarbu, kad būtų pasirinktos terpės ir auginimo sąlygos, kurios užtikrintų optimalų ląstelių augimą ekspresijos laikotarpiu ir optimalų mutantinių ir nemutantinių ląstelių klonavimo efektyvumą. MLA ir TK6 taip pat yra svarbu, kad auginimo sąlygos užtikrintų didelių arba anksti pasirodančių ir mažų arba vėlai pasirodančių kolonijų *TK* mutantų augimą. Daugiau duomenų apie auginimą, įskaitant būtinumą tinkamai šiluma inaktyvinti arklių kraujo serumą, jei mutantų atrankai naudojama RPMI terpė, galima rasti (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Kultūrų paruošimas

18. Ląstelių linijos dauginamos iš kamieninių kultūrų, sėjamų kultūros terpėje tokiu tankiu, kad ląstelės suspensijose ar monosluoksniuose visą apdorojimo ir ekspresijos laikotarpį augtų eksponentiškai.

Metabolinis aktyvinimas

19. Reikėtų naudoti egzogenines metabolinio aktyvinimo sistemas, kai naudojamos L5178Y ir TK6 ląstelės, nes jų endogeninė metabolinė geba yra nepakankama. Jei nebūtų pagrįsta kita sistema, dažniausiai kaip numatytoji rekomenduojama sistema yra kofaktoriumi papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), ruošiama iš graužikų (paprastai žiurkių) kepenų, apdorotų fermentų aktyvumą skatinančiais agentais, pvz., Aroclor 1254 (43) (44) (45) ar fenobarbitalio ir β-naftoflavono deriniu (46) (47) (48) (49) (50) (51). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (52) ir pasirodė esąs toks pat veiksmingas kaip Aroclor 1254 mišrių funkcijų

oksidazėms skatinti (45) (46) (47) (49). S9 frakcija paprastai naudojama nuo 1 % iki 2 % koncentracijos, bet galutinio bandymo terpėje ji gali būti padidinta iki 10 % (V/V). Naudojamos egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos ar metabolizmo skatinimo priemonės tipo ir koncentracijos pasirinkimui įtakos gali turėti bandomųjų cheminių medžiagų klasė.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

20. Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ir, jei reikia, praskiesti prieš ląstelių apdorojimą (žr. 21 pastraipą). Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dėti tiesiogiai į bandymo sistemą ir (arba) praskiesti prieš apdorojant bandymo sistemą. Dujinės arba lakiosios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojimas sandariuose kultūros induose (53) (54) (55). Bandomųjų cheminių medžiagų preparatus reikėtų ruošti prieš pat apdorojimą, išskyrus atvejus, kai stabilumo duomenys rodo, kad juos galima laikyti.

BANDYMO SĄLYGOS

Tirpikliai

21. Tirpiklį reikėtų pasirinkti taip, kad būtų optimizuotas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas, bet nebūtų daroma neigiama įtaka bandymo eigai, pvz., kistų ląstelių augimas, būtų paveiktas bandomosios cheminės medžiagos vientisumas, vyktų reakcija su kultūros indais, būtų pakenkta metabolinio aktyvinimo sistemai. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpiklį (ar kultūros terpę). Gerai ištirti tirpikliai yra vanduo ar dimetilsulfoksidas. Paprastai organinio tirpiklio koncentracija galutinėje apdorojimo terpėje neturėtų būti didesnė kaip 1 % (tūrio), o vandeninių tirpiklių (natrio chlorido tirpalo ar vandens) – 10 % (tūrio). Jei naudojami kiti nei tinkamai ištirti tirpikliai (pvz., etanolis ar acetonas), jų naudojimas turėtų būti pagrįstas duomenimis, kurie rodytų tirpiklio suderinamumą su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis bei bandymo sistema ir genetinio toksiškumo nebuvimą, esant naudojamai koncentracijai. Jei tokių patvirtinančių duomenų nebūtų, svarbu įtraukti neapdorotus kontrolinius ėminius (žr. 1 priedėlį, *Apibrėžtys*), kurie įrodytų, kad pasirinktas tirpiklis nesukelia žalingo arba mutageninio poveikio.

CITOTOKSIŠKUMO MATAVIMAS IR APDOROJIMO KONCENTRACIJOS VERČIŲ PARINKIMAS

22. Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją reikėtų vengti koncentracijos, galinčios sukelti klaidingai teigiamus atsakus, pvz., per didelį citotoksiškumą (žr. 28 pastraipą), nuosėdas kultūros terpėje (žr. 29 pastraipą) ar žymius pH arba osmolialumo pokyčius (žr. 8 pastraipą). Jei bandomosios cheminės medžiagos pridėjimo metu žymiai pakinta terpės pH vertė, ją būtų galima reguliuoti buferuojant galutinę apdorojimo terpę, kad būtų išvengta klaidingai teigiamų rezultatų ir būtų užtikrintos tinkamos kultūros sąlygos.

23. Koncentracijos pasirinkimas pagrįstas citotoksiškumu ir kitais aspektais (žr. 27–30 pastraipas). Nors citotoksiškumo įvertinimas atliekant pradinį bandymą gali būti naudingas pagrindinio bandymo koncentracijos vertėms geriau apibrėžti, pradinis bandymas nėra būtinas. Netgi atlikus pradinį citotoksiškumo vertinimą, atliekant pagrindinį bandymą vis tiek būtina matuoti citotoksiškumą kiekvienai kultūrai. Jei atliekamas intervalo nustatymo bandymas, jis turėtų aprėpti platų koncentracijos verčių intervalą ir gali būti baigtas praėjus 1 dienai po apdorojimo arba atliekamas per 2 ekspresijos dienas ir iki mutantų atrankos (jei pasirodytų, kad naudojamos koncentracijos vertės yra tinkamos).

24. Turėtų būti nustatomas kiekvienos atskiros bandymo kultūros ir kontrolinės kultūros citotoksiškumas: MLA (2) ir TK6 (15) metodai apibrėžti pagal sutartą tarptautinę praktiką.

25. Abiejų MLA agaro ir mikrošulinėlių variantų: citotoksiškumas turėtų būti įvertintas, naudojant santykinį bendrąjį augimą (RTG), kurį pirmieji apibrėžė Clive ir Spector 1975 m. (2). Šį matą sudaro santykinis suspensijos augimas (RSG: bandymo kultūros tirpiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu) ląstelių apdorojimo metu, ekspresijos trukmė ir santykinis klonavimo efektyvumas (RCE: bandymo kultūros tirpiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu) mutantų atrankos metu (2). Reikėtų pažymėti, kad į RSG įtraukti ląstelių nuostoliai, bandymo kultūros patiriami apdorojimo metu (formulės pateiktos 2 priedėlyje).

26. TK6: citotoksiškumas turėtų būti įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. pagal iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą, koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu pagal ląstelių skaičių palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (priskirtas 100 % išgyvenamumas) (formulės pateiktos 2 priedėlyje).

27. Reikėtų įvertinti ne mažiau kaip keturias bandymo koncentracijos vertes (neįskaitant tirpiklio ir teigiamų kontrolinių ėminių), kurios atitinka priimtinumo kriterijus (reikiamas citotoksiškumas, ląstelių skaičius ir kt.). Nors patartina naudoti du kartotinius kultūros ėminius, galima naudoti kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinius ar pavienius apdorotų kultūrų ėminius. Tam tikros koncentracijos kartotinėms kultūroms gauti rezultatai ataskaitoje turėtų būti pateikti atskirai, bet atliekant duomenų analizę gali būti sujungti (55). Jei bandomoji cheminė medžiaga rodo mažą citotoksiškumą arba jo visai nėra, paprastai tiktų maždaug nuo 2 iki 3 kartų besiskiriančios koncentracijos intervalai. Jei citotoksiškumas nustatomas, pasirinktos koncentracijos vertės turėtų aprėpti citotoksiškumo intervalą nuo koncentracijos, kuriai esant citotoksiškumas pasireiškia, kaip aprašyta 28 pastraipoje, įtraukiant koncentracijos vertes, kurioms esant gaunamas vidutinis citotoksiškumas ar jo visai nėra. Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos atsako kreivės kyla staigiai, todėl siekiant aprėpti visą citotoksiškumo intervalą arba išsamiai ištirti koncentracijos atsaką, gali tekti naudoti arčiau išdėstytas ir daugiau kaip keturias koncentracijos vertes, ypač tomis aplinkybėmis, kai reikia atlikti kartotinį bandymą (žr. 70 pastraipą). Daugiau kaip keturių koncentracijos verčių naudojimas gali būti ypač svarbus naudojant pavienes kultūras.

28. Jei didžiausioji koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, reikėtų siekti, kad MLA RTG didžiausiajai koncentracijai būtų nuo 20 % iki 10 % ir TK6 RS būtų nuo 20 % iki 10 % RS (67 pastraipa).

29. Jei mažai tirpios bandomosios cheminės medžiagos nėra citotoksinės, kai koncentracija yra mažesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, veikimo bandomąja chemine medžiaga pabaigoje, esant didžiausiai analizuojamai koncentracijai, turėtų atsirasti drumstumas arba nuosėdos, matomos plika akimi arba per inversinį mikroskopą. Netgi jei citotoksiškumas pasireiškia, kai koncentracija yra didesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, patartina bandyti tik esant vienai drumstumą ar matomas nuosėdas sukeliančiai koncentracijai, nes nuosėdos gali daryti dirbtinį poveikį. Kadangi MLA ir TK6 naudoja kultūras kaip suspensiją, ypač reikia imtis priemonių užtikrinti, kad nuosėdos netrukdytų atlikti bandymą. Taip pat gali padėti tirpumo nustatymas kultūros terpėje prieš atliekant bandymą.

30. Jei nuosėdų susidarymo ar ribinio citotoksiškumo nestebima, didžiausioji bandymo koncentracija turėtų atitikti 10 mM, 2 mg/ml ar 2 µl/ml, pasirenkant mažiausią (57) (58). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neapibrėžtos sudėties, pvz., nežinomos ar kintamos sudėties medžiaga, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos (t. y. nežinomos ar kintamos sudėties cheminės medžiagos, UVCB), aplinkos ėminių ekstraktai ir kt., nesant pakankamam citotoksiškumui, gali prireikti didesnės didžiausios koncentracijos (pvz., 5 mg/ml), kad būtų didesnė kiekvieno iš komponentų koncentracija. Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali būti skirtingi (59).

Kontroliniai ėminiai

31. Kiekvienai bandymo sąlygai reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus kontrolinius ėminius (žr. 21 pastraipą), sudarytus vien tik iš tirpiklio apdorojimo terpėje ir tvarkomus kaip apdorojamos kultūros.

32. Vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai yra būtini, kad būtų galima įrodyti laboratorijos gebėjimą identifikuoti mutageną naudojamo protokolo sąlygomis, nustatyti egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą (jei taikoma) ir įrodyti gebėjimą tinkamai aptikti mažus arba vėlai pasirodančius ir didelius arba anksti pasirodančius *TK* mutantus. Teigiamų kontrolinių ėminių pavyzdžiai pateikiami toliau 1 lentelėje. Galima naudoti alternatyvias teigiamas kontrolines medžiagas, jei tai būtų pagrįsta. Kadangi genetinio toksiškumo žinduolių ląstelėms bandymai *in vitro* yra pakankamai standartizuoti, esant trumpalaikiam apdorojimui (3–4 h), atliekamam vienu metu su metaboliniu aktyvinimu ar be jo, naudojant vienodą apdorojimo trukmę, teigiamų kontrolinių ėminių naudojimas gali apsiriboti mutagenu, kuriam būtinas metabolinis aktyvinimas. Šiuo atveju vieno teigiamo kontrolinio ėminio atsakas įrodys metabolinio aktyvinimo sistemos aktyvumą ir bandymo sistemos jautrį. Tačiau atliekant ilgalaikį apdorojimą (t. y. 24 h be S9) reikėtų turėti savo teigiamą kontrolinį ėminį, nes apdorojimo trukmė skirsis nuo metabolinį aktyvinimą naudojančio bandymo trukmės. Kiekvienas teigiamas kontrolinis ėminys turėtų būti naudojamas vienos arba kelių koncentracijos verčių, kurioms esant būtų galima tikėtis gauti atkuriamą ir aptinkamą didesnį nei fonas atsaką, kad būtų galima įrodyti bandymo sistemos jautrį, ir atsakui neturėtų trukdyti citotoksiškumas, kuris viršytų šiam bandymo metodui nustatytas ribas (žr. 28 pastraipą).

1 lentelė

Etaloninės medžiagos, rekomenduojamos laboratorijos kvalifikacijai vertinti ir teigiamiems kontroliniams ėminiams pasirinkti

Kategorija	Medžiaga	CASRN
1. Mutagenai, aktyvūs be metabolinio aktyvinimo		
	Metilmetansulfonatas	66-27-3
	Mitomicinas C	50-07-7
	4-nitrochinolin-N-oksidas	56-57-5
2. Mutagenai, kuriems reikia metabolinio aktyvinimo		
	Benz(a)pirenas	50-32-8
	Ciklofosfamidas (monohidratas)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetilbenzantracenas	57-97-6
	3-metilcholantrenas	56-49-5

PROCEDŪRA

Apdorojimas bandomąja chemine medžiaga

33. Proliferuojančios ląstelės veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metabolinio aktyvinimo sistemai arba jos nesant. Ekspozicija turėtų trukti tinkamą laiką (paprastai pakanka nuo 3 iki 4 h). Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali būti skirtingi (59). Tais MLA atvejais, kai atliekant trumpalaikį apdorojimą gaunami neigiami rezultatai ir yra informacijos, kuri rodytų, kad būtina ilgiau apdoroti (pvz., nukleozidų analogai, mažai tirpios medžiagos (5) (59)), turėtų būti apsvarstyta galimybė atlikti didesnės apdorojimo trukmės bandymą, t. y. 24 h be S9.

34. Mažiausiasis kiekvienos bandymo kultūros (kontrolinės ir apdorotos) ląstelių skaičius kiekvienoje bandymo stadijoje turėtų būti pagrįstas spontaninių mutacijų dažniu. Bendroji rekomendacija dėl pakankamo ląstelių skaičiaus apdorojimo ir sėjimo į kiekvieną bandymo kultūrą yra ta, kad reikėtų visą laiką turėti 10, bet geriausia 100 spontaninių mutantų visais bandymo tarpsniais (apdorojimo, fenotipo ekspresijos ir mutantų atrankos) (56).

35. Rekomenduojamas priimtinas MLA spontaninių mutacijų dažnis yra 35-140 × 10^{-6} (agaro versija) ir 50-170 × 10^{-6} (mikrošulinėlių variantas) (žr. 2 lentelę). Siekiant visą laiką kiekvienai kultūrai turėti ne mažiau kaip 10, bet geriausia 100 apdorojimą išgyvenusių spontaninių mutantų, būtina apdoroti ne mažiau kaip 6 × 10^6 ląstelių. Apdorojant tokį ląstelių skaičių ir išsaugant pakankamai ląstelių ekspresijos ir klonavimo mutantų atrankos metu, visais bandymo tarpsniais gaunamas reikiamas spontaninių mutantų skaičius (10 arba daugiau), netgi jei kultūros apdorojamos esant koncentracijai, kuriai sukeliamas 90 % citotoksiškumas (išmatuotas pagal 10 % RTG) (19) (38) (39).

36. TK6 spontaninių mutacijų dažnis paprastai yra nuo 2 iki 10 × 10^{-6}. Siekiant kiekvienai kultūrai turėti ne mažiau kaip 10 apdorojimą išgyvenusių spontaninių mutantų, būtina apdoroti ne mažiau kaip 20 × 10^6 ląstelių. Apdorojant tokį ląstelių skaičių gaunamas reikiamas spontaninių mutantų skaičius (10 arba daugiau), netgi jei kultūros apdorojamos esant koncentracijai, kuriai sukeliamas 90 % citotoksiškumas (10 % RS). Be to, ekspresijos laikotarpiu turi būti auginamas pakankamas ląstelių skaičius ir sėjamas mutantų atrankai (60).

Fenotipo ekspresijos trukmė ir citotoksiškumo bei mutacijų dažnio matavimas

37. Po apdorojimo laikotarpio pabaigos ląstelės auginamos kiekvienai ląstelių linijai būdingą nustatytą laiką, kad įvyktų beveik optimali naujai sukeltų mutacijų fenotipo ekspresija. MLA atveju fenotipo ekspresijos trukmė yra 2 dienos. TK6 atveju fenotipo ekspresijos trukmė yra 3–4 dienos. Jei naudojamas 24 h apdorojimo laikotarpis, ekspresijos laikotarpis prasideda po apdorojimo pabaigos.

38. Fenotipo ekspresijos laikotarpiu ląstelės skaičiuojamos kasdien. MLA atveju kasdienis ląstelių skaičiavimas naudojamas vienos dienos suspensijos augimui (SG) skaičiuoti. Po 2 dienų ekspresijos laikotarpio gaunama ląstelių suspensija terpėje su atrankos medžiaga ir be jos, kad būtų nustatytas mutantų skaičius (atrankos plokštelės) ir klonavimo efektyvumas (gyvybingumo plokštelės). MLA atveju yra du vienodai priimtini mutantų atrankos klonavimo metodai; vienam naudojamas minkštasis agaras, kitam – skystoji terpė 96 šulinėlių plokštelėse (19) (38) (39). TK6 atveju klonavimas atliekamas naudojant skystąją terpę ir 96 šulinėlių plokšteles (16).

39. Triflurtimidinas (TFT) yra vienintelė rekomenduota *TK* mutantų atrankos medžiaga (61).

40. MLA agaro lėkštelėse ir mikrošulinėlių plokštelėse skaičiuojama po 10–12 inkubavimo dienų. Anksti pasirodančios TK6 mutantų kolonijos mikrošulinėlių plokštelėse skaičiuojamos po 10–14 dienų. Siekiant atgauti lėtai augančius (vėlai pasirodančius) TK6 mutantus, būtina papildyti ląstelių auginimo terpę ir TFT, suskaičiavus anksti pasirodžiusius mutantus, ir inkubuoti plokšteles dar 7–10 dienų (62). Žr. 42 ir 44 pastraipas dėl lėtai ir normaliai augančių *TK* mutantų skaičiavimo būdų aptarimo.

41. Reikiami skaičiavimai pagal du MLA bandymus, įskaitant du metodus (agaro ir mikrošulinėlių), pateikti 2 priedėlyje. MLA taikant agaro metodą, suskaičiuojamos kolonijos ir mutantinių kolonijų skaičius koreguojamas pagal klonavimo efektyvumą, kad būtų apskaičiuotas mutacijų dažnis. MLA ir TK6 naudojant mikrošulinėlių variantą, klonavimo efektyvumas atrankos ir klonavimo efektyvumo plokštelėse nustatomas pagal Puasono skirstinį (63). Mutacijų dažnis skaičiuojamas pagal šiuos du efektyvumus.

Mutantinių kolonijų apibūdinimas

42. Jei pagal MLA bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama (žr. 62–63 pastraipas), reikėtų atlikti mažiausiai vienos bandymo kultūros (paprastai didžiausios priimtinos teigiamos koncentracijos) ir neigiamų bei teigiamų kontrolinių ėminių kolonijų apibūdinimą pagal kolonijų dydį arba augimą. Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neigiama (žr. 64 pastraipą), turėtų būti atliekamas neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių mutantinių kolonijų apibūdinimas. Taikant MLA mikrošulinėlių metodą, mažos mutantų kolonijos apibrėžiamos kaip kolonijos, dengiančios mažiau kaip 25 % šulinėlio skersmens, didelės mutantų kolonijos – daugiau kaip 25 % šulinėlio skersmens. Taikant agaro metodą, naudojamas automatinis kolonijų skaitiklis mutantinėms kolonijoms suskaičiuoti ir kolonijų dydžiui nustatyti. Kolonijų dydžio nustatymo metodai išsamiai aprašyti literatūroje (19) (38) (40). Neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių kolonijų apibūdinimas būtinas siekiant įrodyti, kad tyrimai atliekami tinkamai.

43. Bandomoji cheminė medžiaga negali būti nustatyta kaip neigiama, jei nėra tinkamai aptiktos teigiamo kontrolinio ėminio mažos ir didelės mutantų kolonijos. Kolonijų apibūdinimą galima naudoti, siekiant gauti bendrąją informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti taškines mutacijas ir (arba) ir su chromosomomis susijusius įvykius (4 pastraipa).

44. TK6: normaliai augantys ir lėtai augantys mutantai atskiriami pagal inkubavimo trukmės skirtumą (žr. 40 pastraipą). TK6 atveju paprastai skaičiuojami visų kultūrų anksti ir vėlai pasirodantys mutantai, įskaitant neigiamus ir teigiamus kontrolinius ėminius. Neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių kolonijų apibūdinimas būtinas siekiant įrodyti, kad tyrimai atliekami tinkamai. Bandomoji cheminė medžiaga negali būti nustatyta kaip neigiama, jei nėra tinkamai aptikti teigiamo kontrolinio ėminio anksti pasirodantys ir vėlai pasirodantys mutantai. Kolonijų apibūdinimą galima naudoti, siekiant gauti bendrąją informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą sukelti taškines mutacijas ir (arba) ir su chromosomomis susijusius įvykius (4 pastraipa).

Laboratorijos kvalifikacija

45. Siekdama įrodyti pakankamą bandymo atlikimo patirtį prieš jį taikydama įprastiniams bandymams, laboratorija turėtų būti atlikusi etaloninių teigiamų cheminių medžiagų, veikiančių pagal skirtingus mechanizmus (bent vieną aktyvią su metaboliniu aktyvinimu, vieną aktyvią be jo, medžiagas pasirenkant iš 1 lentelės sąrašo), ir įvairių neigiamų kontrolinių ėminių (įskaitant neapdorotas kultūras ir įvairius tirpiklius ir (arba) nešiklius) bandymų seriją. Šių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsakas turėtų atitikti literatūros duomenis. Šis reikalavimas netaikomas patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta 47–50 pastraipose. MLA gautos teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vertės turėtų atitikti IWGT rekomendacijas (žr. 2 lentelę).

46. Teigiamų kontrolinių medžiagų atranką (žr. 1 lentelę) reikėtų tirti atliekant trumpalaikį ir ilgalaikį apdorojimą (jei ilgalaikis apdorojimas naudojamas) be metabolinio aktyvinimo, taip pat trumpalaikį apdorojimą esant metaboliniam aktyvinimui, kad būtų galima įrodyti kvalifikaciją aptikti mutagenines chemines medžiagas, nustatyti metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą ir įrodyti ląstelių auginimo sąlygų apdorojimo, fenotipo ekspresijos ir mutantų atrankos metu bei skaičiavimo procedūrų tinkamumą. Pasirinktų cheminių medžiagų koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pasirinktas taip, kad, siekiant įrodyti bandymo sistemos jautrį ir dinaminį intervalą, būtų gautas atkuriamas ir su koncentracija susijęs padidėjimas palyginti su fonu.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

47. Laboratorija turėtų nustatyti:

— istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,

— istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (neapdorotų, tirpiklio) intervalą ir pasiskirstymą.

48. Pirmą kartą gaunant duomenis, skirtus istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui, vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinius duomenis. Kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas (64) (65).

49. Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę iš pradžių turėtų sudaryti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei tokių palyginamosiomis bandymų sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, pvz., kontrolines diagramas (pvz., C diagramas arba X stulpelines diagramas (65)), kad galėtų nustatyti savo teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenų kintamumą ir įrodyti laboratorijoje taikomų procedūrų „valdomumą“ (66). Papildomas rekomendacijas dėl istorinių duomenų kūrimo ir naudojimo galima rasti literatūroje (64).

50. Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti vienai kultūrai, bet geriau kartotinėms kultūroms gautas mutacijų dažnis, kaip aprašyta 27 pastraipoje. Būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas. Jei neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolinę ribą, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių skirstinį, jei nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema „valdoma“ (žr. 49 pastraipą) ir kad nėra techninių ar žmogaus klaidų.

51. Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į duomenų suderinamumą su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Esant didesnėms neatitiktims, turėtų būti sukurta nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų pateikimas

52. Pateikiamus MLA ir TK6 duomenis turėtų sudaryti apdorotų ir kontrolinių kultūrų duomenys, kurių reikia citotoksiškumui (RTG arba RS) ir mutacijų dažniui apskaičiuoti, kaip aprašyta toliau.

53. Taikant MLA, turėtų būti pateikti atskirų kultūrų RSG, RTG, klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir mutantinių kolonijų (agaro varianto) arba tuščių šulinėlių (mikrošulinėlių varianto) skaičiaus duomenys. Mutacijų dažnį reikėtų išreikšti mutantinių ląstelių skaičiumi vienam milijonui gyvųjų ląstelių. Jei atsakas teigiamas, turėtų būti nurodytas mažiausiai vienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (paprastai didžiausios teigiamos koncentracijos) ir neigiamų bei teigiamų kontrolinių ėminių mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažnis (ir (arba) bendrojo mutacijų dažnio procentinė dalis). Jei atsakas neigiamas, turėtų būti nurodytas neigiamo bei teigiamo kontrolinių ėminių mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažnis.

54. Taikant TK6, turėtų būti pateikti atskirų kultūrų RS, klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir anksti bei vėlai pasirodančių mutantų tuščių šulinėlių skaičiaus duomenys. Mutacijų dažnį reikėtų išreikšti mutantinių ląstelių skaičiumi gyvųjų ląstelių skaičiui, ir reikėtų įtraukti bendrąjį mutacijų dažnį, taip pat anksti bei vėlai pasirodančių mutantų mutacijų dažnį (ir (arba) bendrojo mutacijų dažnio procentinę dalį).

Priimtinumo kriterijai

55. MLA ir TK6 turėtų atitikti šiuos kriterijus prieš nustatant bendruosius konkrečios bandomosios cheminės medžiagos rezultatus:

— buvo bandoma esant dviem bandymo sąlygoms (trumpalaikio apdorojimo su metaboliniu aktyvinimu arba be jo, žr. 33 pastraipą), jei teigiami rezultatai negaunami vienai iš jų;

— turėtų būti analizuojamas pakankamas ląstelių ir koncentracijos verčių skaičius (žr. 27, 34–36 pastraipas).

— didžiausios koncentracijos pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 28–30 pastraipose.

Teigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių priimtinumo kriterijai

56. Po IWGT MLA ekspertų darbo grupės atliktos didelio kiekio MLA duomenų analizės buvo pasiektas tarptautinis susitarimas dėl konkrečių MLA priimtinumo kriterijų (1) (2) (3) (4) (5). Todėl šiame bandymo metode pateikiamos specialios rekomendacijos dėl neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių priimtinumo nustatymo ir atskiros medžiagos rezultatų įvertinimo pagal MLA. TK6 duomenų bazė yra gerokai mažesnė ir darbo grupė neatliko jos įvertinimo.

57. Taikant MLA, kiekvienas bandymas turėtų būti įvertinamas pagal tai, ar neapdorotas ir (arba) tirpiklio kontrolinis ėminys atitinka IWGT MLA darbo grupės priimtinumo kriterijus ((4) ir 2 lentelė) dėl: 1) mutacijų dažnio (reikia pažymėti, kad MLA agaro ir mikrošulinėlių variantų IWGT priimtini mutacijų dažniai skiriasi), 2) klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir 3) tirpiklio kontrolinio ėminio suspensijos augimo (formulės pateiktos 2 priedėlyje).

2 lentelė

MLA priimtinumo kriterijai

Parametras	Minkštojo agaro metodas	Mikrošulinėlių metodas
Mutacijų dažnis	$35–140 \times 10^{-6}$	$50–170 \times 10^{-6}$
Klonavimo efektyvumas	65–120 %	65–120 %
Suspensijos augimas	8–32 kartų (3–4 h apdorojimas) 32–180 kartų (24 h apdorojimas, jei atliekamas)	8–32 kartų (3–4 h apdorojimas) 32–180 kartų (24 h apdorojimas, jei atliekamas)

58. Kiekvienas MLA bandymas taip pat turėtų būti įvertintas pagal tai, ar teigiamas (-i) kontrolinis (-iai) ėminys (-iai) atitinka mažiausiai vieną iš šių dviejų IWGT darbo grupės priimtinumo kriterijų:

— teigiamas kontrolinis ėminys turėtų rodyti absoliutųjį bendrojo mutacijų dažnio padidėjimą, t. y. padidėjimą palyginti su spontaninių foninių mutacijų dažniu (sukeltų mutacijų dažniu (IMF)) ne mažiau kaip 300×10^{-6}. Ne mažiau kaip 40 % IMF turėtų būti gaunamas kaip mažų kolonijų mutacijų dažnis;

— teigiamo kontrolinio ėminio mažos kolonijos mutacijų dažnis padidėja ne mažiau kaip 150×10^{-6} palyginti su rodomu vienalaikio neapdoroto ir (arba) tirpiklio kontrolinio ėminio mutacijų dažniu (mažos kolonijos IMF yra 150×10^{-6}).

59. TK6 bandymas bus priimtinas, jei vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių duomenų bazę, kaip aprašyta 48–49 pastraipose. Be to, vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai (žr. 32 pastraipą) turėtų sukelti atsakus, kurie yra suderinami su sukurtais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu.

60. Atliekant abu bandymus, stebima teigiamos kontrolinės kultūros viršutinė citotoksiškumo riba turėtų būti tokia pati kaip bandymo kultūrų. T. y. RTG/RS turėtų būti ne mažesnis kaip 10 %. Pakanka naudoti vieną koncentraciją (arba vieną teigiamos kontrolinės kultūros koncentraciją, jei naudojama daugiau kaip viena koncentracija) siekiant įrodyti, kad teigiamas kontrolinis ėminys atitinka priimtinumo kriterijus. Be to, teigiamo kontrolinio ėminio mutacijų dažnis turėtų atitikti laboratorijai nustatytą priimtiną intervalą.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

61. Didelį darbą, susijusį su MLA biologine svarba ir teigiamo atsako kriterijais, atliko IWGT pelių limfomos ekspertų darbo grupė (4). Todėl šiame bandymo metode pateikiamos specialios rekomendacijos dėl bandomosios cheminės medžiagos MLA rezultatų aiškinimo (žr. 62–64 pastraipas). TK6 duomenų bazė yra gerokai mažesnė ir darbo grupė neatliko jos įvertinimo. Todėl rekomendacijos dėl TK6 duomenų aiškinimo pateiktos bendresniais terminais (žr. 65–66 pastraipas). Papildomos rekomendacijos taikomos abiem bandymams (žr. 67–71 pastraipas).

MLA

62. Rekomenduojamas teigiamų ir neigiamų atsakų apibrėžimo metodas, siekiant užtikrinti, kad mutacijų dažnio padidėjimas būtų biologiškai svarbus. Vietoj statistinės analizės, paprastai naudojamos atliekant kitus bandymus, metodas remiasi iš anksto nustatytu sukeltų mutacijų dažniu (t. y. mutacijų dažnio padidėjimu palyginti su vienalaikiu kontroliniu ėminiu), vadinamu bendruoju įvertinimo faktoriumi (angl. *Global Evaluation Factor*, GEF), kuris pagrįstas iš dalyvaujančių laboratorijų gautų neigiamų kontrolinių ėminių duomenų pasiskirstymo analize (4). MLA agaro varianto GEF yra 90×10^{-6}, MLA mikrošulinėlių varianto GEF yra 126×10^{-6}.

63. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei visomis tiriamomis bandymo sąlygomis (žr. 33 pastraipą) mutacijų dažnio padidėjimas palyginti su vienalaikiu fonu yra didesnis nei GEF ir padidėjimas yra susijęs su koncentracija (pvz., taikant tendencijos kriterijų). Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti mutacijas šioje bandymų sistemoje.

64. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis tiriamomis bandymo sąlygomis (žr. 33 pastraipą) nėra su koncentracija susijusio atsako arba, jei padidėja mutacijų dažnis, jis nėra didesnis nei GEF. Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti mutacijų šioje bandymų sistemoje.

TK6

65. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei, esant kuriai nors tiriamai bandymo sąlygai (žr. 33 pastraipą):

— bent vienai bandymo koncentracijai gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

— padidėjimas yra susijęs su koncentracija, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų (žr. 33 pastraipą);

— kuris nors iš rezultatų yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinės ribos; žr. 48 pastraipą).

Jei atitinkama visus šiuos kriterijus, laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti mutacijas šioje bandymų sistemoje. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (66) (67).

66. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis tiriamomis bandymo sąlygomis (žr. 33 pastraipą):

— jokiai bandymo koncentracijai negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,

— nėra su koncentracija susijusio padidėjimo, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

— visi rezultatai patenka į istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų intervalą (pvz., į Puasono skirstinio 95 % kontrolinę ribą; žr. 48 pastraipą).

Laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti mutacijų šioje bandymų sistemoje.

MLA ir TK6:

67. Jei didžiausioji koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, RTG/RS esant didžiausiajai koncentracijai turėtų būti nuo 20 % iki 10 %. Susitarta, kad reikėtų atsargiai aiškinti teigiamus rezultatus, kurių RTG/RS būtų tik nuo 20 % iki 10 %, ir rezultatas neturėtų būti laikomas teigiamu, jei mutacijų dažnis padidėtų RTG/RS (jei įvertinamas) esant 10 % arba mažiau (2) (59).

68. Yra kai kurios aplinkybės, kuriomis papildoma informacija gali padėti nustatant, kad cheminė medžiaga nėra mutageninė, kai nėra kultūros, kuriai būtų gauta RTG vertė, atitinkanti nuo 10 % iki 20 % RTG/RS. Šios aplinkybės apibūdinamos taip: 1) nėra mutageniškumo įrodymų (pvz., nėra atsako į dozę, mutacijų dažnis nėra didesnis nei vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio arba istorinių fono intervalų ir kt.) keliems duomenų taškams nuo 100 % iki 20 % RTG/RS, taip pat yra mažiausiai vienas duomenų RTG/RS taškas nuo 20 % iki 25 %. 2) nėra mutageniškumo įrodymų (pvz., nėra atsako į dozę, mutacijų dažnis nėra didesnis nei vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio arba istorinių fono intervalų ir kt.) keliems duomenų taškams nuo 100 % iki 25 % RTG/RS, taip pat neigiamų duomenų RTG/RS taškas yra šiek tiek mažiau nei 10 %. Abiem šiais atvejais galima daryti išvada, kad bandomoji cheminė medžiaga yra neigiama.

69. Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

70. Tais atvejais, kai atsakas nėra aiškiai neigiamas ar aiškiai teigiamas, kaip apibūdinta pirmiau, ir (arba) siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą, duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus tyrimus. Galėtų būti naudinga atlikti kartotinį bandymą, galbūt pakeistomis bandymo sąlygomis (pvz., esant kitiems tarpams tarp koncentracijos verčių, kad būtų didesnė tikimybė gauti duomenų taškus 10–20 % RTG/RS intervale, naudojant kitas metabolinio aktyvinimo sąlygas (t. y. S9 koncentraciją ar S9 kilmę)).

71. Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai yra teigiami ar neigiami. Todėl būtų daroma išvada, kad bandomosios cheminės medžiagos atsakas yra abejotinas (aiškinama, kad jis gali būti vienodai teigiamas ar neigiamas).

BANDYMO ATASKAITA

72. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;

— pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei žinomas;

— pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis:

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;

— tirpiklio galutinėje kultūros terpėje procentinė dalis.

Ląstelės:

laboratorijos pagrindinių kultūrų:

— ląstelių tipas ir šaltinis, istorija bandymų laboratorijoje;

— kariotipo ypatybės ir (arba) modalinis chromosomų skaičius;

— ląstelių kultūros priežiūros metodai;

— ar nėra užkrėstos mikoplazmomis;

— ląstelių dvigubėjimo trukmė.

Bandymo sąlygos:

— ląstelių kultūrų koncentracijos ir skaičiaus pasirinkimo pagrindimas; įskaitant, pvz., citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus;

— terpių sudėtis, CO_2 koncentracija, drėgmės lygis;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, išreikšta kaip galutinė koncentracija kultūros terpėje (pvz., µg ar mg/ml arba mM kultūros terpės).

— tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos, pridėtos į kultūros terpę, koncentracija (ir (arba) tūris);

— inkubavimo temperatūra;

— inkubavimo trukmė;

— apdorojimo trukmė;

— ląstelių tankis apdorojimo metu,

— metabolinio aktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis (S9 šaltinis, S9 mišinio paruošimo metodas, S9 mišinio ir S9 galutinėje kultūros terpėje koncentracija ar tūris, S9 kokybės kontrolės ėminiai);

— teigiamos ir neigiamos kontrolinės cheminės medžiagos, galutinės koncentracijos vertės kiekvienai apdorojimo sąlygai;

— ekspresijos laikotarpio trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, persėjimų skaičius ir maitinimo tvarkaraščiai, jei reikia),

— atrankos medžiagos identifikavimo duomenys ir jos koncentracija;

— MLA turėtų būti nurodytas naudotas variantas (agaro ar mikrošulinėlio);

— bandymų priimtinumo kriterijai;

— gyvybingų ir mutantinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodai,

— citotoksiškumo matavimo metodai,

— visa papildoma informacija, susijusi su citotoksiškumu ir taikomu metodu;

— inkubavimo po sėjimo trukmė;

— kolonijų, kurių dydis ir tipas nagrinėjimas, apibrėžtis (įskaitant „mažų“ ir „didelių“ kolonijų vertinimo kriterijus, jei reikia);

— tyrimų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinų kriterijai;

— pH, osmolialumo nustatymo, jei atliekamas, metodai ir nuosėdų nustatymo, jei tinka, metodai.

Rezultatai:

— kiekvienos kultūros apdorotų ląstelių skaičius ir persėjamų ląstelių skaičius;

— toksiškumo parametrai (MLA RTG ir TK6 RS);

— nuosėdų susidarymo požymiai ir nustatymo laikas;

— į atrankiąją ir neatrankiąją terpę pasėtų ląstelių skaičius;

— kolonijų skaičius neatrankiojoje terpėje ir atsparių kolonijų skaičius atrankiojoje terpėje, ir susijęs mutacijų dažnis;

— neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių ir, jei bandomoji cheminė medžiaga yra teigiama, mažiausiai vienos koncentracijos kolonijų dydžio nustatymas, ir susijęs mutacijų skaičius;

— koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,

— vienalaikio neigiamo (tirpiklio) ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys (koncentracijos vertės ir tirpikliai);

— istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (tirpiklio) ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys (koncentracijos ir tirpikliai), nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius; bandymų, kuriais pagrįsti istorinių kontrolinių ėminių duomenys, skaičius;

— statistinės analizės rezultatai (atskirų kultūrų ir sujungtų kartotinių ėminių, jei reikia), ir *p* vertės, jei yra; MLA GEF įvertinimas.

Rezultatų aptarimas

Išvada

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) JTAP (2001). Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (JTAP).

(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. Pateikta [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 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneugenas– cheminė medžiaga arba procesas, kuris dėl sąveikos su mitozinio ir mejozinio ląstelių dalijimosi ciklo komponentais sukelia aneuploidiją ląstelėse ar organizmuose.

Aneuploidija– vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Bazių porų pakaitas sukeliantys mutagenai– cheminės medžiagos, sukeliančios DNR molekulės bazių porų pakaitą.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Klonavimo efektyvumas– mažu tankiu pasėtų ląstelių, galinčių išaugti į suskaičiuojamų ląstelių koloniją, procentinė dalis.

Klastogenas– cheminė medžiaga ar procesas, sukeliantys struktūrines chromosomų aberacijas ląstelių populiacijose ar organizmuose.

Citotoksiškumas– pagal šio metodo bandymus citotoksiškumas identifikuojamas kaip MLA santykinio bendrojo augimo (RTG) arba TK6 santykinio išgyvenamumo (RS) sumažėjimas.

Tiesioginė mutacija– tėvinio tipo geno mutacija į mutantinę formą, dėl ko pakinta ar išnyksta koduojamo baltymo fermentinis aktyvumas arba funkcija.

Mutagenai, sukeliantys skaitymo rėmelio poslinkį– medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių DNR molekulės bazių porų intarpus ar iškritas.

Genotoksinis– bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant DNR trūkius, aduktus, pergrupavimus, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Mitozinė rekombinacija– rekombinacija tarp homologinių chromatidžių mitozės metu, kuri gali sukelti DNR dviejų grandinių trūkius arba heterozigotiškumo praradimą.

Mutageninis– sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Mutacijų dažnis– stebimų mutantinių ląstelių skaičius, padalytas iš gyvybingų ląstelių skaičiaus.

Fenotipo ekspresijos trukmė– laikas po apdorojimo, per kurį nustatomas genomo genetinis pokytis ir visi anksčiau buvusio geno produktai pašalinami tiek, kad pakinta fenotipinis požymis.

Santykinis išgyvenamumas– santykinis išgyvenamumas naudojamas kaip su apdorojimu susijusio citotoksiškumo matas taikant TK6. Tai yra iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumas (CE), koreguotas dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamo kontrolinio ėminio klonavimo efektyvumu.

Santykinis suspensijos augimas (RSG)– taikant MLA, bandymo kultūros santykinis bendrasis dviejų dienų suspensijos augimas palyginti su neigiamo ar tirpiklio kontrolinio ėminio dviejų dienų suspensijos augimu (Clive ir Spector, 1975). Į RSG turėtų būti įtrauktas bandymo kultūros santykinis augimas palyginti su neigiamo ar tirpiklio kontrolinio ėminio augimu apdorojimo laikotarpiu.

Santykinis bendrasis augimas (RTG)– RTG yra naudojamas kaip su apdorojimu susijusio citotoksiškumo matas taikant MLA. Tai yra bandymo kultūrų santykinio augimo (nešiklio kontrolinio ėminio atžvilgiu) matas, augimą matuojant apdorojimo, dviejų dienų ekspresijos ir mutantų atrankos klonavimo tarpsniais. Kiekvienos bandymo kultūros RSG dauginamas iš bandymo kultūros santykinio klonavimo efektyvumo mutantų atrankos metu ir išreiškiamas neigiamo ir (arba) tirpiklio kontrolinio ėminio klonavimo efektyvumo atžvilgiu (Clive ir Spector, 1975).

S9 kepenų frakcijos– skystis virš kepenų homogenato, gautas po centrifugavimo esant 9 000 g, t. y. žalių kepenų ekstraktas.

S9 mišinys– S9 kepenų frakcijos ir fermentų metaboliniam aktyvumui būtinų kofaktorių mišinys.

Suspensijos augimas (SG)– kartais išreikštas ląstelių skaičiaus padidėjimas per MLA apdorojimo ir ekspresijos tarpsnius. Jei atliekamas trumpalaikis apdorojimas (3 ar 4 h), SG skaičiuojamas per 1 dieną kartais išreikštą padidėjimą dauginant iš per 2 dieną kartais išreikšto padidėjimo. Jei atliekamas 24 h apdorojimas, SG yra kartais išreikštas padidėjimas 24 h apdorojimo laikotarpiu, padaugintas iš kartais išreikšto padidėjimo 1 ir 2 ekspresijos dieną.

Tirpiklio kontrolinis ėminys– bendrasis terminas, apibūdinantis kontrolines kultūras, į kurias dedama vien tik tirpiklio, naudoto bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti.

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Neapdoroti kontroliniai ėminiai– kultūros, kurios neapdorojamos (t. y. į jas nededama bandomosios cheminės medžiagos ar tirpiklio), bet su jomis atliekami veiksmai kaip su kultūromis, į kurias dedama bandomoji cheminė medžiaga.

2 priedėlis

FORMULĖS

Citotoksiškumas

Abiejų MLA variantų (agaro ir mikrošulinėlių)

Citotoksiškumas apibrėžiamas kaip santykinis bendrasis augimas (angl. RTG), kurį sudaro santykinis suspensijos augimas (angl. RSG) 2 dienų ekspresijos laikotarpiu ir santykinis klonavimo efektyvumas (angl. RCE), gautas mutantų atrankos metu. RTG, RSG ir RCE išreiškiami kaip procentinė dalis.

RSG skaičiavimas: suspensijos augimas su indeksu vienas (angl. SG_1) yra augimo santykis tarp 0 ir 1 dienos (ląstelių koncentracija 1 dieną/ląstelių koncentracija 0 dieną), suspensijos augimas su indeksu du (SG_2) yra augimo santykis tarp 1 ir 2 dienos (ląstelių koncentracija 2 dieną/ląstelių koncentracija 1 dieną). Apdorotos kultūros RSG yra bendrasis SG (SG_1 × SG_2) palyginti su neapdorotu ir (arba) tirpiklio kontroliniu ėminiu. Tai yra: RSG = $[SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}]/[SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$. SG_1 turėtų būti skaičiuojamas pagal pradinę ląstelių koncentraciją, naudotą ląstelių apdorojimo pradžioje. Taip atsižvelgiama į bandymo kultūros (-ų) citotoksiškumo skirtumą ląstelių apdorojimo metu.

RCE yra bandymo kultūros santykinis klonavimo efektyvumas palyginti su neapdoroto ir (arba) tirpiklio kontrolinio ėminio klonavimo efektyvumu, gautu mutantų atrankos metu.

Santykinis bendrasis augimas (angl. RTG): RTG = RSG × RCE

TK6

Santykinis išgyvenamumas (angl. RS):

Citotoksiškumas įvertinamas pagal santykinį išgyvenamumą, t. y. iš karto po apdorojimo sėjamų ląstelių klonavimo efektyvumą, koreguotą dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu, palyginti su neigiamų kontrolinių ėminių koreguotu klonavimo efektyvumu (priskirtas 100 % išgyvenamumas). Dėl ląstelių nuostolių apdorojimo metu pakoreguotas klonavimo efektyvumas gali būti apskaičiuotas taip:

$$\text{Pakoreguotas CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{ląstelių skaič. apdorojimo pabaigoje}}{\textit{ląstelių skaič. apdorojimo pradžioje}}$$

Bandomąja chemine medžiaga apdorotos kultūros RS apskaičiuojamas taip:

$$RS = \frac{\textit{pakoreguotas CE apdorotoje kultūroje}}{\textit{pakoreguotas CE tirpiklio kontrolinėje terpėje}} \times 100$$

MLA ir TK6 mutacijų dažnis

Mutacijų dažnis (angl. MF) yra mutantinių kolonijų atrankiojoje terpėje klonavimo efektyvumas (angl. CE_M), pakoreguotas dėl klonavimo efektyvumo neatrankioje terpėje mutantų atrankos metu (angl. CE_V). T. y. MF = CE_M/CE_V. Toliau aprašytas šių dviejų klonavimo efektyvumų skaičiavimas taikant agaro ir mikrošulinėlio klonavimo metodus.

MLA agaro variantas: MLA naudojant minkštojo agaro variantą, kolonijų skaičius mutantų atrankos lėkštelėje (C_M) ir kolonijų skaičius neatrankiosios terpės ar klonavimo efektyvumo (gyvybingųjų ląstelių skaičius) lėkštelėje (C_V) gaunamas tiesiogiai suskaičiuojant klonus. Kai klonavimo efektyvumui (CE) į mutantų atrankos (CE_M) lėkšteles bei į neatrankiosios terpės arba klonavimo efektyvumo (gyvybingųjų ląstelių skaičius) lėkšteles (CE_V) sėjama 600 ląstelių ir mutantų atrankai naudojama 3×10^6 ląstelių:

$$CE_M = C_M/(3 \times 10^6) = (C_M/3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V/600$$

MLA ir TK6 mikrošulinėlių variantas: Naudojant MLA mikrošulinėlių variantą, C_M ir C_V nustatomi kaip viso mikrošulinėlių plokštelių šulinėlių skaičiaus (angl. TW) ir tikėtino vieno šulinėlio kolonijų skaičiaus (angl. P) sandauga.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Pagal Puasono skirstinio nulinį narį (Furth *et al.*, 1981 m.) P gaunamas kaip:

$$P = -\ln (EW/TW)$$

Čia: EW – tuščių šulinėlių skaičius, TW – visų šulinėlių skaičius. Todėl:

$$CE_M = C_M /T_M = (P_M \times TW_M)/T_M$$

$$CE_V = C_V /T_V = (P_V \times TW_V)/T_V$$

Taikant MLA mikrošulinėlių variantą, mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažniai apskaičiuojami panašiu būdu, mažoms ir didelėms kolonijoms naudojant reikiamą tuščių šulinėlių skaičių.

Taikant TK6, mažų ir didelių kolonijų mutacijų dažniai nustatomi pagal anksti pasirodančius ir vėlai pasirodančius mutantus.

B.68 **TRUMPALAIKĖS EKSPOZICIJOS IN VITRO BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI i) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS RIMTĄ AKIŲ PAŽEIDIMĄ, IR ii) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO AR RIMTO AKIŲ PAŽEIDIMO**

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 491 (2017). Trumpalaikės ekspozicijos (angl. STE) bandymo metodas yra *in vitro* metodas, kuris tam tikrais atvejais ir su tam tikrais apribojimais gali būti taikomas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių), sukeliančių rimtą akių pažeidimą, taip pat cheminių medžiagų, kurių nereikia klasifikuoti dėl rimto akių pažeidimo ar akių dirginimo, pavojų klasifikavimui ir ženklinimui, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (angl. CLP) ([1]).

2. Daugelį metų cheminių medžiagų pavojaus akims potencialas buvo įvertinamas, dažniausiai atliekant *in vivo* triušio akių bandymą (TM B.5 (8), atitinka EBPO TG 405). Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks atskiras alternatyvus *in vitro* bandymas negalėtų visiškai pakeisti *in vivo* akių bandymo, kad būtų galima prognozuoti visą rimto akių pažeidimo ir (arba) dirginimo atsakų intervalą skirtingoms cheminių medžiagų klasėms. Tačiau pagal (nuosekliųjų) bandymų strategiją naudojamų alternatyvių bandymo metodų strateginiai deriniai gali visiškai pakeisti triušių akių bandymą (2). Žemynkryptis metodas yra skirtas bandyti cheminėms medžiagoms, kurios, kaip būtų galima tikėtis, atsižvelgiant į turimą informaciją, gali turėti dideli dirginimo potencialą arba sukelti rimtą akių pažeidimą. Priešingai, aukštynkryptis metodas yra skirtas bandyti cheminėms medžiagoms, kurios, kaip būtų galima tikėtis, atsižvelgiant į turimą informaciją, nesukeltų pakankamai didelio akių dirginimo, kurį reikėtų klasifikuoti. Nors nemanoma, kad STE bandymo metodas gali visiškai pakeisti *in vivo* triušių akių bandymą, jį galima taikyti kaip reglamentavimo klasifikavimui ir ženklinimui skirtos nuosekliųjų bandymo strategijos dalį, pvz., žemynkryptį ir (arba) aukštynkryptį metodą, kad be papildomų bandymų būtų galima identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias rimtą akių pažeidimą (JT GHS ir CLP 1 kategorijos) ir ii) chemines medžiagas (išskyrus labai lakias medžiagas ir visas kietąsias chemines medžiagas, neįskaitant paviršinio aktyvumo medžiagų), kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) (1) (2). Tačiau cheminę medžiagą, kurios taikant STE bandymo metodą negalima priskirti prie sukeliančių rimtą akių pažeidimą (JT GHS ir CLP 1 kategorija) arba prie JT GHS ir CLP *Be kategorijos* (nesukelia rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo), reikėtų papildomai bandyti, kad būtų nustatytas galutinis klasifikavimas. Be to, reikėtų pasitarti su atitinkamomis reglamentuojančiomis institucijomis prieš taikant STE kaip aukštynkryptį metodą pagal kitas nei JT GHS ir CLP klasifikavimo schemas. Tinkamiausio bandymo metodo pasirinkimas ir šio bandymo metodo taikymas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į EBPO rekomendacinį dokumentą dėl rimto akių pažeidimo ir akių dirginimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (14).

3. Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, skirtas įvertinti bandomosios cheminės medžiagos pavojaus akims potencialą, pagrįstą gebėjimu sukelti citotoksiškumą, taikant trumpalaikės ekspozicijos bandymo metodą. Cheminių medžiagų citotoksinis poveikis ragenos epitelio ląstelėms yra svarbus veikimo būdas, sukeliantis ragenos epitelio pažeidimą ir akių dirginimą. Ląstelių gyvybingumas taikant STE bandymo metodą vertinamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido), taip pat vadinamo tiazolilo mėlynuoju, tetrazolinio bromidu, fermentinį virsmą veikiant gyvybingoms ląstelėms į mėlynos spalvos formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš ląstelių (3). Gautas ląstelių gyvybingumas lyginamas su tirpiklio kontroliniam ėminiui gautu gyvybingumu (santykinis gyvybingumas) ir yra naudojamas įvertinant galimą bandomosios cheminės medžiagos pavojų akims. Bandomoji cheminė medžiaga klasifikuojama kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos, kai abiem 5 % ir 0,05 % koncentracijoms gautas ląstelių gyvybingumas yra mažesnis kaip arba lygus (≤) 70 %. Ir priešingai, cheminė medžiaga prognozuojama kaip JT GHS ir CLP *Be kategorijos*, kai abiem 5 % ir 0,05 % koncentracijoms gautas ląstelių gyvybingumas yra didesnis kaip (>) 70 %.

4. Šiame bandymo metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* reiškia tai, kas yra bandoma, ir nėra susijęs su STE bandymo metodo tinkamumu bandyti medžiagas ir (arba) mišinius. Apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

5. Šis bandymo metodas pagrįstas *Kao Corporation* (4) parengtu protokolu, kuris buvo dviejų skirtingų patvirtinimo tyrimų objektas: vieną atliko Japonijos alternatyvių bandymų su gyvūnais asociacijos (JSAAE) patvirtinimo komitetas

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

(5) ir Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centras (JaCVAM) (6). Ekspertizę atliko NICEATM/ICCVAM pagal bandymo metodo patvirtinimo tyrimų ataskaitas ir bendruosius apžvalginius dokumentus (7).

6. Kai STE bandymo metodas taikomas rimtą akių pažeidimą sukeliančioms cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams) (JT GHS ir CLP 1 kategorijos) identifikuoti (1), duomenų, gautų 125 cheminėms medžiagoms (įskaitant medžiagas ir mišinius), bendrasis tikslumas palyginti su *in vivo* triušio akių bandymu (7) yra 83 % (104/125), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 1 % (1/86) ir klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 51 % (20/39). Pagal šį metodą gauta klaidingai neigiamų rezultatų dalis nėra labai svarbi, nes visos bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunamas ≤ 70 % ląstelių gyvybingumas esant 5 % koncentracijai, ir > 70 % esant 0,05 % koncentracijai, vėliau būtų bandomos pagal tinkamai patvirtintus *in vitro* bandymo metodus arba, kaip paskutinį variantą, atliekant *in vivo* triušio akių bandymą, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų ir pagal šiuo metu rekomenduojamą nuosekliųjų bandymų strategiją bei įrodomosios duomenų galios metodus (1) (8). Daugiausia buvo bandomos vienkomponentės medžiagos, nors yra šiek tiek duomenų apie mišinių bandymus. Bandymų metodas vis dėlto techniškai tinka daugiakomponentėms medžiagoms ir mišiniams bandyti. Tačiau, prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. STE bandymo metodas neturėjo kitų specifini trūkumų, jį taikant bandomosioms cheminėms medžiagoms identifikuoti kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos medžiagas. Tyrėjai, kurie taiko šį bandymo metodą bandomosioms cheminėms medžiagoms, galėtų spręsti, ar ≤ 70 % ląstelių gyvybingumas, esant 5 % ir 0,05 % koncentracijai turėtų būti priimtas kaip rimtą akių pažeidimą sukeliančio atsako rodiklis ir cheminę medžiagą reikėtų klasifikuoti kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos, neatliekant papildomų bandymų.

7. Kai STE bandymo metodas buvo taikomas identifikuoti cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams), kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) (1), 130 cheminėms medžiagoms (įskaitant medžiagas ir mišinius) gautų duomenų bendrasis tikslumas palyginti su *in vivo* triušio akių bandymu (7) yra 85 % (110/130), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 12 % (9/73) ir klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 19 % (11/57). Jei iš duomenų rinkinio pašalinamos labai lakios medžiagos ir kietosios medžiagos, išskyrus paviršinio aktyvumo medžiagas, bendrasis tikslumas padidėja iki 90 % (92/102), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 2 % (1/54) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 19 % (9/48) (7). Todėl galimi STE bandymo metodo trūkumai identifikuojant tas bandomąsias chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) yra didelė klaidingai neigiamų rezultatų dalis i) labai lakių medžiagų, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa, ir ii) kietųjų cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių), išskyrus paviršinio aktyvumo medžiagas ir tik iš paviršinio aktyvumo medžiagų sudarytus mišinius. Tokios cheminės medžiagos neįtrauktos į STE bandymo metodo taikymo sritį (7).

8. Be 6 ir 7 pastraipose nurodytų cheminių medžiagų, STE bandymo metodu gautų vidinių duomenų rinkinyje taip pat yra 40 mišinių duomenys, kurių tikslumas palyginti su *in vivo Draize* akių bandymu yra 88 % (35/40), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 50 % (5/10) ir klaidingai neigiamų – 0 % (0/30) (9), kai daroma prognozė dėl mišinių, kurių nereikia klasifikuoti pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemas (9). Todėl STE bandymo metodas gali būti taikomas kaip apribojimo dėl kietųjų medžiagų išplėtimas JT GHS ir CLP *Be kategorijos* mišiniams identifikuoti aukštynkrypčiu metodu, išskyrus kietųjų medžiagų mišinius, kitus nei paviršinio aktyvumo medžiagų mišiniai. Be to, mišinius, turinčius cheminių medžiagų, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa, reikėtų vertinti atsargiai, kad būtų išvengta galimos sumažintos prognozės, ir reikėtų pagrįsti kiekvienu atveju atskirai.

9. STE bandymo metodas negali būti taikomas bandomosioms cheminėms medžiagoms identifikuoti kaip JT GHS ir CLP 2 kategorijos, arba JT GHS 2A (akių dirginimas) ar 2B (nestiprus akių dirginimas) kategorijos, dėl didelio skaičiaus JT GHS ir CLP 1 kategorijos cheminių medžiagų, kurioms gaunama sumažinta prognozė jas priskiriant 2, 2A ar 2B kategorijai, bei JT GHS ir CLP *Be kategorijos* cheminių medžiagų, kurioms gaunama padidinta prognozė jas priskiriant 2, 2A ar 2B kategorijai (7). Šiuo tikslu gali prireikti papildomų bandymų taikant kitą tinkamą metodą.

10. STE bandymo metodas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios tirpsta fiziologiniame tirpale, 5 % dimetilsulfoksido tirpale (DMSO) fiziologiniame tirpale arba mineralinėje alyvoje, arba gaunama ne mažiau kaip 5 minutes patvari vienalytė suspensija. STE bandymo metodas netinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios netirpsta fiziologiniame tirpale, 5 % DMSO fiziologiniame tirpale arba mineralinėje alyvoje, arba negaunama ne mažiau kaip 5 minutes patvari vienalytė suspensija. Pagal STE bandymo metodą galima naudoti mineralinę alyvą dėl mažos ekspozicijos trukmės. Todėl STE bandymo metodas tinka vandenyje netirpių bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., ilgos grandinės sočiųjų alkoholių ar ketonų) pavojaus akims potencialui prognozuoti, jei jos maišosi bent su vienu iš pirmiau nurodytų trijų tirpiklių (4).

11. Šiame bandymo metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* reiškia tai, kas yra bandoma ([1]) ir nėra susijęs su STE bandymo metodo tinkamumu bandyti medžiagas ir (arba) mišinius.

BANDYMO PRINCIPAS

12. STE bandymo metodas yra citotoksiškumu pagrįstas *in vitro* bandymas, atliekamas naudojant susiliejančio monosluoksnio *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC) ląsteles, auginamas 96 šulinėlių mikroplokštelėje iš polikarbonato (4). Po penkių minučių veikimo bandomąja chemine medžiaga citotoksiškumas kiekybiškai matuojamas kaip SIRC ląstelių santykinis gyvybingumas, atliekant MTT bandymą (4). Sumažėjęs ląstelių gyvybingumas naudojamas galimo neigiamo, akių pažeidimą sukeliančio poveikio prognozei.

13. Pranešama, kad 80 % į triušio akį įlašinto tirpalo pasišalina per junginės maišelį per tris ar keturias minutes, nors daugiau kaip 80 % į žmogaus akį įlašinto tirpalo pasišalina per vieną ar dvi minutes (10). Taikant STE bandymo metodą mėginama suartinti šias ekspozicijos trukmes ir citotoksiškumą naudoti kaip vertinamąją baigtį vertinant SIRC ląstelėms padarytą pažeidimą po penkių minučių veikimo bandomąja chemine medžiaga.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

14. Prieš pradėdamos taikyti šiame bandymo metode aprašytą STE metodą įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, teisingai klasifikuodamos vienuolika cheminių medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje. Šios medžiagos buvo pasirinktos, kad būtų reprezentuojamas visas atsako į rimtą akių pažeidimą arba akių dirginimą intervalas, pagrįstas *in vivo* triušio akių bandymų (TG 405) rezultatais ir JT GHS ir CLP klasifikavimo sistema (1). Kitais pasirinkimo kriterijais yra galimybė medžiagų nusipirkti ir aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* STE bandymo metodo duomenų buvimas (3). Tais atvejais, kai sąraše nurodytos medžiagos nėra arba, jei būtų pagrįsta, gali būti naudojama kita medžiaga, kuriai turimi tinkami *in vivo* ir *in vitro* etaloniniai duomenys, jei taikomi čia aprašyti atrankos kriterijai.

1 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų sąrašas

Medžiaga	CASRN	Cheminių medžiagų klasė ([1])	Agregatinė būsena	*In vivo* JT GHS ir CLP ([2]) kat.	STE bandymo tirpiklis	STE JT GHS ir CLP Kat.
Benzalkonio chloridas (10 %, vandeninis)	8001-54-5	Onio junginys	Skystis	1 kategorija	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija

([1]) 2013 m. birželio mėn. bendrajame posėdyje buvo sutarta, kad, jei įmanoma, terminas *bandomosios cheminės medžiagos*, apibūdinantis tai, kas yra bandoma, dabar turėtų būti vartojamas nuosekliau rengiant naujus ir atnaujintus bandymo metodus.

Medžiaga	CASRN	Cheminių medžiagų klasė ([1])	Agregatinė būsena	*In vivo* JT GHS ir CLP ([2]) kat.	STE bandymo tirpiklis	STE JT GHS ir CLP Kat.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eteris	Skystis	1 kategorija	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Rūgštinis raudonasis 92	18472-87-2	Heterociklinis junginys; bromo junginys; chloro junginys	Kietoji medžiaga	1 kategorija	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Natrio hidroksidas	1310-73-2	Šarmas; neorganinė cheminė medžiaga	Kietoji medžiaga	1 kategorija ([3])	Fiziologinis tirpalas	1 kategorija
Butirolaktonas	96-48-0	Laktonas; heterociklinis junginys	Skystis	2A kategorija (CLP 2 kategorija)	Fiziologinis tirpalas	Prognozės pateikti negalima
1-oktanolis	111-87-5	Alkoholis	Skystis	2A/B kategorija ([4]) (CLP 2 kategorija)	Mineralinė alyva	Prognozės pateikti negalima
Ciklopentanolis	96-41-3	Alkoholis Angliavandenilis, ciklinis	Skystis	2A/B kategorija ([5]) (CLP 2 kategorija)	Fiziologinis tirpalas	Prognozės pateikti negalima
2-etoksietilacetatas	111-15-9	Alkoholis; eteris	Skystis	*Be kategorijos*	Fiziologinis tirpalas	*Be kategorijos*
Dodekanas	112-40-3	Alifatinis angliavandenilis	Skystis	*Be kategorijos*	Mineralinė alyva	*Be kategorijos*
Metilizobutilketonas	108-10-1	Ketonas	Skystis	*Be kategorijos*	Mineralinė alyva	*Be kategorijos*

Medžiaga	CASRN	Cheminių medžiagų klasė ([1])	Agregatinė būsena	*In vivo* JT GHS ir CLP ([2]) kat.	STE bandymo tirpiklis	STE JT GHS ir CLP Kat.
1,1-dimetilguanidino sulfatas	598-65-2	Amidinas; sieros junginys	Kietoji medžiaga	*Be kategorijos*	Fiziologinis tirpalas	*Be kategorijos*

([1]) Cheminė klasė buvo priskirta naudojant iš ankstesnių NICEATM leidinių paimtą informaciją, ir, jei jos nėra, naudojant Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų medicininių dalykines antraštes (MeSH®) (per ChemIDplus® (Nacionalinė medicinos biblioteka) adresu http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) ir NICEATM nustatytas struktūras.

([2]) Pagal *in vivo* triušio akies bandymo (EBPO TG 405) rezultatus, bei naudojant JT GHS ir CLP (1).

([3]) Priskyrimas 1 kategorijai pagrįstas 100 % natrio hidroksido (įtraukto į EBPO TG 435 kaip kvalifikacijai įrodyti skirta odą ėsdinanti cheminė medžiaga) odos ėsdinimo potencialu bei JT GHS ir CLP 1 kategorijos kriterijumi (1).

([4]) Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviem kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 dieną 2 iš 6 gyvūnų palyginti su 4 iš 6 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. *In vivo* duomenų rinkinį sudarė 2 tyrimų su 3 gyvūnais kiekviename duomenys. Atliekant vieną tyrimą dviem iš trijų gyvūnų pasireiškė poveikis 7 dieną, todėl reikia klasifikuoti kaip 2A kategorijos (11), tuo tarpu, kai atliekant antrąjį tyrimą visų trijų gyvūnų visos vertinamosios baigtys grįžo prie nulinių verčių, todėl reikia klasifikuoti kaip 2B kategorijos (12).

([5]) Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviem kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 dieną 1 iš 3 gyvūnų palyginti su 2 iš 3 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. Atliekant *in vivo* tyrimą, naudoti 3 gyvūnai. Visos vertinamosios baigtys, išskyrus vieno gyvūno ragenos drumstumą ir junginės paraudimą, grįžo prie nulinių verčių 7 parą arba anksčiau. Vieno gyvūno, kuris ne visiškai atsigavo iki 7 dienos, ragenos drumstumo balas buvo 1 ir junginės paraudimo balas buvo 1 (7 dieną), bet visiškai atsigavo 14 dieną (11).

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

PROCEDŪRA

Ląstelių monosluoksnio ruošimas

15. Taikant STE metodą reikėtų naudoti triušių ragenos ląstelių liniją SIRC. Rekomenduojama SIRC ląstelės gauti iš reikalavimus atitinkančio ląstelių banko, pvz., *American Type Culture Collection CCL60*.

16. SIRC ląstelės auginamos 37 °C temperatūros, 5 % CO_2 ir drėgnos atmosferos sąlygomis kolboje su kultūros terpe, sudaryta iš Eagle minimalios mitybos terpės (MEM), papildyta 10 % galvijų vaisiaus kraujo serumu (FBS), 2 mM L-glutamino, 50–100 vienetų/ml penicilino ir 50–100 µg/ml streptomicino. Kultūros kolboje susiliejusios ląstelės turėtų būti atskirtos naudojant tripsino ir etilediamintetraacto rūgšties tirpalą, naudojant ląstelių grandiklį arba jo nenaudojant. Ląstelės dauginamos (pvz., nuo 2 iki 3 sėjimų) kultūros kolboje prieš jas naudojant įprastiniam bandymui, ir sėjimų skaičius po atitirpinimo neturėtų būti didesnis kaip 25.

17. Ruošiamos STE bandymui naudojamos ląstelės ir reikiamu tankiu sėjamos į 96 šulinėlių plokšteles. Rekomenduojamas ląstelių sėjimo tankis yra $6{,}0 \times 10^3$ ląstelių vienam šulinėliui, jei ląstelės naudojamos praėjus 4 dienoms nuo sėjimo, arba $3{,}0 \times 10^3$ ląstelių vienam šulinėliui, jei ląstelės naudojamos praėjus 5 dienoms nuo sėjimo, kai kultūros tūris 200 µl. STE bandymui naudojamos ląstelės, sėjamos atitinkamu tankiu kultūros terpėje, iki bandymo pradžios, t. y. per keturias ar penkias dienas nuo sėjimo, pasiekia didesnį kaip 80 % susiliejimą.

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

18. Kaip pirmas tirpiklis bandomųjų cheminių medžiagų tirpalams ar suspensijoms ruošti pasirenkamas fiziologinis tirpalas. Jei bandomosios cheminės medžiagos tirpumas fiziologiniame tirpale yra mažas arba negalima gauti ne mažiau kaip penkias minutes patvarią vienalytę suspensiją, kaip antras tirpiklis pasirenkamas 5 % DMSO (CAS Nr. 67-68-5) tirpalas fiziologiniame tirpale. Jei bandomosios cheminės medžiagos netirpsta fiziologiniame tirpale arba 5 % DMSO fiziologiniame tirpale, arba juose negali būti gauta ne mažiau kaip penkias minutes patvari vienalytė suspensija, kaip trečias tirpiklis pasirenkama mineralinė alyva (CAS Nr. 8042-47-5).

19. Ruošiamas bandomųjų cheminių medžiagų 5 % (m/m) koncentracijos tirpalas arba vienalytė suspensija pasirinktame tirpiklyje ir nuosekliai skiedžiama 10 kartų 0,5 % ir 0,05 % koncentracijai gauti. Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga turi būti bandoma 5 % ir 0,05 % koncentracijos. 96 šulinėlių plokštelėje augintos ląstelės veikiamos kambario temperatūroje penkias minutes 200 µl/šulinėliui 5 % arba 0,05 % koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos tirpalu (arba suspensija). Bandomosios cheminės medžiagos (vienkomponentės ar daugiakomponentės arba mišiniai) laikomos grynosiomis medžiagomis ir skiedžiamos arba jų suspensija ruošiama pagal metodą, neatsižvelgiant į jų grynumą.

20. Auginimo terpė, aprašyta 16 pastraipoje, naudojama kaip terpės kontrolinis ėminys kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje. Be to, ląstelės taip pat turi būti veikiamos tirpiklio kontroliniais ėminiais kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje. Buvo patvirtinta, kad 18 pastraipoje nurodyti tirpikliai nedaro neigiamo poveikio SIRC ląstelių gyvybingumui.

21. Taikant STE bandymo metodą, kaip teigiamas kontrolinis ėminys kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje turi būti naudojamas 0,01 % natrio laurilsulfato (SLS) tirpalas fiziologiniame tirpale. Kad būtų galima apskaičiuoti teigiamų kontrolinių ėminių ląstelių gyvybingumą, kiekvieno kartotinio bandymo kiekvienoje plokštelėje turi būti fiziologinio tirpalo kontrolinis ėminys.

22. Turi būti naudojamas tuščiasis ėminys optinio tankio kompensacijai nustatyti ir tai turėtų būti atliekama naudojant šulinėlius tik su fiziologiniu tirpalu fosfatiniame buferiniame tirpale, kuriame nebūtų kalcio ir magnio jonų arba ląstelių.

23. Atliekant kiekvieną kartotinį bandymą, kiekvienas ėminys (bandomosios cheminės medžiagos, 5 % ir 0,05 % koncentracijos, terpės, tirpiklio ir teigiamas kontrolinis ėminys) turi būti bandomas tris kartus, ląsteles penkias minutes laikant kambario temperatūroje 200 µl atitinkamos bandomosios arba kontrolinės cheminės medžiagos tirpale.

24. Palyginamosios medžiagos yra naudingos, kai reikia įvertinti tam tikrai cheminių medžiagų arba gaminių klasei priskiriamų nežinomų cheminių medžiagų gebą dirginti akis, arba akis dirginančios medžiagos santykinę dirginimo gebą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Ląstelių gyvybingumo matavimas

25. Po ekspozicijos ląstelės plaunamos du kartus 200 µl PBS ir įpilama 200 µl MTT tirpalo (0,5 mg MTT/ml kultūros terpės). Po dviejų valandų trukmės reakcijos inkubatoriuje (37 °C, 5 % CO_2), MTT tirpalas dekantuojamas, MTT formazanas ekstrahuojamas tamsoje kambario temperatūroje 60 min, įpilant 200 µl 0,04 M vandenilio chlorido rūgšties tirpalo izopropanolyje, ir MTT formazano tirpalo optinis tankis matuojamas plokštelių spektrofotometru, esant 570 nm bangos ilgiui. Bandomųjų cheminių medžiagų (spalvotųjų medžiagų arba tiesioginių MTT reduktorių) trukdžiai atliekant MTT bandymą yra tik tokiu atveju, jei po ekspozicijos išplautoje bandymo sistemoje lieka reikšmingas bandomosios medžiagos kiekis, ir tai pasitaiko su 3D rekonstruotais žmogaus ragenos ar rekonstruoto žmogaus epidermio audiniais, bet nėra būdinga 2D ląstelių kultūroms, naudojamoms STE bandymo metode.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

26. Gautos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos optinio tankio (OT) vertės naudojamos ląstelių gyvybingumui skaičiuoti atžvilgiu tirpiklio kontrolinio ėminio, kurio gyvybingumas prilygintas 100 %. Santykinis ląstelių gyvybingumas išreiškiamas kaip procentinė dalis, ir gaunamas bandomosios cheminės medžiagos OT dalijant iš tirpiklio kontrolinio ėminio OT, iš abiejų verčių prieš tai atėmus tuščiojo ėminio OT.

$$Ląstelių\ gyvybing.(\%) = \frac{(band.medž.OT_{570}) - (tuščio\ OT_{570})}{(tirpiklio\ kontr.OT_{570}) - (tuščio\ OT_{570})} \times 100$$

Kiekvieno tirpiklio kontrolinio ėminio santykinis ląstelių gyvybingumas taip pat išreiškiamas kaip procentinė dalis ir gaunamas kiekvieno tirpiklio kontrolinio ėminio OT dalijant iš terpės kontrolinio ėminio OT, iš abiejų verčių prieš tai atėmus tuščiojo ėminio OT.

27. Turėtų būti atlikti trys kartotiniai bandymai, kiekvienu atveju naudojant tris kartotinius šulinėlius (t. y. n = 9). Santykinio ląstelių gyvybingumo aritmetinis vidurkis skaičiuojamas naudojant kiekvieno kartotinio bandymo trijų kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir tirpiklio kontrolinių ėminių šulinėlių vidurkį. Galutinis aritmetinis ląstelių gyvybingumo vidurkis skaičiuojamas kaip trijų nepriklausomų kartotinių bandymų vidurkis.

28. Ląstelių gyvybingumo ribinės vertės, pagal kurias bandomosios cheminės medžiagos identifikuojamos kaip sukeliančios rimtą akių pažeidimą (JT GHS ir CLP 1 kategorija) ir bandomosios cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*), pateiktos toliau.

2 lentelė

STE bandymo metodo prognozavimo modelis

Ląstelių gyvybingumas		JT GHS ir CLP klasifikavimas	Taikomumas
esant 5 %	esant 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	*Be kategorijos*	Medžiagos ir mišiniai, išskyrus: i) labai lakias medžiagas, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa [1] ir ii) kietąsias chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), išskyrus paviršinio aktyvumo medžiagas ir tik iš paviršinio aktyvumo medžiagų sudarytus mišinius
≤ 70 %	> 70 %	Prognozės pateikti negalima	Netaikoma
≤ 70 %	≤ 70 %	1 kategorija	Medžiagos ir mišiniai [2]

[1] Mišinius, turinčius cheminių medžiagų, kurių garų slėgis didesnis kaip 6 kPa, reikėtų vertinti atsargiai, kad būtų išvengta galimos sumažintos prognozės, ir reikėtų pagrįsti kiekvienu atveju atskirai.

[2] Atsižvelgiant į rezultatus, daugiausia gautus vienkomponentėms medžiagoms, nors yra nedidelis kiekis mišinių bandymo duomenų. Bandymų metodas vis dėlto techniškai tinka daugiakomponentėms medžiagoms ir mišiniams bandyti. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar šiuo metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

Priimtinumo kriterijai

29. Laikoma, kad rezultatai turi būti priimtini, kai jie atitinka visus tokius kriterijus:

a) Terpės kontrolinio ėminio (veikiamo kultūros terpe) optinis tankis, atėmus tuščiojo ėminio optinį tankį, turėtų būti 0,3 arba didesnis.

b) Tirpiklio kontroliniam ėminiui gautas gyvybingumas terpės kontrolinio ėminio gyvybingumo atžvilgiu turėtų būti 80 % arba didesnis. Jei atliekant kiekviena kartotinį bandymą naudojami kartotiniai tirpiklio kontroliniai ėminiai, kiekvienam iš jų gautas ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis kaip 80 %, kad būtų galima klasifikuoti bandomąsias chemines medžiagas, bandomas naudojant šiuos tirpiklius.

c) Teigiamam kontroliniam ėminiui (0,01 % SLS) gautas ląstelių gyvybingumas neturėtų nukrypti nuo istorinio vidurkio daugiau kaip per du standartinius nuokrypius. Viršutinė ir apatinė teigiamo kontrolinio ėminio priimtinumo ribos turėtų būti dažnai atnaujinamos, t. y. kas tris mėnesius, arba laboratorijoje kiekvieną kartą atliekamas priimtinas, jei bandymai atliekami nedažnai (t. y. rečiau kaip kartą per mėnesį). Jei laboratorijos atliekamų bandymų skaičius nėra pakankamas statistiškai pagrįstam teigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui gauti, priimtina, kad būtų naudojamos metodo kūrėjo nustatytos viršutinė ir apatinė priimtinumo ribos, t. y. nuo 21,1 % iki 62,3 % pagal jo laboratorijos istorinius duomenis, kai vidinis pasiskirstymas gaunamas per pirmuosius įprastinius bandymus.

d) Galutinio ląstelių gyvybingumo, gauto atliekant tris nepriklausomus kartotinius bandymus, standartinis nuokrypis turėtų būti mažesnis kaip 15 % abiem 5 % ir 0,05 % bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėms.

Jei rezultatai neatitinka vieno ar kelių šių kriterijų, jie turėtų būti atmesti ir atlikti dar trys nepriklausomi kartotiniai bandymai.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

30. Ataskaitoje turi būti pateiktos kiekvieno atskiro kartotinio bandymo kiekvienam atskiram šulinėliui gautos vertės (pvz., ląstelių gyvybingumo vertės), taip pat bendrasis vidurkis, standartinis nuokrypis (SN) ir klasifikavimas.

Bandymo ataskaita

31. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos

— Vienkomponentė medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS registro numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys: kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, pvz., cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinis paplitimas bei būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— agregatinė būsena, lakumas, pH, LogP, molekulinė masė, cheminių medžiagų klasė ir papildomos fizikinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;

— grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Bandymo metodo sąlygos ir procedūros

— rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

— taikyto bandymo metodo aprašymas;

— naudota ląstelių linija, jos šaltinis, bandymui naudotų ląstelių sėjimų skaičius ir susiliejimo laipsnis;

— išsamūs taikytos procedūros duomenys;

— atliktų kartotinių bandymų ir naudotų kartotinių ėminių skaičius;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės (jei skiriasi nuo rekomenduojamų);

— kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;

— ekspozicijos bandomajai cheminei medžiagai trukmė (jei skiriasi nuo rekomenduojamų);

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;

— taikytų įvertinimo ir sprendimo priėmimo kriterijų aprašymas;

— nuoroda į istorinių teigiamų kontrolinių ėminių vidurkį ir standartinį nuokrypį (SN);

— - bandymo metodo taikymo laboratorijoje kvalifikacijos įrodymas (pvz., bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas) arba bandymo metodo taikymo charakteristikų atkuriamumo ilgą laiką įrodymas.

Rezultatai:

— Lentelėse turėtų būti pateiktos kiekvienos koncentracijos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos atskiros OT vertės, gautos kartotiniam šulinėliui, kiekvieno nepriklausomo kartotinio bandymo OT aritmetinio vidurkio vertės, kiekvieno nepriklausomo kartotinio bandymo ląstelių gyvybingumo vertės % bei galutinis visų trijų kartotinių bandymų ląstelių gyvybingumo aritmetinis vidurkis % ir SN;

— terpės, tirpiklio ir teigiamo kontrolinio ėminio rezultatai, įrodantys tinkamus tyrimo priimtinumo kriterijus;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;

— gautas bendrasis klasifikavimas su nuoroda į naudotą prognozavimo modelį ir (arba) į taikytus sprendimo priėmimo kriterijus.

Rezultatų aptarimas

Išvados

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. Pateikta 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. Pateikta [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Šio priedo B.5 skyrius. Ūmus akių dirginimas ar ėsdinimas.

(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.

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas: bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (13).

Palyginamoji medžiaga: medžiaga, naudojama kaip etalonas lyginant su bandomąja chemine medžiaga. Palyginamoji medžiaga turi turėti tokias savybes: i) pastovų (-ius) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) jos struktūrinės ir funkcinės savybės turi būti panašios į bandomųjų medžiagų klasės savybes; iii) žinomas fizikines ir (arba) chemines charakteristikas; iv) žinomą poveikį patvirtinančius duomenis ir v) žinomą veikimo gebą reikiamo atsako intervale.

Aukštynkryptis metodas: pakopinis metodas, taikomas bandomajai cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad jos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo, kai cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti (duoda neigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda teigiamą rezultatą).

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Akių dirginimas: akių pokyčių atsiradimas uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kurie visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *grįžtamasis poveikis akims* ir JT GHS ir CLP 2 kategorija.

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis: visų teigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis: visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Pavojus: būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

Terpės kontrolinis ėminys: neapdorotas kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio sąveika su bandymo sistema.

Mišinys: dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga: medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Daugiakomponentė medžiaga: medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

OT: optinis tankis.

Teigiamas kontrolinis ėminys: kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas: santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (10).

Patikimumas: pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (13).

Jautris: visų teigiamų ir (arba) veikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (10).

Rimtas akių pažeidimas: akies audinio pažeidimas arba rimtas fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta per 21 dieną nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *negrįžtamasis poveikis akims* ir JT GHS 1 kategorija.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis ėminys: visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis neapdorotas ėminys, kuris tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti atskaitos vertę ėminiams, apdorotiems bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai bandomas kartu su vienalaikiu terpės kontroliniu ėminiu, šis ėminys taip pat parodo, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Specifiškumas: visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (13).

Medžiaga: natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

Paviršinio aktyvumo medžiaga: dar vadinama paviršinio aktyvumo agentu, tai yra medžiaga, pvz., ploviklis, kuri gali sumažinti skysčio paviršiaus įtemptį, kad skystis galėtų putoti ar prasiskverbti į kietąsias medžiagas; be to, ji žinoma drėkiklio pavadinimu.

Bandomoji cheminė medžiaga: taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija: pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios vertės analizės procesą, siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jei bandomajai cheminei medžiagai dirginamąją gebą galima priskirti atsižvelgiant į turimą informaciją, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jei, atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomajai cheminei medžiagai dirginamosios gebos priskirti neįmanoma, nuosekliųjų bandymų su gyvūnais procedūra taikoma tol, kol būtų galima gauti neabejotiną klasifikavimą.

Žemynkryptis metodas: pakopinis metodas, taikomas bandomajai cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad ji sukelia rimtą akių pažeidimą, kai cheminės medžiagos, kurios sukelia rimtą akių pažeidimą (duoda teigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda neigiamą rezultatą).

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS): sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

JT GHS ir CLP 1 kategorija: žr. *Rimtas akių pažeidimas*.

JT GHS ir CLP 2 kategorija: žr. *Akių dirginimas*.

JT GHS ir CLP *be kategorijos*: cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos kaip JT GHS ir CLP 1 arba 2 kategorijos (arba JT GHS 2A arba 2B kategorijos).

UVCB: nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

B.69 **REKONSTRUOTO ŽMOGAUS RAGENOS SAVYBIŲ EPITELIO (RhCE) BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI CHEMINĖMS MEDŽIAGOMS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI IR ŽENKLINTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO ARBA RIMTO AKIŲ PAŽEIDIMO**

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (angl. TG) 492 (2017). *Rimtu akių pažeidimu* vadinamas akies audinio pažeidimas arba rimtas fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta per 21 dieną nuo uždėjimo, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (angl. GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) Reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (angl. CLP) ([1]). Taip pat pagal JT GHS ir CLP *akių dirginimas* yra akių pokyčių atsiradimas uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kurie visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Rimtą akių pažeidimą sukeliančios bandomosios cheminės medžiagos klasifikuojamos kaip JT GHS ir CLP 1 kategorijos, sukeliančios akių dirginimą – kaip JT GHS ir CLP 2 kategorijos. Bandomosios cheminės medžiagos, neklasifikuojamos kaip dirginančios akis ar sukeliančios smarkų akių pažeidimą, apibrėžiamos kaip medžiagos, kurios neatitinka JT GHS 1 arba 2 kategorijos (2A ar 2B) klasifikavimo reikalavimų, t. y. jos nurodomos kaip JT GHS ir CLP *Be kategorijos*.

2. Atliekant rimto akių pažeidimo ir (arba) akių dirginimo vertinimą paprastai buvo naudojami laboratoriniai gyvūnai (TM B.5 (2)). Tinkamiausio bandymo metodo pasirinkimas ir šio bandymo metodo taikymas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į EBPO rekomendacinį dokumentą dėl rimto akių pažeidimo ir akių dirginimo integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (39).

3. Šiame bandymo metode aprašoma *in vitro* procedūra, kurią taikant galima identifikuoti chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP. Taikant metodą naudojamas rekonstruotas žmogaus ragenos savybių epitelis (angl. RhCE), kuris labai tiksliai atkartoja histologines, morfologines, biochemines ir fiziologines žmogaus ragenos epitelio savybes. Yra patvirtinti kiti keturi *in vitro* bandymo metodai, laikomi moksliškai pagrįstais ir priimti kaip B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) ir B.68 bandymo metodai (6), kad būtų tiriamas akių pažeidimas ir (arba) dirginimas kaip žmogaus sveikatos vertinamoji baigtis.

4. Į šį bandymo metodą įtraukti du patvirtinti bandymai, kuriems atlikti naudojami prekyboje esantys RhCE modeliai. Akių dirginimo ir (arba) rimto akių pažeidimo vertinimo patvirtinimo tyrimai buvo vykdomi (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) atliekant EpiOcular™ akių dirginimo bandymą (EIT) ir SkinEthic™ žmogaus ragenos epitelio (HCE) akių dirginimo bandymą (EIT). Atliekant abu šiuos bandymus kaip bandymo sistema naudojami prekyboje esantys RhCE audinių dariniai, kurie toliau tekste nurodomi kaip patvirtinti pamatiniai metodai – PPM1 ir PPM2. Pagal šių patvirtinimo tyrimų ir jų nepriklausomos ekspertizės rezultatus (9) (12) buvo prieita prie išvados, kad naudojant EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT galima teisingai identifikuoti chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo pagal JT GHS, ir bandymai buvo rekomenduoti šiam tikslui kaip moksliškai pagrįsti (13).

5. Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks atskiras *in vitro* bandymo metodas negalėtų visiškai pakeisti *Draize* akių bandymo *in vivo* (2) (14), kad būtų galima prognozuoti visą rimto akių pažeidimo ir (arba) dirginimo atsakų intervalą skirtingoms cheminių medžiagų klasėms. Tačiau pagal (nuosekliųjų) bandymų, pvz., aukštynkrypčių ir (arba) žemynkrypčių metodų, strategiją naudojamų kelių alternatyvių bandymo metodų strateginiai deriniai gali visiškai pakeisti *Draize* akių bandymą (15). Aukštynkryptį metodą (15) numatoma taikyti tada, kai atsižvelgiant į turimą informaciją manoma, kad cheminė medžiaga nepakankamai dirgina akis, dėl ko ją reikėtų klasifikuoti, o žemynkryptį metodą (15) numatoma taikyti tada, kai atsižvelgiant į turimą informaciją manoma, kad cheminė medžiaga gali sukelti rimtą akių pažeidimą. EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT rekomenduojami kaip bandymo strategijos dalis, kad būtų galima identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP (*Be kategorijos*), neatliekant papildomų bandymų, pvz., Scott *et al.* pasiūlytą aukštynkryptį ar žemynkryptį metodą, pvz., kaip pradinę aukštynkrypčio metodo pakopą arba kaip vieną iš paskutinių žemynkrypčio metodo pakopų (15). Tačiau EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT netaikomi nustatant skirtumą tarp JT GHS ir CLP 1 kategorijos (rimtas akių pažeidimas) bei JT GHS ir CLP 2 kategorijos (akių dirginimas). Šiam atskyrimui reikės taikyti kitą bandymų strategijos pakopą (15). Jei naudojant EpiOcular™

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

EIT arba SkinEthic™ HCE EIT nustatoma, kad bandomąją cheminę medžiagą reikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo, turėtų būti atlikti papildomi bandymai (*in vitro* ir (arba) *in vivo*), taikant, pvz., TM B.47, B.48, B.61 arba B.68, kad būtų gauta galutinė išvada (JT GHS ir CLP Be kategorijos, 2 kategorijos ar 1 kategorijos).

6. Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, skirtas įvertinti bandomosios cheminės medžiagos pavojaus akims potencialą, pagrįstą gebėjimu sukelti RhCE audinio darinio citotoksiškumą, matuojamą atliekant MTT bandymą (16) (žr. 21 pastraipą). RhCE audinio gyvybingumas po apdorojimo bandomąja chemine medžiaga nustatomas lyginant su audiniais, apdorotais neigiama kontroline medžiaga (gyvybingumo %) ir toliau ji naudojamas bandomosios cheminės medžiagos pavojaus akims potencialui prognozuoti.

7. Yra naudojimo charakteristikų standartai (17), kurie padėtų atlikti į EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT panašių naujų ar modifikuotų, *in vitro* RhCE pagrįstų bandymo metodų patvirtinimą, atsižvelgiant į EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 34 principus (18), kad būtų galima laiku atlikti EBPO TG 492 pakeitimą dėl jų įtraukimo. Abipusis duomenų pripažinimas pagal EBPO susitarimą bus užtikrintas tik bandymams, patvirtintiems pagal naudojimo charakteristikų standartus, jei šiuos bandymus EBPO peržiūrėtų ir įtrauktų į atitinkamas bandymo gaires.

APIBRĖŽTYS

8. Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

9. Taikant šį bandymo metodą naudojami prekyboje esantys trimačiai RhCE audinio dariniai, kurie gaminami naudojant pirminius žmogaus epidermio keratinocitus (t. y. EpiOcular™ OCL-200) arba imortalizuotas žmogaus ragenos epitelio ląsteles (t. y. SkinEthic™ HCE/S). EpiOcular™ OCL-200 ir SkinEthic™ HCE/S RhCE audinio dariniai yra panašūs į *in vivo* ragenos epitelio trimatę struktūrą ir gaminami naudojant tiriamų rūšių ląsteles (19) (20). Be to, bandymais tiesiogiai matuojamas citotoksiškumas dėl cheminės medžiagos prasiskverbimo per rageną ir sukelto ląstelių bei audinio pažeidimo; pagal citotoksinį atsaką nustatomas bendrasis *in vivo* rimtas akių pažeidimo arba akių dirginimo rezultatas. Ląstelės gali būti pažeistos veikiant keliais būdais (žr. 20 pastraipą), bet citotoksiškumas vaidina svarbų, jei ne svarbiausią mechanizmo požiūriu vaidmenį nustatant bendrąjį rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo atsaką į cheminę medžiagą, pasireiškiantį *in vivo* daugiausia kaip ragenos drumstumas, rainelės uždegimas, junginės paraudimas ir (arba) junginės chemozė, nepriklausomai nuo audinio pažeidimą sukėlusių fizikinių ir cheminių procesų.

10. Atliekant šio bandymo metodo patvirtinimą buvo bandoma didelė cheminių medžiagų grupė, aprėpianti įvairius cheminių medžiagų tipus, klases, molekulines mases, logP, chemines struktūras ir kt. EpiOcular™ EIT patvirtinimo duomenų bazę iš viso sudarė 113 cheminių medžiagų, aprėpiančių 95 skirtingų organinių funkcinių grupių pagal EBPO QSAR taikomųjų programų analizę (8). Dauguma šių cheminių medžiagų buvo vienkomponentės medžiagos, tačiau į tyrimą taip pat buvo įtrauktos kelios daugiakomponentės medžiagos (įskaitant 3 homopolimerus, 5 kopolimerus ir 10 kvazispolimerų). Atsižvelgiant į agregatinę būseną bei JT GHS ir CLP kategorijas, 113 bandytų cheminių medžiagų buvo paskirstytos taip: 1 kategorijos skysčių – 13, 1 kategorijos kietųjų medžiagų – 15, 2A kategorijos skysčių – 6, 2A kategorijos kietųjų medžiagų – 10, 2B kategorijos skysčių – 7, 2B kategorijos kietųjų medžiagų – 7, *Be kategorijos* skysčių – 27, *Be kategorijos* kietųjų medžiagų – 28 (8). SkinEthic™ HCE EIT patvirtinimo duomenų bazę iš viso sudarė 200 cheminių medžiagų, aprėpiančių 165 skirtingų organinių funkcinių grupių (8) (10) (11). Dauguma šių cheminių medžiagų buvo vienkomponentės medžiagos, tačiau į tyrimą taip pat buvo įtrauktos kelios daugiakomponentės medžiagos (įskaitant 10 polimerų). Atsižvelgiant į agregatinę būseną bei JT GHS ir CLP kategorijas, 200 bandytų cheminių medžiagų buvo paskirstytos taip: 1 kategorijos skysčių – 27, 1 kategorijos kietųjų medžiagų – 24, 2A kategorijos skysčių – 19, 2A kategorijos kietųjų medžiagų – 10, 2B kategorijos skysčių – 9, 2B kategorijos kietųjų medžiagų – 8, *Be kategorijos* skysčių – 50, *Be kategorijos* kietųjų medžiagų – 53 (10) (11).

11. Šis bandymo metodas taikomas medžiagoms ir mišiniams, kietosioms medžiagoms, skysčiams, pusiau kietoms medžiagoms ir vaškams. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas prieš bandymą reikėtų sumalti; jokio kito ėminio parengiamojo apdorojimo atlikti nereikia. Atliekant patvirtinimo tyrimą, dujos ir aerozoliai nebuvo vertinami. Nors, kaip atrodo, dujas ir aerozolius būtų galima bandyti taikant RhCE procedūrą, dabartinis metodas jų bandymams nėra pritaikytas.

12. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių šviesos absorbcijos sritis (natūraliai arba po apdorojimo) sutampa su MTT formazano, ir bandomosios cheminės medžiagos, kurios gali tiesiogiai redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT (į MTT formazaną), gali trukdyti matuoti audinių gyvybingumą, todėl koregavimui turi būti naudojami pritaikyti kontroliniai ėminiai. Pritaikytų kontrolinių ėminių, kurių gali prireikti, tipas skirsis priklausomai nuo cheminės medžiagos sukeliamų trukdžių ir nuo MTT formazano kiekybinio nustatymo procedūros (žr. 36–42 pastraipas).

13. Rezultatai, gauti atliekant parengiamojo patvirtinimo (21) (22) ir patvirtinimo (8) (10) (11) tyrimus, parodė, kad EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT galima perkelti į bandymų atlikimo patirties neturinčias laboratorijas ir rezultatai būtų atkuriami laboratorijų viduje ir tarp laboratorijų. Atsižvelgiant į šiuos tyrimus, tikėtinas EpiOcular™ EIT prognozių sutapimo atkuriamumo lygis, gautas pagal 113 cheminių medžiagų duomenis, laboratorijų viduje yra 95 %, tarp laboratorijų – 93 %. Tikėtinas SkinEthic™ HCE EIT prognozių sutapimo atkuriamumo lygis, gautas pagal 120 cheminių medžiagų duomenis, laboratorijų viduje yra 92 %, tarp laboratorijų – 95 %.

14. EpiOcular™ EIT gali būti taikomas identifikuoti cheminėms medžiagoms, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą. Atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo duomenis (8), EpiOcular™ EIT gautas bendrasis tikslumas yra 80 % (112 cheminių medžiagų), jautris – 96 % (57 cheminėms medžiagoms), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 4 % (57 cheminėms medžiagoms), specifiškumas – 63 % (55 cheminėms medžiagoms) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 37 % (55 cheminėms medžiagoms), palyginti su etaloniniais *in vivo* triušio akių bandymu duomenimis (B.5 bandymo metodas) (2) (14), klasifikuojamais pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą. 97 skystųjų agrocheminių mišinių bandymo EpiOcular™ EIT tyrimas parodė, kad metodo taikymo šio tipo mišiniams charakteristikos yra panašios į gautas atliekant patvirtinimo tyrimą (23). 97 mišiniai, klasifikuojami pagal etaloninius *in vivo* triušio akių bandymu duomenis (B.5 bandymo metodas) (2) (14), taikant JT GHS klasifikavimo sistemą, buvo paskirstyti taip: 1 kategorijos – 21, 2A kategorijos – 19, 2B kategorijos – 14 ir *Be kategorijos* – 43. Gautas bendrasis tikslumas yra 82 % (97 mišiniams), jautris – 91 % (54 mišiniams), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 9 % (54 mišiniams), specifiškumas – 72 % (43 mišiniams) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 28 % (43 mišiniams) (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT gali būti taikomas identifikuoti cheminėms medžiagoms, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą. Atsižvelgiant į patvirtinimo tyrimo duomenis (10) (11), SkinEthic™ HCE EIT gautas bendrasis tikslumas yra 84 % (200 cheminių medžiagų), jautris – 95 % (97 cheminėms medžiagoms), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 5 % (97 cheminėms medžiagoms), specifiškumas – 72 % (103 cheminėms medžiagoms) ir klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 28 % (103 cheminėms medžiagoms), palyginti su etaloniniais *in vivo* triušio akių bandymu duomenimis (B.5 bandymo metodas) (2) (14), klasifikuojamais pagal JT GHS ir CLP klasifikavimo sistemą.

16. Bendroji tikimybė, kad, atliekant medžiagų ir mišinių kartotinius RhCE bandymus, cheminės medžiagos bus klaidingai neigiamai identifikuotos kaip JT GHS ir CLP 2 kategorijos arba JT GHS ir CLP *Be kategorijos* pagal *in vivo Draize* akių bandymą yra mažesnė kaip 12 %; taip yra dėl metodui būdingo pakartojamumo (24). Pagal šiuos abu RhCE

metodus medžiagoms ar mišiniams gauta klaidingai teigiamų rezultatų dalis nėra labai svarbi, nes visas bandomąsias chemines medžiagas, kurioms gautas audinių gyvybingumas yra lygus arba mažesnis nei nustatytos ribinės vertės (žr. 44 pastraipą), reikės toliau bandyti pagal kitus *in vitro* bandymo metodus, arba, kaip paskutinį variantą, atliekant bandymą su triušiais, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų, įrodomosios duomenų galios metodui taikant nuosekliųjų bandymų strategiją. Šie bandymo metodai gali būti taikomi visų tipų cheminėms medžiagoms, kai neigiamą rezultatą reikėtų priimti kaip įrodymą, kad cheminės medžiagos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*). Reikėtų pasitarti su atitinkamomis reglamentuojančiomis institucijomis prieš taikant EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT pagal kitas nei JT GHS ir CLP klasifikavimo schemas.

17. Šio bandymo metodo ribotumas – jį taikant negalima atskirti akių dirginimą arba grįžtamąjį poveikį akims (2 kategorija) ir rimtą akių pažeidimą arba negrįžtamą poveikį akims (1 kategorija), kaip apibrėžta JT GHS ir CLP, arba akis dirginančias medžiagas (neprivaloma 2A kategorija) ir nestipriai akis dirginančias medžiagas (neprivaloma 2B kategorija), kaip apibrėžta JT GHS (1). Todėl teks papildomai bandyti taikant kitus *in vitro* bandymo metodus.

18. Šiame bandymo metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* ([2]) reiškia tai, kas yra bandoma, ir nėra susijęs su RhCE bandymo metodo tinkamumu bandyti medžiagas ir (arba) mišinius.

BANDYMO PRINCIPAS

19. Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant ne mažiau kaip dviejų trimačio RhCE audinio darinių ir, pasibaigus ekspozicijos bei inkubavimo po apdorojimo laikotarpiui, matuojamas gyvybingumas. RhCE audiniai rekonstruojami ir pirminių žmogaus epidermio keratinocitų arba iš imortalizuotų žmogaus ragenos epitelio ląstelių, kurios auginamos keletą dienų, kad susidarytų sluoksniuotas ir gerai diferencijuotas žvynuotas epitelis, morfologiškai panašus į žmogaus ragenos epitelį. EpiOcular™ RhCE audinio darinį sudaro ne mažiau kaip 3 gyvybingi ląstelių sluoksniai ir nesuragėjęs paviršius, turintis į rageną panašią struktūrą, analogišką randamai *in vivo*. SkinEthic™ HCE RhCE audinio darinį sudaro ne mažiau kaip 4 gyvybingi ląstelių sluoksniai, įskaitant cilindrines pagrindo ląsteles, tarpines dygliuotąsias ląsteles ir paviršines žvynuotas ląsteles, panašias į normalaus žmogaus ragenos epitelio ląsteles (20) (26).

20. Cheminių medžiagų sukeltas rimtas akių pažeidimas ir (arba) akių dirginimas, pasireiškiantis *in vivo* daugiausia kaip ragenos drumstumas, rainelės uždegimas, junginės paraudimas ir (arba) junginės chemozė, yra įvykių sekos, kurios pradžia yra cheminės medžiagos prasiskverbimas pro rageną ir (arba) junginę ir ląstelių pažeidimas, rezultatas. Yra keli ląstelių pažeidimo būdai: ląstelių membranos lizė (pvz., paviršinio aktyvumo medžiagomis, organiniais tirpikliais); makromolekulių koaguliacija (ypač baltymų) (pvz., paviršinio aktyvumo medžiagomis, organiniais tirpikliais, šarmais ir rūgštimis); lipidų muilinimas (pvz., šarmais); ir alkilinimas arba kitokia kovalentinė sąveika su makromolekulėmis (pvz., cheminiais balikliais, peroksidais ir alkilinimo agentais) (15) (27) (28). Bet yra įrodyta, kad citotoksiškumas vaidina svarbų, jei ne svarbiausią mechanizmo požiūriu vaidmenį nustatant bendrąjį rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo atsaką į cheminę medžiagą, nepriklausomai nuo audinio pažeidimą sukėlusių fizikinių ir cheminių procesų (29) (30). Be to, cheminės medžiagos rimto akių pažeidimo arba dirginimo potencialą daugiausia lemia pradinio sužeidimo laipsnis (31), kuris koreliuoja su ląstelių žūties laipsniu (29), su vėlesnių atsakų laipsniu ir galutiniais rezultatais (32). Taigi, silpnai dirginančios medžiagos paprastai veikia tik paviršinį ragenos epitelį, nestipriai ir vidutiniškai dirginančios medžiagos daugiausia pažeidžia epitelį ir paviršinę stromą, o stipriai dirginančios medžiagos pažeidžia epitelį, giliau esančią stromą ir kartais ragenos endotelį (30) (33). RhCE audinio darinio gyvybingumo po vietinio bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo matavimas, turint tikslą identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*), grindžiamas prielaida, kad visos cheminės medžiagos, sukeliančios rimtą akių pažeidimą arba akių dirginimą, sukeltų ragenos epitelio ir (arba) junginės citotoksiškumą.

([2]) 2013 m. birželio mėn. EBPO bendrajame posėdyje buvo sutarta, kad, jei įmanoma, terminas *bandomosios cheminės medžiagos*, apibūdinantis tai, kas yra bandoma, dabar turėtų būti vartojamas nuosekliau rengiant naujas ir atnaujintas EBPO bandymo gaires.

21. RhCE audinio gyvybingumas klasikiniu būdu matuojamas pagal gyvųjų audinių dažiklio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido, tiazolilo mėlynojo, tetrazolinio bromido, CAS Nr. 298-93-1), fermentinį virsmą veikiant audinio gyvybingoms ląstelėms į mėlynos spalvos MTT formazano druską, kiekybiškai nustatomą po ekstrakcijos iš audinių (16). Cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti pagal JT GHS ir CLP (*Be kategorijos*), identifikuojamos kaip medžiagos, nemažinančios audinio gyvybingumo iki mažesnės nei nustatyta slenkstinė vertė (t. y. audinio gyvybingumas > 60 %, EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EITL ([3]), arba > 50 %, SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (žr. 44 pastraipą).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

22. Prieš pradėdamos naudoti RhCE bandymus reglamentavimo tikslais įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, pateikdamos teisingą prognozę dėl kvalifikacijos įrodymui skirtų penkiolikos cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Šios cheminės medžiagos buvo pasirinktos iš cheminių medžiagų, naudotų atliekant PPM patvirtinimo tyrimus (8) (10) (11). Į rinkinį įtrauktos, kiek tai buvo įmanoma, medžiagos, kurios: i) aprėpia skirtingas agregatines būsenas; ii) aprėpia visą intervalą *in vivo* rimto akių pažeidimo arba akių dirginimo atsakų, pagrįstų aukštos kokybės rezultatais, gautais atliekant etaloninį *in vivo* triušio akių bandymą (B.5 bandymo metodas) (2) (14), ir taikant JT GHS klasifikavimo sistemą (t. y. 1, 2A, 2B kategorijos arba *Be kategorijos*) (1) ir CLP klasifikavimo sistemą (t. y. 1, 2 kategorijos arba *Be kategorijos*); iii) aprėpia įvairius *in vivo* klasifikavimą lemiančius rodiklius (24) (25); iv) atitinka cheminių medžiagų klases, naudotas atliekant patvirtinimo tyrimą (8) (10) (11); v) aprėpia daug tinkamų organinių funkcinių grupių (8) (10) (11); vi) turi tinkamai apibūdintą cheminę sandarą (8) (10) (11); vii) yra spalvotos ir (arba) tiesioginiai MTT reduktoriai; viii) joms buvo gauti atkuriami rezultatai, atliekant RhCE bandymo metodų patvirtinimą; ix) buvo gauta tinkama prognozė, atliekant RhCE bandymo metodų patvirtinimo tyrimus; x) aprėpia visą *in vitro* atsakų, pagrįstų aukštos kokybės RhCE bandymo metodų duomenimis (nuo 0 % iki 100 % gyvybingumo), intervalą; xi) yra prekyboje; ir vii) nėra susijusios su labai didelėmis įsigijimo ir (arba) šalinimo išlaidomis. Tais atvejais, kai sąraše nurodytos cheminės medžiagos nėra arba negali būti naudojama dėl kitų pagrįstų priežasčių, galėtų būti naudojama kita cheminė medžiaga, atitinkanti pirmiau aprašytus kriterijus, pvz., būtų PPM patvirtinimui naudota cheminė medžiaga. Tačiau tokie nukrypimai turėtų būti pagrįsti.

1 lentelė

Kvalifikacijai įrodyti skirtų cheminių medžiagų sąrašas

Cheminis pavadinimas	CASRN	Organinė funkcinė grupė ([1])	Agregatinė būsena	PPM1 gyvybingumas (%) ([2])	PPM2 gyvybingumas (%) ([3])	PPM prognozavimas	MTT reduktorius	Spalvos trukdžiai
***In vivo* 1 kategorija** ([4])								
Metiltioglikoliatas	2365-48-2	Karboksirūgšties esteris; tioalkoholis	L	10,9±6,4	5,5±7,4	Prognozės pateikti negalima	Y (stiprus)	N
Hidroksietilakrilatas	818-61-1	Akrilatas; Alkoholis	L	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Prognozės pateikti negalima	N	N
2,5-dimetil-2,5-heksandiolis	110-03-2	Alkoholis	S	2,3±0,2	0,2±0,1	Prognozės pateikti negalima	N	N
Natrio oksalatas	62-76-0	Oksokarboksirūgštis	S	29,0±1,2	5,3±4,1	Prognozės pateikti negalima	N	N
In vivo 2A kategorija ([4])								
2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamidas, N,N″-bis(4-chlorfenil)-3,12-diimino-di-D-gliukonatas (20 %, vandeninis) ([6])	18472-51-0	Aromatinis heterociklinis halogenidas; arilhalogenidas; dihidroksilo grupė; guanidinas	L	4,0±1,1	1,3±0,6	Prognozės pateikti negalima	N	Y (silpni)

([3]) EITL: EIT skysčių naudojant SkinEthic™ HCE.
([4]) EITS: EIT kietųjų medžiagų naudojant SkinEthic™ HCE.

Cheminis pavadinimas	CASRN	Organinė funkcinė grupė (1)	Agregatinė būsena	PPM1 gyvybingumas (%) (2)	PPM2 gyvybingumas (%) (3)	PPM prognozavimas	MTT reduktorius	Spalvos trukdžiai
Natrio benzoatas	532-32-1	Arilas; Karboksirūgštis	S	3,5±2,6	0,6±0,1	Prognozės pateikti negalima	N	N
***In vivo* 2B kategorija** (4)								
Dietiltoluamidas	134-62-3	Benzamidas	L	15,6±6,3	2,8±0,9	Prognozės pateikti negalima	N	N
2,2-dimetil-3-metilenbiciklo [2,2,1] heptanas	79-92-5	Alkanas, šakotasis su tretiniu anglies atomu; alkenas; bicikloheptanas; žiediniai karbocikliniai junginiai su vidiniu tilteliu; cikloalkanas	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Prognozės pateikti negalima	N	N
***In vivo Be* kategorijos** (4)								
1-etil-3-metilimidazolinio etilsulfatas	342573-75-5	Alkoksi; amonio druska; arilas; imidazolas; sulfatas	L	79,9±6,4	79,4±6,2	*Be kategorijos*	N	N
Dikaprilileteris	629-82-3	Alkoksi; eteris	L	97,8±4,3	95,2±3,0	*Be kategorijos*	N	N
Piperonilbutoksidas	51-03-6	Alkoksi; benzdioksolas; benzilas; eteris	L	104,2±4,2	96,5±3,5	*Be kategorijos*	N	N
Ricinos aliejus, hidrintas, etoksilintas polietilenglikoliu (PEG-40)	61788-85-0	Acilalis; alkoholis; alilas; eteris	Klampi	77,6±5,4	89,1±2,9	*Be kategorijos*	N	N
1-(4-chlorfenil)-3-(3,4-dichlorfenil)karbamidas	101-20-2	Aromatinis heterociklinis halogenidas; arilhalogenidas; karbamido dariniai	S	106,7±5,3	101,9±6,6	*Be kategorijos*	N	N
2,2′-metilen-bis(6-(2H-benztriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenolis	103597-45-1	Alkanas, šakotasis su ketvirtiniu anglies atomu; kondensuotieji aromatiniai junginiai; kondensuotieji sotieji heterocikliniai junginiai; chinono junginių pirmtakai; *tret*-butilas	S	102,7±13,4	97,7±5,6	*Be kategorijos*	N	N

Cheminis pavadinimas	CASRN	Organinė funkcinė grupė (1)	Agregatinė būsena	PPM1 gyvybingumas (%) (2)	PPM2 gyvybingumas (%) (3)	PPM prognozavimas	MTT reduktorius	Spalvos trukdžiai
Kalio tetrafluorboratas	14075-53-7	Neorganinė druska	S	88,6±3,3	92,9±5,1	*Be kategorijos*	N	N

Santrumpos:

CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris; JT GHS – Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) (1); PPM1 – patvirtintas pamatinis metodas EpiOcular™ EIT; PPM2 – patvirtintas pamatinis metodas SkinEthic™ HCE EIT; Spalvos trukdžiai – spalvos trukdžiai atliekant standartinį MTT formazano optinio tankio (OT) matavimą.

(1) Organinė funkcinė grupė priskirta pagal EBPO taikomųjų programų 3.1 versijos hierarchinę analizę (8).

(2) Pagal rezultatus, gautus EpiOcular™ EIT atliekant EURL ECVAM/*Cosmetics Europe* akių dirginimo patvirtinimo tyrimą (EIVS) (8).

(3) Pagal rezultatus, gautus SkinEthic™ HCE EIT atliekant patvirtinimo tyrimą (10) (11).

(4) Pagal rezultatus, gautus atliekant *in vivo* triušio akių bandymą (TM B.5/EBPO TG 405) (2) (14) ir taikant JT GHS.

(5) Pagal rezultatus, gautus CEFIC konsorciume dėl *in vitro* akių dirginimo bandymo strategijos (CON4EI) tyrimo.

(6) Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviem kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 dieną 1 iš 3 gyvūnų palyginti su 2 iš 3 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. Atliekant *in vivo* tyrimą, buvo naudojami 3 gyvūnai. Visos vertinamosios baigtys, išskyrus vieno gyvūno ragenos drumstumą, grįžo prie nulinių verčių 7 dieną arba anksčiau. Vieno gyvūno 1 balo ragenos drumstumas nevisiškai išnyko (7 dieną), bet visiškai išnyko 9 dieną.

23. Atliekant kvalifikacijos įrodymo bandymus, naudotojams taip pat rekomenduojama patikrinti po audinių gavimo jų apsaugines savybes, nurodytas RhCE audinio darinio gamintojo (žr. 25, 27 ir 30 pastraipas). Tai ypač svarbu, jei audiniai gabenami dideliais atstumais ir (arba) ilgą laiką. Kai bandymas sėkmingai parengtas ir jo atlikimo kvalifikacija įgyta bei įrodyta, vėliau tokio tikrinimo reguliariai daryti nebūtina. Tačiau, jei bandymas atliekamas nuolat, apsaugines savybes rekomenduojama ir toliau vertinti reguliariais laiko tarpais.

PROCEDŪRA

24. Į šį bandymo metodą šiuo metu įtraukti bandymo metodai yra moksliškai pagrįsti EpiOcular™ EIT ir SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), kurie nurodyti kaip patvirtinti pamatiniai metodai (PPM1 ir PPM2). Yra RhCE bandymo metodų standartinės veiklos procedūros, kurias reikėtų naudoti, įdiegiant ir taikant bandymo metodus laboratorijoje (34) (35). Kitose pastraipose ir 2 priedėlyje apibūdinami pagrindiniai RhCE bandymų komponentai ir procedūros.

RHCE BANDYMO METODO KOMPONENTAI

Bendrosios sąlygos

25. Atitinkamos iš žmogaus gautos ląstelės turėtų būti naudojamos rekonstruojant ragenos savybių epitelio trimatį audinį, kurį sudarytų tolygiai sluoksniuotos, bet nesuragėjusios ląstelės. RhCE audinio darinys ruošiamas įdėkluose su akytąja sintetine membrana, per kurią maisto medžiagos gali patekti prie ląstelių. Rekonstruotą ragenos savybių epitelį turėtų sudaryti daug nesuragėjusių gyvųjų ląstelių sluoksnių. RhCE audinio darinio epitelinis paviršius turėtų tiesiogiai liestis su oru, kad bandomąsias chemines medžiagas būtų galima tiesiogiai uždėti vietoje taip, kaip ragenos epitelis būtų veikiamas *in vivo*. RhCE audinio darinys turėtų sudaryti patvarų veiksmingą barjerą, kuris būtų atsparus citotoksinių palyginamųjų medžiagų, pvz., Triton X-100 arba natrio dodecilsulfato (SDS), greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija turėtų būti įrodyta ir gali būti įvertinta nustatant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamosios medžiagos (pvz., 100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100) ekspozicijos trukmę, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET_{50}), arba nustatant koncentraciją, kuriai esant palyginamoji cheminė medžiaga per tam tikrą ekspozicijos laiką (pvz., 30 min po apdorojimo 50 µl SDS) sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC_{50}) (žr. 30 pastraipą). RhCE audinio darinio sulaikymo savybės turėtų apsaugoti nuo bandomosios cheminės medžiagos patekimo apeinant gyvojo audinio kraštą, dėl ko būtų blogai modeliuojama ragenos ekspozicija. RhCE audinio dariniui sukurti naudojamos iš žmogaus gautos ląstelės neturėtų būti užkrėstos bakterijomis, virusais, mikoplazmomis ir grybeliais. Audinio darinio sterilumą turėtų tikrinti tiekėjas, ar jis nėra užkrėstas grybeliais ir bakterijomis.

Veikimo sąlygos

Gyvybingumas

26. Kiekybinio audinių gyvybingumo nustatymo bandymas yra MTT bandymas (16). Gyvybingos RhCE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas, kurios ekstrahuojamos iš audinio izopropanoliu (arba panašiu tirpikliu). Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (36). Ekstrahavimui naudojamo tirpiklio OT turėtų būti pakankamai mažas, t. y. OT < 0,1. RhCE audinio darinio naudotojai turėtų užtikrinti, kad kiekviena naudoto RhCE audinio darinio partija atitiktų neigiamiems kontroliniams ėminiams nustatytus kriterijus. PPM neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalai pateikti 2 lentelėje. Taikantys

HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos metodą, turėtų naudoti 2 lentelėje pateiktų neigiamų kontrolinių ėminių OT intervalus kaip neigiamo kontrolinio ėminio priimtinumo kriterijų. Ataskaitoje reikėtų dokumentuoti, kad neigiamu kontroliniu ėminiu apdorotų audinių kultūra yra stabili (gaunami panašūs gyvybingumo matavimo rezultatai) visą ekspozicijos laikotarpį. Panašios procedūros, kaip partijos išleidimo kokybės kontrolės dalies, turėtų laikytis audinio gamintojas, tačiau tokiu atveju gali būti taikomi kiti nei 2 lentelėje nurodyti priimtinumo kriterijai. Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) (kokybės kontrolės bandymo metodo sąlygomis) turėtų nustatyti RhCE audinio darinio kūrėjas arba tiekėjas.

2 lentelė

Neigiamų kontrolinių ėminių OT verčių priimtinumo intervalai (bandymo naudotojams)

Bandymas	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – PPM1 (skysčių ir kietųjų medžiagų protokolų)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – PPM2 (skysčių ir kietųjų medžiagų protokolų)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Taikant šią priimtinumo ribą, atsižvelgta į tai, kad gali būti ilgesnė gabenimo ir (arba) laikymo trukmė (pvz., > 4 dienas), kuri, kaip buvo įrodyta, neturi įtakos bandymo metodo taikymo charakteristikoms (37).

Apsauginė funkcija

27. RhCE audinio darinys turėtų būti pakankamai storas ir tvirtas, kad galėtų atsispirti sparčiam citotoksinių palyginamųjų medžiagų prasiskverbimui, įvertinamam, pvz., kaip ET_{50} (Triton X-100) arba IC_{50} (SDS) (3 lentelė). Kiekvienos naudojamo RhCE audinio darinio partijos apsauginę funkciją turėtų įrodyti RhCE audinio darinio kūrėjas arba pardavėjas, kai audiniai tiekiami galutiniam naudotojui (žr. 30 pastraipą).

Morfologija

28. RhCE audinio darinio histologinis tyrimas turėtų įrodyti žmogaus ragenos savybių epitelio struktūrą (įskaitant ne mažiau kaip 3 sluoksnius gyvųjų epitelio ląstelių ir nesuragėjusį paviršių). Reikiamą morfologiją nustato kūrėjas ir (arba) tiekėjas dėl PPM, todėl bandymo metodo naudotojui jos nereikia pakartotinai nustatyti kiekvienai naudojamai audinio partijai.

Atkuriamumas

29. Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių rezultatai taikant bandymo metodą turėtų įrodyti atkuriamumą per ilgą laiką.

Kokybės kontrolė

30. RhCE audinio darinys turėtų būti naudojamas tik tokiu atveju, jei kūrėjas arba tiekėjas įrodo, kad kiekviena naudojamo RhCE audinio darinio partija atitinka nustatytus gaminių išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra gyvybingumo (26 pastraipa) ir apsauginės funkcijos (žr. 27 pastraipą) kriterijai. Apsauginių funkcijų, matuojamų kaip ET_{50} arba IC_{50}, priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) (žr. 25 ir 26 pastraipas) turėtų nustatyti RhCE audinio darinio kūrėjas arba tiekėjas. ET_{50} ir IC_{50} priimtinumo intervalas, kurį RhCE audinio darinių (naudotų PPM) kūrėjas ir (arba) tiekėjas naudoja kaip partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijų, pateiktas 3 lentelėje. RhCE audinio darinio kūrėjas ir (arba) tiekėjas turėtų pateikti bandymo metodo naudotojams duomenis, kurie įrodytų atitiktį visiems gaminių išleidimo kriterijams, kad šią informaciją jie galėtų įtraukti į bandymo ataskaitą. Siekiant patikimai prognozuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo pagal JT GHS ir CLP, gali būti priimti tik tie rezultatai, kurie buvo gauti naudojant audinius, atitinkančius visus šiuos gaminio išleidimo kriterijus.

3 lentelė

Partijos išleidimo kokybės kontrolės kriterijai

Bandymas	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – PPM1 (100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – PPM2 (30 min apdorojimas 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų uždėjimas

31. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kiekvienai kontrolinei medžiagai reikėtų naudoti ne mažiau kaip du kartotinius audinio bandinius. Skystosioms ir kietosioms bandomosioms cheminėms medžiagoms naudojami skirtingi apdorojimo protokolai (34) (35).Taikant abu metodus ir protokolus, audinio darinio paviršius turėtų būti suvilgytas prieš bandomųjų cheminių medžiagų uždėjimą kalcio ir magnio jonų neturinčiu Dulbecco fiziologiniu tirpalu fosfatiniame buferiniame tirpale (Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčiu DPBS), kad būtų galima atkartoti žmogaus akies drėgmės sąlygas. Audinių apdorojimas pradedamas nuo veikimo bandomąja (-osiomis) chemine (-ėmis) medžiaga (-omis) ir kontrolinėmis medžiagomis. Pagal abiejų PPM abu apdorojimo protokolus reikėtų uždėti bandomosios cheminės medžiagos arba kontrolinės medžiagos kiekį, kurio pakaktų epidermio paviršiui tolygiai padengti, bet vengiant neribotos dozės (žr. 32 ir 33 pastraipas) (2 priedėlis).

32. Bandomosios cheminės medžiagos, kurias galima lašinti pipete 37 °C arba žemesnėje temperatūroje (jei reikia, stūmokline pipete), taikant PPM apdorojamos kaip skysčiai, kitais atvejais jas reikėtų apdoroti kaip kietąsias medžiagas (žr. 33 pastraipą). Taikant PPM, skysta bandomoji cheminė medžiaga tolygiai paskleidžiama audinio paviršiuje (t. y. užlašinama ne mažiau kaip 60 µl/cm^2) (žr. 2 priedėlį (33) (34)). Kapiliarinių reiškinių (paviršiaus įtempties reiškinių), galinčių pasitaikyti dėl mažo į įdėklą (ant audinio paviršiaus) lašinamo tūrio reikėtų kiek įmanoma vengti, kad būtų galima užtikrinti tinkamą audinio dozavimą. Skystomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdoroti audiniai inkubuojami 30 min standartinėmis auginimo sąlygomis, esant (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, skysta bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos turėtų būti kruopščiai pašalintos nuo audinio paviršiaus, skalaujant dideliu Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčiu DPBS kiekiu kambario temperatūroje. Po šio skalavimo veiksmo – poekspozicinis laikymas šviežioje terpėje kambario temperatūroje (kad būtų pašalinta visa audiniu absorbuota bandomoji cheminė medžiaga) iš anksto nustatytą laiko tarpą, kuris skiriasi priklausomai nuo taikomo PPM. Poekspozicinis inkubavimas šviežioje terpėje standartinėmis auginimo sąlygomis prieš atliekant MTT bandymą taikomas tik VMR1 (žr. 2 priedėlį (34) (35)).

33. Bandomosios cheminės medžiagos, kurių negalima lašinti pipete žemesnėje kaip 37 °C temperatūroje, taikant PPM apdorojamos kaip kietosios medžiagos. Uždedamos bandomosios cheminės medžiagos kiekio turėtų pakakti visam audinio paviršiui padengti, t. y. reikėtų uždėti ne mažiau kaip 60 mg/cm^2 (2 priedėlis). Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Kietosiomis bandomosiomis medžiagomis apdoroti audiniai nustatytą laiko tarpą (priklausomai nuo taikomo PPM) inkubuojami standartinėmis auginimo sąlygomis (žr. 2 priedėlį (34) (35)). Pasibaigus ekspozicijos laikotarpiui, skystoji bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos turėtų būti kruopščiai pašalintos nuo audinio paviršiaus, skalaujant dideliu Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčiu DPBS kiekiu kambario temperatūroje. Prieš atliekant MTT bandymą, po šio skalavimo veiksmo – poekspozicinis laikymas šviežioje terpėje kambario temperatūroje (kad būtų pašalinta visa audiniu absorbuota bandomoji cheminė medžiaga) iš anksto nustatytą laiko tarpą, kuris skiriasi priklausomai nuo taikomo PPM, ir poekspozicinis inkubavimas šviežioje terpėje standartinėmis auginimo sąlygomis (žr. 2 priedėlį (34) (35)).

34. Į kiekvieną atskirą bandymą reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus ir teigiamus kontrolinius ėminius, siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (nustatomas pagal neigiamą kontrolinį ėminį) ir jautris (nustatomas pagal teigiamą kontrolinį ėminį) atitinka nustatytus priimtinumo intervalus, pagrįstus istoriniais duomenimis. Pagal neigiamą kontrolinį ėminį taip pat nustatoma atskaitos linija (100 % audinio gyvybingumas), kad būtų galima apskaičiuoti bandomąja chemine medžiaga apdoroto audinio santykinio gyvybingumo procentinę dalį (% gyvybingumo$_{test}$). Rekomenduojama teigiama kontrolinė medžiaga, kurią reikia naudoti taikant PPM, yra grynas metilacetatas (CAS Nr. 79-20-9, galima pirkti iš, pvz., Sigma-Aldrich, kat. Nr. 45997; skystis). Rekomenduojamos neigiamos kontrolinės medžiagos, kurias reikia naudoti taikant PPM1 ir PPM2 yra ypač grynas H_2O ir Ca^{2+}/Mg^{2+} neturintis DPBS. Tai buvo PPM patvirtinimo tyrimams naudotos medžiagos, kurioms yra sukaupta daugiausia istorinių duomenų. Tinkamų alternatyvių teigiamų arba neigiamų kontrolinių medžiagų naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas reikiamu būdu. Neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti bandomos pagal tą (tuos) patį (-ius) protokolą (-us), naudojamą į atskirą bandymą įtrauktoms bandomosioms cheminėms medžiagoms (t. y. skysčiams ir (arba) kietosioms medžiagoms). Po uždėjimo turėtų vykti apdorojamoji ekspozicija, skalavimas, poekspozicinis laikymas terpėje, poekspozicinis inkubavimas terpėje, jei tinka, kaip aprašyta kontroliniams ėminiams, bandomiems vienu metu su skystosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (žr. 32 pastraipą) arba kontroliniams ėminiams, bandomiems vienu metu su kietosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (žr. 33 pastraipą), prieš atliekant MTT bandymą (žr. 35 pastraipą) (34) (35). Vieno neigiamų ir teigiamų kontrolinių medžiagų rinkinio pakanka visoms vienos agregatinės būsenos bandomosioms cheminėms medžiagoms (skysčiams ar kietosioms medžiagoms), įtrauktoms į tą patį atskirą bandymą.

Audinių gyvybingumo matavimai

35. MTT bandymas yra standartizuotas kiekybinis metodas (16), kuris turėtų būti taikomas audinių gyvybingumui matuoti pagal šį bandymo metodą. Jis yra suderinamas su trimačiu audinio dariniu. MTT bandymas atliekamas iš karto pasibaigus poekspozicinio inkubavimo laikotarpiui. Taikant PPM, RhCE audinio darinio ėminys 180±15 min dedamas į 0,3 ml 1 mg/ml koncentracijos MTT tirpalo standartinėmis auginimo sąlygomis. Gyvybingos RhCE audinio darinio ląstelės redukuoja gyvųjų audinių dažiklį MTT į mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdas. Iškritusios mėlynos spalvos MTT formazano nuosėdos ekstrahuojamos iš audinio reikiamu izopropanolio (arba panašaus tirpiklio) tūriu (34) (35). Iš skystomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdorotų audinių reikėtų ekstrahuoti iš audinio viršaus ir apačios, o iš kietomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis ir spalvotais skysčiais apdorotų audinių – tik iš audinio apačios (kad būtų kuo mažesnė tikimybė užteršti izopropanolinį ekstrahavimo tirpalą bandomąja chemine medžiaga, kuri galbūt liko ant audinio). Sunkiai nuplaunamomis skystomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis apdoroti audiniai taip pat gali būti ekstrahuojami tik iš audinio apačios. Vienu metu bandomos neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti apdorojamos panašiai kaip bandomoji cheminė medžiaga. Ekstrahuotas MTT formazanas gali būti kiekybiškai nustatytas atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą, bangos ilgis – 570 nm, filtro juostos plotis – ne didesnis kaip ±30 nm, arba HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 42 pastraipą) (11) (36).

36. Bandomosios cheminės medžiagos optinės savybės arba jos cheminė sąveika su MTT gali trukdyti matuoti MTT formazaną, gaunant klaidingą gyvybingumo įvertį. Bandomosios cheminės medžiagos gali trukdyti matuoti MTT formazaną, tiesiogiai redukuodamos MTT į mėlynos spalvos formazaną, ir (arba) dėl spalvos trukdžių, jei bandomoji cheminė medžiaga natūraliai arba dėl apdorojimo procedūrų absorbuoja šviesą formazano optinio tankio nustatymo srityje (t. y. maždaug 570 nm). Pradiniai tikrinimai turėtų būti atliekami prieš bandymą, kad būtų galima identifikuoti galimus tiesioginius MTT reduktorius ir (arba) spalvos trukdžius sukeliančias chemines medžiagas, ir reikėtų naudoti papildomus kontrolinius ėminius, kad būtų galima aptikti ir koreguoti galimus tokių bandomųjų cheminių medžiagų trukdžius (žr. 37–41 pastraipą). Tai ypač svarbu, kai konkreti bandomoji cheminė medžiaga ne visiškai pašalinama iš RhCE audinio darinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į ragenos savybių epitelį, todėl jos yra RhCE audinio dariniuose atliekant MTT bandymą. Jei bandomųjų cheminių medžiagų šviesos absorbcijos sritis (natūraliai arba po apdorojimo) sutampa su MTT formazano ir jos yra nesuderinamos su MTT formazano standartiniu optinio tankio (OT) matavimu dėl per didelių trukdžių, t. y. didelės absorbcijos 570±30 nm srityje, MTT formazaną galima matuoti naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą (žr. 41 ir 42 pastraipą) (11) (36). Tiesioginės MTT redukcijos ir spalvotų medžiagų trukdžių aptikimo ir koregavimo išsamus aprašymas pateiktas PPM SVP (34) (35). Tiesioginių MTT reduktorių ir (arba) spalvos trukdžius sukeliančių cheminių medžiagų identifikavimo ir tvarkymo rekomendacijų aiškinimo schemos, skirtos PPM1 ir PPM2, pateiktos III ir IV priedėliuose.

37. Siekiant nustatyti galimus trukdžius, kuriuos kelia spalvotos bandomosios cheminės medžiagos (natūralios arba po apdorojimo), absorbuojančios šviesą MTT formazano absorbcijos srityje, ir nuspręsti, ar būtini papildomi kontroliniai ėminiai, bandomoji cheminė medžiaga dedama į vandenį ir (arba) į izopropanolį ir inkubuojama reikiamą laiką kambario temperatūroje (žr. 2 priedėlį, (34) (35)). Jei PPM1 atveju vandenyje ir (arba) izopropanolyje ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga gana stipriai absorbuoja šviesą 570±20 nm srityje (žr. 3 priedėlį), arba jei PPM2 atveju sumaišius bandomąją cheminę medžiagą su vandeniu susidaro spalvotas tirpalas (žr. 4 priedėlį), daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga trukdo atlikti standartinį MTT formazano optinio tankio (OT) matavimą, todėl reikėtų atlikti papildomus spalvotų kontrolinių ėminių bandymus arba naudoti HPLC ar UPLC ir spektrofotometrijos procedūrą, ir tokiu atveju šių kontrolinių ėminių nereikia (žr. 41 ir 42 pastraipą bei III ir IV priedėlius) (34) (35). Kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas, kiekviena trukdžius kelianti bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti dedama ant ne mažiau kaip dviejų gyvųjų audinių kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoj MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje, kad būtų gautas nespecifinės spalvos (NSS_{gyv}) kontrolinis ėminys (34) (35). Jei bandoma spalvota bandomoji cheminė medžiaga, turi būti atliekamas vienalaikis NSS_{gyv} kontrolinis bandymas ir kartotinių bandymų atveju atliekant kiekvieną bandymą (kiekvieną atskirą bandymą) turi būti atliekamas nepriklausomas NSS_{gyv} kontrolinis bandymas dėl gyviesiems audiniams būdingos biologinės įvairovės. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams ir inkubuotiems MTT tirpale (% $gyvybingumo_{test}$) minus nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir bandomiems vienu metu su koreguojamu bandymu (% NSS_{gyv}), t. y. tikrasis audinių gyvybingumas = (% $gyvybingumo_{test}$) − (% NSS_{gyv}).

38. Kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą reikėtų įdėti į tik ką paruoštą MTT tirpalą, kad būtų galima identifikuoti tiesioginius MTT reduktorius. Reikiamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis dedamas į MTT tirpalą ir mišinys inkubuojamas maždaug 3 h standartinėmis auginimo sąlygomis (žr. III ir IV priedėlį) (34) (35). Jei MTT mišinys, kuriame yra bandomoji cheminė medžiaga (arba netirpių bandomųjų cheminių medžiagų suspensija), nusidažo mėlyna arba violetine spalva, daroma prielaida, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT ir reikėtų atlikti papildomą veikimo tikrinimą su negyvais RhCE audinio dariniais, nepriklausomai nuo to, ar naudojama standartinė optinio tankio (OT) matavimo, ar HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos procedūra. Šiam papildomam veikimo tikrinimui naudojami negyvi audiniai, kurie turi tik liekamąjį metabolinį aktyvumą, bet absorbuoja ir sulaiko bandomąją cheminę medžiagą panašiai kaip gyvieji audiniai. Negyvi PPM1 audiniai ruošiami laikant žemoje temperatūroje („šaltyje žuvę“). Negyvi PPM2 audiniai ruošiami juos ilgą laiką (pvz., ne mažiau kaip 24±1 h) inkubuojant vandenyje ir vėliau laikant žemoje temperatūroje („vandenyje žuvę“). Kiekviena MTT redukuojanti bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvų ląstelių kartotinių bandinių, kuriems atliekama visa bandymo procedūra, kad būtų gautas nespecifinės MTT redukcijos (NSMTT) kontrolinis ėminys (34) (35). Pakanka vieno NSMTT kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta MTT reduktoriaus veikiamiems gyviesiems audiniams (% $gyvybingumo_{test}$), minus nespecifinės MTT redukcijos procentinė vertė, gauta to paties MTT reduktoriaus veikiamiems negyviems audiniams ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSMTT), t. y. tikrasis audinio gyvybingumas = (% $gyvybingumo_{test}$) − (% NSMTT).

39. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios identifikuojamos kaip keliančios spalvos trukdžius (žr. 37 pastraipą) ir yra tiesioginiai MTT reduktoriai (žr. 38 pastraipą), be NSMTT ir NSS_{gyv} kontrolinių ėminių, aprašytų pirmiau pateiktose pastraipose, reikės trečiojo kontrolinių ėminių rinkinio, kai atliekamas standartinis optinio tankio (OT) matavimas. Paprastai atlikti MTT bandymą trukdo tamsios spalvos (pvz., mėlynos, violetinės, juodos) bandomosios cheminės medžiagos, absorbuojančios šviesą 570±30 nm srityje, nes jų pačių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 38 pastraipoje. Tai verčia naudoti NSMTT kontrolinius ėminius kaip numatytuosius ėminius kartu su NSS_{gyv} kontroliniais ėminiais. Bandomąsias chemines medžiagas, kurioms atliekami NSMTT ir NSS_{gyv} kontroliniai bandymai, gali absorbuoti ir sulaikyti gyvieji ir negyvi audiniai. Todėl šiuo atveju naudojant NSMTT kontrolinį ėminį gali būti koreguojama ne tik galima tiesioginė MTT redukcija, bet ir spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos absorbcijos ir sulaikymo ant negyvų audinių. Tai galėtų būti dvigubas spalvos trukdžių koregavimas, nes atliekant NSS_{gyv} kontrolinį bandymą jau koreguojami spalvos trukdžiai dėl bandomosios cheminės medžiagos absorbcijos ir sulaikymo gyvaisiais audiniais. Siekiant išvengti galimo dvigubo

spalvos trukdžių koregavimo, reikia atlikti trečiąjį negyvų audinių nespecifinės spalvos (NSS_{negyv}) kontrolinį bandymą (žr. III ir IV priedėlius) (34) (35). Naudojant šį papildomą kontrolinį ėminį, bandomoji cheminė medžiaga dedama ant ne mažiau kaip dviejų negyvo audinio kartotinių bandinių, su kuriais atliekama visa bandymo procedūra, bet MTT inkubavimo pakopoje vietoje MTT tirpalo jie inkubuojami terpėje. Pakanka vieno NSS_{negyv} kontrolinio bandymo vienai bandomajai cheminei medžiagai, neatsižvelgiant į atliekamų nepriklausomų bandymų ir (arba) atskirų bandymų skaičių, bet jis turėtų būti atliekamas vienu metu su NSMTT kontroliniu bandymu ir su ta pačia audinio partija. Tikrasis audinio gyvybingumas apskaičiuojamas kaip audinių gyvybingumo procentinė vertė, gauta bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems gyviesiems audiniams (% $gyvybingumo_{test}$) minus % NSMTT minus % NSS_{gyv}plius nespecifinės spalvos procentinė vertė, gauta trukdančios bandomosios cheminės medžiagos veikiamiems negyviems audiniams, inkubuotiems terpėje be MTT, ir apskaičiuota vienu metu su koreguojamu bandymu bandomo neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu (% NSS_{negyv}), t. y. tikrasis audinio gyvybingumas = (% $gyvybingumo_{test}$) − (% NSMTT) − (% NSS_{gyv}) + (% NSS_{negyv}).

40. Svarbu pažymėti, kad audinio ekstraktui gautas OT (atliekant standartinius optinio tankio matavimus) dėl nespecifinės MTT redukcijos ir nespecifinės spalvos trukdžių gali būti didesnis nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas ir kad audinio ekstrakto MTT formazano smailės plotas (atliekant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos matavimus) dėl nespecifinės MTT redukcijos taip pat gali būti didesnis nei spektrofotometro tiesiškumo intervalas. Atsižvelgiant į tai yra svarbu, kad, prieš pradėdama bandyti bandomąsias chemines medžiagas reglamentavimo tikslais, kiekviena laboratorija nustatytų savo spektrofotometro OT arba smailės ploto tiesiškumo intervalą pagal, pvz., MTT formazaną (CAS Nr. 57360-69-7), kurį galima pirkti iš, pvz., Sigma-Aldrich (kat. Nr. M2003).

41. Atliekant standartinį optinio tankio (OT) matavimą spektrofotometru, galima įvertinti tiesioginius MTT reduktorius ir spalvos trukdžius sukeliančias bandomąsias chemines medžiagas, jei stebimi MTT formazano matavimo trukdžiai nėra labai dideli (t. y. audinių ekstraktų OT, gauti bandomajai cheminei medžiagai be koregavimo dėl tiesioginės MTT redukcijos ir (arba) spalvos trukdžių, yra spektrofotometro tiesiškumo intervale). Vis dėlto, į bandomosioms cheminėms medžiagoms gautus neigiamų kontrolinių ėminių % NSMTT ir (arba) % NSS_{gyv} ≥ 60 % (PPM1 ir PPM2 skysčių protokolo) arba 50 % (PPM2 kietųjų medžiagų protokolo) reikėtų žiūrėti atsargiai, nes tai yra PPM ribinės vertės, pagal kurias atskiriamos klasifikuojamos ir neklasifikuojamo cheminės medžiagos (žr. 44 pastraipą). Tačiau standartinis optinis tankis (OT) gali nebūti išmatuotas, kai MTT formazano matavimo trukdžiai yra labai dideli (t. y. gaunami nekoreguoti bandymo audinio ekstraktų OT, nepatenkantys į spektrofotometro tiesiškumo intervalą). Spalvotas bandomąsias chemines medžiagas arba tapusias spalvotomis dėl sąlyčio su vandeniu ar izopropanoliu, kurios kelia didelius trukdžius atliekant standartinį MTT formazano optinio tankio (OT) matavimą, visgi galima įvertinti naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją (žr. III ir IV priedėlį). Taip yra todėl, kad naudojant HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemą, MTT formazaną galima atskirti nuo bandomosios cheminės medžiagos prieš jo kiekybinį nustatymą (36). Dėl šios priežasties NSS_{gyv} arba NSS_{negyv} kontrolinių ėminių niekuomet nereikia, kai naudojama HPLC/UPLC ir spektrofotmetrija, nepriklausomai nuo bandomos cheminės medžiagos. Vis dėlto NSMTT kontrolinius ėminius reikėtų naudoti, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai redukuoja MTT (pagal 38 pastraipoje aprašytą procedūrą). NSMTT kontrolinius ėminius taip pat reikėtų naudoti spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagos (spalvotoms natūraliai arba dėl sąlyčio su vandeniu), kurių spalva trukdo įvertinti jų gebėjimą tiesiogiai redukuoti MTT, kaip aprašyta 38 pastraipoje. Jei MTT formazanui matuoti naudojama HPLC arba UPLC ir spektrofotometrija, audinio gyvybingumo procentinė dalis skaičiuojama kaip MTT formazano smailės ploto, gauto bandomąja chemine medžiaga veikiamiems gyviesiems audiniams, ir MTT formazano smailės ploto, gauto vienalaikiam neigiamam kontroliniam ėminiui, procentais išreikštas santykis. Jei bandomosios cheminės medžiagos gali tiesiogiai redukuoti MTT, tikrasis audinių gyvybingumas apskaičiuojamas kaip % $gyvybingumo_{test}$minus % NSMTT, kaip aprašyta 38 pastraipos paskutiniame sakinyje. Pagaliau reikėtų pažymėti, kad RhCE bandymo metodais negalima vertinti tiesioginių MTT reduktorių, kurie taip pat gali kelti spalvos trukdžius ir kurie po apdorojimo lieka audiniuose ir taip stipriai redukuoja MTT, kad gauti bandomų audinių ekstraktų OT (atliekant standartinį OT matavimą) arba smailių plotai (naudojant UPLC arba HPLC ir spektrofotometriją) nepatenka į spektrofotometro tiesiškumo intervalą, nors tikimasi, kad tai būtų tik labai retas reiškinys.

42. HPLC arba UPLC ir spektrofotometriją MTT formazano matavimams galima naudoti visų tipų bandomosioms cheminėms medžiagoms (spalvotoms, nespalvotoms, MTT reduktoriams ir ne reduktoriams) (11) (36). Dėl HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemų įvairovės kiekvienam naudotojui nėra įmanoma nustatyti tiksliai tokias pačias sistemos sąlygas. HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos tinkamumą reikėtų įrodyti prieš pradedant sistemą naudoti audinių ekstraktų MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir ji turi atitikti standartinių tinkamumo parametrų rinkinio priimtinumo kriterijus, pagrįstus aprašytais JAV maisto ir vaistų administracijos rekomendacijose pramonei dėl biologinės analizės metodo patvirtinimo (36) (38). Šie pagrindiniai parametrai ir priimtinumo kriterijai patekti 5 priedėlyje. Jei HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistema atitinka 5 priedėlyje nustatytus priimtinumo kriterijus, ji laikoma tinkama ir paruošta MTT formazanui matuoti šiame bandymo metode aprašytomis bandymo sąlygomis.

Priimtinumo kriterijai

43. Atliekant kiekvieną atskirą bandymą, naudojantį kokybės kontrolę atitinkančias RhCE audinių partijas (žr. 30 pastraipą), neigiama kontroline medžiaga apdorotiems ėminiams turėtų būti gautos OT vertės, rodančios audinių kokybę po jų gabenimo, priėmimo veiksmų ir visų protokolo procesų, ir jos neturėtų būti mažesnės nei 2 lentelėje nurodytos istoriškai nustatytos ribos (žr. 26 pastraipą). Panašiai, teigiama kontroline medžiaga, t. y. metilacetatu, apdorotų audinių vidutinis gyvybingumas turėtų būti < 50 % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu pagal PPM1 skysčių ar kietųjų medžiagų protokolus, ir ≤ 30 % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu pagal PPM2 (skysčių protokolą) arba ≤ 20 % (kietųjų medžiagų protokolą), taip rodant audinių gebėjimą reaguoti į dirginančią cheminę medžiagą bandymo metodo sąlygomis (34) (35). Kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomosioms cheminėms medžiagoms ir kontrolinėms medžiagoms, turėtų atitikti priimtas ribas (t. y. dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20 % arba trijų kartotinių audinio bandinių standartinis nuokrypis (SN) neturėtų būti didesnis kaip 18 %). Jei į atskirą bandymą įtrauktas neigiamas ar teigiamas kontrolinis ėminys neatitinka priimtų intervalų ribų, atskiras bandymas laikomas „neatitinkančiu reikalavimų“ ir turėtų būti pakartotas. Jei audinio kartotinių bandinių kintamumas, gautas bandomajai cheminei medžiagai, neatitinka priimto intervalo ribų, bandymas turi būti laikomas „neatitinkančiu reikalavimų“ ir bandomąją cheminę medžiagą reikėtų bandyti iš naujo.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

44. Gautas kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos kartotinių audinių ekstraktų OT vertes arba smailių plotus reikėtų naudoti vidutinei audinių gyvybingumo procentinei daliai (kartotinių audinių bandinių vidurkiui) apskaičiuoti atžvilgiu neigiamo kontrolinio ėminio, kuriam gautas gyvybingumas prilyginamas 100 %. Audinio gyvybingumo vidutinės procentinės dalies ribinė vertė, pagal kurią identifikuojamos bandomosios cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP *Be kategorijos*) pateikta 4 lentelėje. Rezultatus reikėtų aiškinti taip:

— Bandomoji cheminė medžiaga identifikuojama kaip medžiaga, kurios nereikia klasifikuoti ir ženklinti pagal JT GHS ir CLP (*Be kategorijos*), jei po ekspozicijos ir poekspozicinio inkubavimo audinio gyvybingumo vidutinė procentinė dalis yra didesnė nei (>) nustatyta audinio gyvybingumo procentinės dalies ribinė vertė, kaip nurodyta 4 lentelėje. Šiuo atveju nereikia atlikti papildomų bandymų, taikant kitus bandymo metodus.

— Jei po ekspozicijos ir poekspozicinio inkubavimo audinio gyvybingumo vidutinė procentinė dalis yra mažesnė nei arba lygi (≤) nustatytai audinio gyvybingumo procentinės dalies ribinei vertei, prognozės pateikti negalima, kaip nurodyta 4 lentelėje. Šiuo atveju reikės atlikti papildomus bandymus taikant kitus bandymo metodus, nes RhCE bandymo metodais gaunamas tam tikras klaidingai teigiamų rezultatų skaičius (žr. 14–15 pastraipas) ir juos taikant negalima atskirti JT GHS ir CLP 1 ir 2 kategorijų (žr. 17 pastraipą).

4 lentelė

Prognozavimo modeliai pagal JT GHS ir CLP klasifikavimą

PPM	*Be kategorijos*	Prognozės pateikti negalima
PPM 1 - EpiOcular™ EIT (pagal abu protokolus)	Vidutinis audinio gyvybingumas > 60 %	Vidutinis audinio gyvybingumas ≤ 60 %
PPM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (pagal skystųjų medžiagų protokolą)	Vidutinis audinio gyvybingumas > 60 %	Vidutinis audinio gyvybingumas ≤ 60 %
PPM2 - SkinEthic™ HCE EIT (pagal kietųjų medžiagų protokolą)	Vidutinis audinio gyvybingumas > 50 %	Vidutinis audinio gyvybingumas ≤ 50 %

45. Jei dėl klasifikavimo neabejojama, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno bandymo su ne mažiau kaip dviem kartotiniais audinio bandiniais. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių ėminių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė procentinė gyvybingumo vertė lygi 60 ± 5 % (PPM1 ir PPM2 skysčių protokolui) arba 50±5 % (PPM2 kietųjų medžiagų protokolui), reikėtų spręsti dėl antrojo bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei pirmųjų dviejų atskirų bandymų rezultatai išsiskirtų.

46. Specialiųjų tipų mišiniams gali būti įvertintos skirtingos audinio gyvybingumo vidutinės procentinės dalies ribinės vertės, skiriančios klasifikuojamas bandomąsias chemines medžiagas nuo neklasifikuojamų, jei tiktų ir būtų pagrįsta, kad būtų galima pagerinti bandymo metodo taikymo charakteristikas (žr. 14 pastraipą). Palyginamosios cheminės medžiagos gali būti naudingos įvertinant nežinomų bandomųjų cheminių medžiagų ar produktų klasės rimto akių pažeidimo ar akių dirginimo potencialą arba įvertinant klasifikuojamos cheminės medžiagos santykinį toksiškumo akims potencialą tam tikrame teigiamų atsakų intervale.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

47. Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskirų audinio kartotinių bandinių atskiro bandymo duomenys (pvz., OT arba MTT formazano smailių ploto vertės, apskaičiuoti bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių ėminių audinių gyvybingumo procentinių verčių duomenys ir galutinio RhCE bandymo metodo prognozė), įskaitant kartotinių bandymų duomenis, jei reikia. Be to, ataskaitoje reikėtų pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių vidutinio audinio gyvybingumo procentinę dalį ir dviejų kartotinių bandinių gyvybingumo skirtumą (jei kartotinių audinio bandinių n = 2) arba SN (jei kartotinių audinio bandinių n ≥ 3). Bandomosios medžiagos trukdžiai matuojant MTT formazaną, susiję su tiesiogine MTT redukcija ir (arba) spalvos trukdžiais, turėtų būti pateikti ataskaitoje apie kiekvieną bandomąją cheminę medžiagą.

Bandymo ataskaita

48. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė cheminė medžiaga

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS registro numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— agregatinė būsena, lakumas, pH, LogP, molekulinė masė, cheminių medžiagų klasė ir papildomos fizikinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;

— grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, pvz., cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— agregatinė būsena ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;

— grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS registro numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— agregatinė būsena, lakumas, molekulinė masė, cheminių medžiagų klasė ir papildomos fizikinės ir cheminės savybės, susijusios su tyrimo atlikimu, kiek įmanoma išsamiau;

— grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— kitos nei ypač grynas H_2O arba Ca^{2+}/Mg^{2+} neturintis DPBS neigiamos kontrolinės medžiagos naudojimo pagrindimas, jei tinka;

— kitos nei grynas metilacetatas teigiamos kontrolinės medžiagos naudojimo pagrindimas, jei tinka;

— nuoroda į istorinių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių rezultatus, kurie įrodytų tinkamus bandymo priėmimo kriterijus.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

— rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas.

— *RhCE audinio darinys ir naudotas protokolas (pateikiant variantų pagrindimą, jei tinka)*

Bandymų metodo sąlygos

— Naudotas RhCE audinio darinys, įskaitant partijos numerį;

— bangos ilgis ir dažnių juostos plotis (jei tinka), naudojamas MTT formazano kiekybiniam nustatymui, ir matavimo prietaiso (pvz., spektrofotometro) tiesiškumo intervalas;

— MTT formazano kiekybinio nustatymo metodo aprašymas;

— HPLC arba UPLC ir spektrofotometrijos sistemos aprašymas, jei tinka;

— visa su konkrečiu RhCE audinio dariniu susijusi pagalbinė informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys:

i) gyvybingumo kokybės kontrolė (tiekėjas);

ii) gyvybingumas bandymo metodo sąlygomis (naudotojas);

iii) apsauginės funkcijos kokybės kontrolė;

iv) morfologija, jei duomenys yra;

v) atkuriamumas ir prognozavimo geba;

vi) kitos RhCE audinio darinio kokybės kontrolės ėminiai, jei yra;

— nuoroda į RhCE audinio darinio istorinius duomenis. Turėtų būti įtraukti šie ir kiti duomenys: kokybės kontrolės duomenų priimtinumas atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;

— pareiškimas, kad bandymo įstaiga įrodė bandymo metodo taikymo kvalifikaciją prieš pradedant jį taikyti įprastiniu būdu, bandydama kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas;

Atskiro bandymo ir bandymo priimtinumo kriterijai

— Teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių vidurkiai bei priimtinumo intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis;

— priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams ėminiams;

— priimtinas kintamumas tarp audinio kartotinių bandinių, gautas bandomajai cheminei medžiagai;

Bandymo procedūra

— naudojamos bandymo procedūros išsamūs duomenys;

— bandomosios cheminės medžiagos ir naudojamų kontrolinių medžiagų dozės;

— ekspozicijos trukmė ir temperatūra, poekspozicinio laikymo terpėje ir poekspozicinio inkubavimo laikotarpiai (jei tinka);

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;

— su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudojamų kontrolinių medžiagų nuoroda,

— audinių kartotinių bandinių, naudojamų bandomajai cheminei medžiagai ir kontroliniams ėminiams (teigiamam, neigiamam kontroliniams ėminiams, NSMTT, NSS_{gyv} ir NSS_{negyv}, jei tinka);

Rezultatai:

— lentelėse pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių kiekvieno atskiro bandymo (įskaitant kartotinius bandymus, jei tinka) ir kiekvieno kartotinio bandinio matavimų duomenys, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, audinio gyvybingumo procentinę dalį, vidutinę audinio gyvybingumo procentinę dalį, skirtumus tarp kartotinių audinio bandinių arba SN ir galutinę prognozę;

— jei tinka, kontrolinių ėminių, naudotų tiesioginiams MTT reduktoriams ir (arba) spalvotoms bandomosioms cheminėms medžiagoms, rezultatai, įskaitant MTT formazano OT arba smailės plotą, % NSMTT, % NSS_{gyv}, % NSS_{negyv}, skirtumą tarp adinio kartotinių bandinių arba SN, galutinę tikslią audinio gyvybingumo procentinę dalį ir galutinę prognozę;

— rezultatai gauti bandomajai (-ioms) cheminei (-ėms) medžiagai (-oms) ir kontrolinėms cheminėms medžiagoms, atsižvelgiant į nustatytus atskiro bandymo ir bandymo priimtinumo kriterijus;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas, pvz., bandomąja chemine medžiaga nudažytų audinių spalva;

Rezultatų aptarimas

Išvada

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. Pateikta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Šio priedo B.5 skyrius. Ūmus akių dirginimas ar ėsdinimas.

(3) Šio priedo B.47 skyrius. Galvijų ragenos drumstumo ir pralaidumo bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkų akių pažeidimą, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančias akis ar sukeliančias smarkų akių pažeidimą.

(4) Šio priedo B.48 skyrius. Atskirtų viščiukų akių bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti.

(5) Šio priedo B.61 skyrius. Fluoresceino nuotėkio bandymų metodas akis ėsdinančioms ir stipriai dirginančioms medžiagoms identifikuoti.

(6) Šio priedo B.68 skyrius. Trumpalaikės ekspozicijos *in vitro* bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias rimtą akių pažeidimą ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar rimto akių pažeidimo.

(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. Pateikta 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. Pateikta 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. Pateikta 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. Pateikta [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. Pateikta 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. Pateikta http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). 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 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas: bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (18).

Palyginamoji cheminė medžiaga: cheminė medžiaga, naudojama kaip etalonas lyginant su bandomąja chemine medžiaga. Palyginamoji cheminė medžiaga turėtų turėti šias savybes: i) pastovų (-ius) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius) jai identifikuoti ir apibūdinti; ii) jos struktūrinės ir funkcinės ir (arba) produkto klasės savybės turi būti panašios į bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) klasės savybes; iii) žinomas fizikines ir chemines charakteristikas; iv) žinomą poveikį patvirtinančius duomenis; ir v) žinomą veikimo gebą reikiamo atsako intervale.

Aukštynkryptis metodas: pakopinis metodas, taikomas bandomajai cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad jos nereikia klasifikuoti ir ženklinti dėl akių dirginimo arba rimto akių pažeidimo, kai cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti ir ženklinti (duoda neigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda teigiamą rezultatą).

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Sutapimas: žr. *tikslumas*.

Ragena: permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

VK: variacijos koeficientas.

Nuokr.: nuokrypis.

EIT: akių dirginimo bandymas (angl. *Eye Irritation Test*).

EURL ECVAM: Europos Sąjungos etaloninė alternatyvių bandymų su gyvūnais laboratorija.

Akių dirginimas: akių pokyčių atsiradimas uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kurie visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *grįžtamasis poveikis akims* ir JT GHS ir CLP 2 kategorija.

ET_{50}: ekspozicijos trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos palyginamąja chemine medžiaga.

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis: visų teigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą yra klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis: visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Pavojus: būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

HCE: SkinEthic™ žmogaus ragenos epitelis.

HPLC: efektyvioji skysčių chromatografija.

IC_{50}: palyginamosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant audinių gyvybingumas sumažėja 50 % po tam tikros ekspozicijos trukmės (pvz., 30 min apdorojimo natrio dodecilsulfatu).

Neribota dozė: ant RhCE audinio konstrukcijos dedamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai padengti epitelio paviršių.

Negrįžtamasis poveikis akims: žr. *Rimtas akių pažeidimas*.

LLOQ: apatinė kiekybinio nustatymo riba

LogP: pasiskirstymo tarp vandens ir oktanolio koeficiento logaritmas.

Mišinys: dviejų ar daugiau cheminių medžiagų mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga: medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga: medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidas; tiazolilo mėlynasis, tetrazolinio bromidas.

Neigiamas kontrolinis ėminys: ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip nesukelianti teigiamo bandymo sistemos atsako. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, ir yra naudojamas 100 % audinių gyvybingumui nustatyti.

Neklasifikuojamos: cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos dėl akių dirginimo (JT GHS ir CLP 2 kategorija, JT GHS 2A ar 2B kategorija) ar dėl rimto akių pažeidimo (JT GHS ir CLP 1 kategorija). Lygiavertis terminui JT GHS ir CLP *Be kategorijos*.

NSS_{negyv}: negyvų audinių nespecifinė spalva.

NSS_{gyv}: gyvųjų audinių nespecifinė spalva.

NSMTT: nespecifinė MTT redukcija.

OT: optinis tankis.

Naudojimo charakteristikų standartai: standartai, pagrįsti patvirtintu ir moksliškai tinkamu laikomu bandymo metodu, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: i) esminiai bandymo metodo komponentai; ii) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir iii) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (18).

Teigiamas kontrolinis ėminys: ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą bandymo sistemos atsaką. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas: santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (18).

Patikimumas: pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų bei pakartojamumą laboratorijoje (18).

Pakaitinis bandymas: bandymas, kuris skirtas pakeisti bandymą, paprastai naudojamą ir pripažintą tinkamu pavojui identifikuoti ir (arba) rizikai vertinti, ir kuris nustatytas kaip užtikrinantis lygiavertę ar geresnę žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą, kaip tinka, palyginti su pripažintu bandymu esant visoms įmanomoms bandymo aplinkybėms ir cheminėms medžiagoms (18).

Atkuriamumas: rezultatų, gautų pakartotinai bandant tą pačią bandomąją cheminę medžiagą pagal tą patį bandymo protokolą, sutapimas (žr. *Patikimumas*) (18).

Grįžtamasis poveikis akims: žr. *Akių dirginimas*.

RhCE: rekonstruotas žmogaus ragenos savybių epitelis.

Atskiras bandymas: vienos arba daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas vienu metu su neigiamu kontroliniu ėminiu ir teigiamu kontroliniu ėminiu.

SN: standartinis nuokrypis

Jautris: visų teigiamų (arba) veikliųjų bandomųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (18).

Rimtas akių pažeidimas: akies audinio pažeidimas arba rimtas fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta per 21 dieną nuo uždėjimo. Lygiavertis terminui *negrįžtamasis poveikis akims* bei JT GHS ir CLP 1 kategorija.

Standartinės veiklos procedūros: formalios rašytinės procedūros, kuriose išsamiai aprašoma, kaip laboratorijoje turėtų būti atliekami tam tikri įprastiniai ir su bandymo metodu susiję veiksmai. Jas reikia turėti atsižvelgiant į gerą laboratorinę praktiką.

Specifiškumas: visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami su kategorija susiję rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo metodo tinkamumą (18).

Medžiaga: natūralus arba gamybos proceso metu gautas cheminis elementas ir cheminių elementų junginys, įskaitant priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias gaminant, išskyrus tirpiklius, kurie gali būti atskirti nedarant poveikio cheminės medžiagos stabilumui ar nepakeičiant jos sudėties;

Bandymas: viena bandomoji cheminė medžiaga vienu metu bandoma ne mažiau kaip su dviem kartotiniais audinio bandiniais, kaip nurodyta atitinkamose SVP.

Audinio gyvybingumas: bendrojo rekonstruoto audinio ląstelių populiacijos aktyvumo ir jų gebėjimo redukuoti gyvųjų audinių dažiklį MTT matavimo parametras, kuris, atsižvelgiant į matuojamą vertinamąją baigtį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių gyvųjų ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu

Žemynkryptis metodas: pakopinis metodas, taikomas cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad ji sukelia rimtą akių pažeidimą, kai cheminės medžiagos, kurios sukelia rimtą akių pažeidimą (duoda teigiamą rezultatą), nustatomos pradedant nuo kitų cheminių medžiagų (duoda neigiamą rezultatą).

Bandomoji cheminė medžiaga: taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija: pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai metodai taikomi nuosekliu būdu. Visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą peržiūrima kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios duomenų galios analizės procesą, kad būtų galima nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos strategijos pakopos. Jei atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomąją cheminę medžiagą tam tikroje pakopoje galima priskirti prie pavojingųjų ir (arba) veiksmingų medžiagų, papildomų bandymų atlikti nereikia (18).

ULOQ: viršutinė kiekybinio nustatymo riba.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS): sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

JT GHS ir CLP 1 kategorija: žr. *Rimtas akių pažeidimas.*

JT GHS ir CLP 2 kategorija: žr. *Akių dirginimas.*

JT GHS ir CLP be kategorijos: cheminės medžiagos, kurios neatitinka JT GHS ir CLP 1 arba 2 kategorijos (arba JT GHS 2A arba 2B kategorijos) klasifikavimo reikalavimų. Lygiavertis terminui *neklasifikuojamos.*

UPLC: ypač efektyvi skysčių chromatografija.

UVCB: nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Tinkamas bandymo metodas: bandymo metodas, kurio tinkamumo ir patikimumo pakanka tam tikram tikslui pasiekti ir kuriam taikomi moksliškai pagrįsti principai. Bandymų metodas niekuomet nėra visiškai tinkamas absoliučiąja prasme, bet tik tam tikro tikslo atžvilgiu (18).

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas: bandymo metodas, kurio patvirtinimo tyrimai atlikti, kad būtų nustatytas jo tinkamumas tam tikram tikslui pasiekti (įskaitant tikslumą) ir patikimumas. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti (18).

PPM: patvirtintas pamatinis metodas.

PPM1: EpiOcular™ EIT nurodomas kaip patvirtintas pamatinis metodas 1.

PPM2: SkinEthic™ HCE EIT nurodomas kaip patvirtintas pamatinis metodas 2.

Įrodomoji duomenų galia: įvairių informacijos dalių privalumų ir trūkumų nagrinėjimo procesas priimant ir patvirtinant sprendimą dėl bandomosios cheminės medžiagos pavojingumo.

2 priedėlis

RHCE BANDYMŲ, PATVIRTINTŲ IDENTIFIKUOTI CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI IR ŽENKLINTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO ARBA RIMTO AKIŲ PAŽEIDIMO, PAGRINDINIAI BANDYMO KOMPONENTAI

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Protokolai	Skysčiai (15 min lašinamos pipete 37±1 °C ar žemesnėje temperatūroje)	Kietosios medžiagos (nelašinamos pipete)	Skysčiai ir klampios medžiagos (lašinamos pipete)	Kietosios medžiagos (nelašinamos pipete)
Modelio paviršius	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Kartotinių audinio bandinių skaičius	Ne mažiau kaip 2	Ne mažiau kaip 2	Ne mažiau kaip 2	Ne mažiau kaip 2
Pradinis tikrinimas dėl spalvos trukdžių	50 µl + 1 ml H_2O, 60 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH (nespalvotos bandomosios cheminės medžiagos), arba 50 µl + 2 ml izopropanolio, maišoma 2–3 h kambario temperatūroje (spalvotos bandomosios cheminės medžiagos) → jei bandomosios cheminės medžiagos OT, esant 570±20 nm, atėmus izopropanolio ar vandens OT, yra > 0,08 (tai atitinka maždaug 5 % neigiamų kontrolinių ėminių vidutinio OT), reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą.	50 mg + 1 ml H_2O, 60 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH(nespalvotos bandomosios cheminės medžiagos) ir (arba) 50 mg + 2 ml izopropanolio, maišoma 2–3 h kambario temperatūroje (spalvotos ir nespalvotos bandomosios cheminės medžiagos) → jei bandomosios cheminės medžiagos OT, esant 570±20 nm, atėmus izopropanolio ar vandens OT, yra > 0,08 (tai atitinka maždaug 5 % neigiamų kontrolinių ėminių vidutinio OT), reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą.	10 µl + 90 µl H_2O, maišoma 30±2 min kambario temperatūroje (18–28 °C) → jei bandomoji cheminė medžiaga yra spalvota, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą	10 mg + 90 µl H_2O, maišoma 30±2 min kambario temperatūroje → jei bandomoji cheminė medžiaga yra spalvota, reikėtų atlikti gyvojo audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Pradinis tikrinimas dėl tiesioginės MTT redukcijos	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 180±15 min,esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą (50 µl sterilaus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml tirpalo, 180±15 min,esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą (50 µl sterilaus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml tirpalo, 180± 15 min, esant 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą (30 µl sterilaus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml tirpalo, 180± 15 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH → jei tirpalo spalva pasikeičia į mėlyną ar violetinę, reikėtų atlikti vandenyje žuvusio audinio pritaikytų kontrolinių ėminių bandymą (30 µl sterilaus dejonizuoto vandens MTT tirpale naudojama kaip neigiamas kontrolinis ėminys)
Parengiamasis apdorojimas	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS 30 ± 2 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, apsaugota nuo šviesos.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS 30±2 min, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, apsaugota nuo šviesos.	-	-
Apdorojimo dozės ir uždėjimo būdas	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2), naudojant kalibruotą įrankį (pvz., pilną sulig kraštais šaukštelį, sukalibruotą talpinti 50 mg natrio chlorido).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Klampioms medžiagoms naudojamas nailono tinklelis	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Ekspozicijos trukmė ir temperatūra	30 min (± 2 min) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 h (± 0,25 h) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 h (± 0,1 h) kultūros terpėje esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH

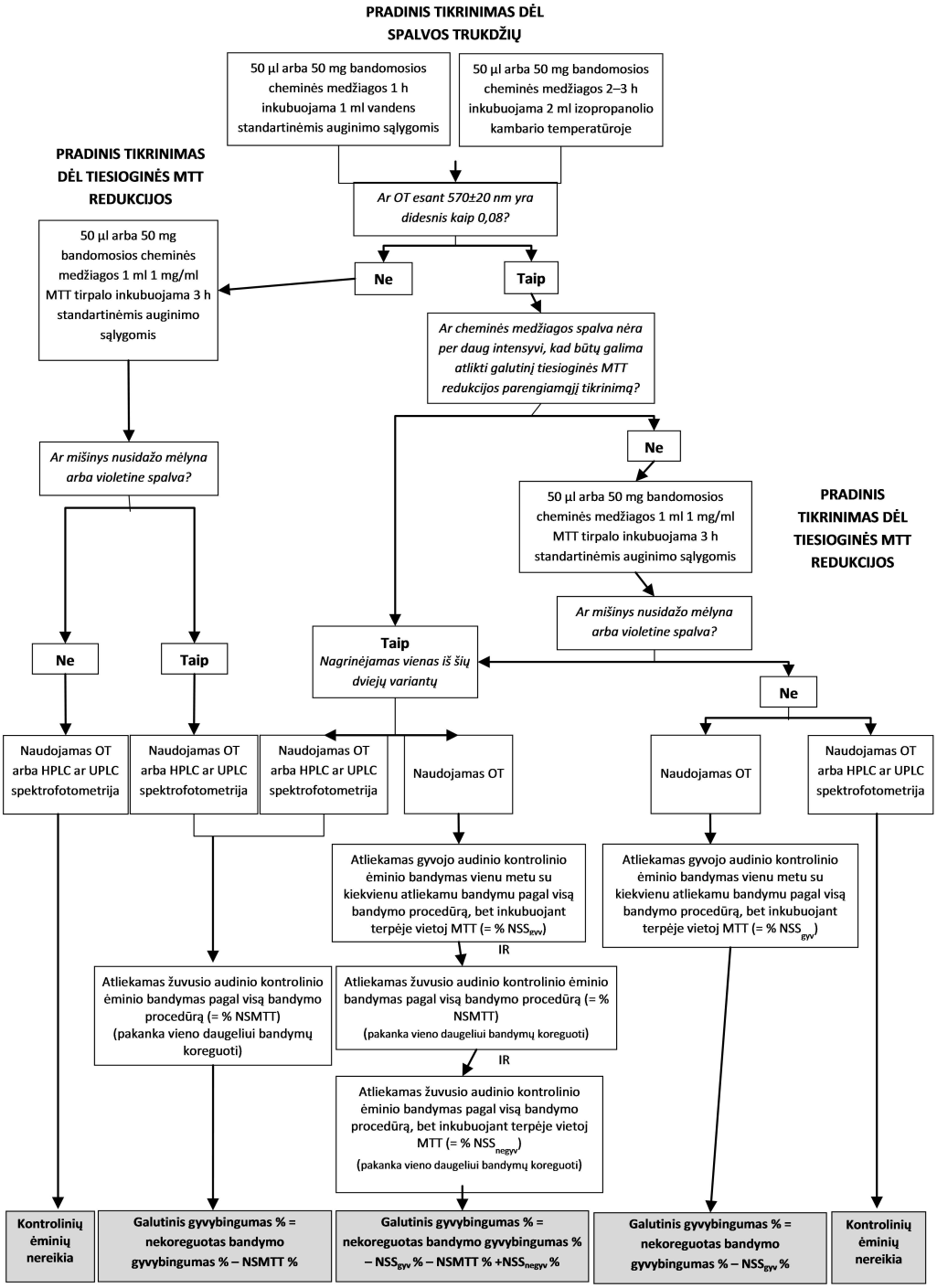
Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Skalavimas kambario temperatūroje	3 kartus 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS	3 kartus 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS
Poekspozicinis laikymas	12 min (± 2 min) kultūros terpėje, kambario temperatūroje	25 min (± 2 min) kultūros terpėje, kambario temperatūroje	30 min (± 2 min) kultūros terpėje, esant 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	30 min (± 2 min) kultūros terpėje, kambario temperatūroje
Poekspozicinis inkubavimas	120 min (± 15 min) kultūros terpėje, esant 37±2 °C, 5±1 CO_2, ≥ 95 % RH	18 h (± 0,25 h) kultūros terpėje, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	nėra	18 h (± 0,5 h) kultūros terpėje, esant 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Neigiamas kontrolinis ėminys	50 µl H_2O Bandoma vienu metu	50 µl H_2O Bandoma vienu metu	30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS Bandoma vienu metu	30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2+} neturinčio DPBS Bandoma vienu metu
Teigiamas kontrolinis ėminys	50 µl metilacetato Bandoma vienu metu	50 µl metilacetato Bandoma vienu metu	30 ± 2µl metilacetato Bandoma vienu metu	30 ± 2µl metilacetato Bandoma vienu metu

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
MTT tirpalas	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml
MTT inkubavimo trukmė ir temperatūra	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min), esant 37±2 °C, 5±1 CO_2, ≥ 95 % RH
Ekstrahavimo tirpiklis	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios, praduriant audinį)	2 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo apačios, praduriant audinį)	1,5 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo viršaus ir apačios)	1,5 ml izopropanolio (ekstrahavimas nuo įdėklo apačios)
Ekstrahavimo trukmė ir temperatūra	2–3 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje arba per naktį 4–10 °C temperatūroje	2–3 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje arba per naktį 4–10 °C temperatūroje	4 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje arba laikoma bent per naktį 4–10 °C temperatūroje nepurtant	Netrumpiau kaip 2 h purtoma (~120 rpm) kambario temperatūroje
OT rodmenys	570 nm (550–590 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (550–590 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (540–600 nm) be palyginamojo filtro	570 nm (540–600 nm) be palyginamojo filtro
Audinių kokybės kontrolė	Apdorojimas 100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Apdorojimas 100 µl 0,3 % (V/V) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 min apdorojimas SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 min apdorojimas SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Bandymo komponentai	EpiOcular™ EIT (PPM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (PPM 2)	
Priimtinumo kriterijai	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti > 0,8 ir < 2,5 2. Audinio kartotinių bandinių, 30 min veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti < 50 % 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti > 0,8 ir < 2,5 2. Audinio kartotinių bandinių, 6 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti < 50 % 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis OT turėtų būti > 1,0 ir ≤ 2,5 2. Audinio kartotinių bandinių, 30 min veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti ≤ 30 % 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20 %.	1. Audinių kartotinių bandinių, apdorotų neigiamu kontrolini ėminiu, vidutinis OTturėtų būti > 1,0 ir ≤ 2,5 2. Audinio kartotinių bandinių, 4 h veikiamų teigiamu kontroliniu ėminiu, vidutinis gyvybingumas, išreikštas % neigiamo kontrolinio ėminio atžvilgiu, turėtų būti ≤ 20 % 3. Dviejų kartotinių audinio bandinių gyvybingumo skirtumas turėtų būti mažesnis kaip 20 %.

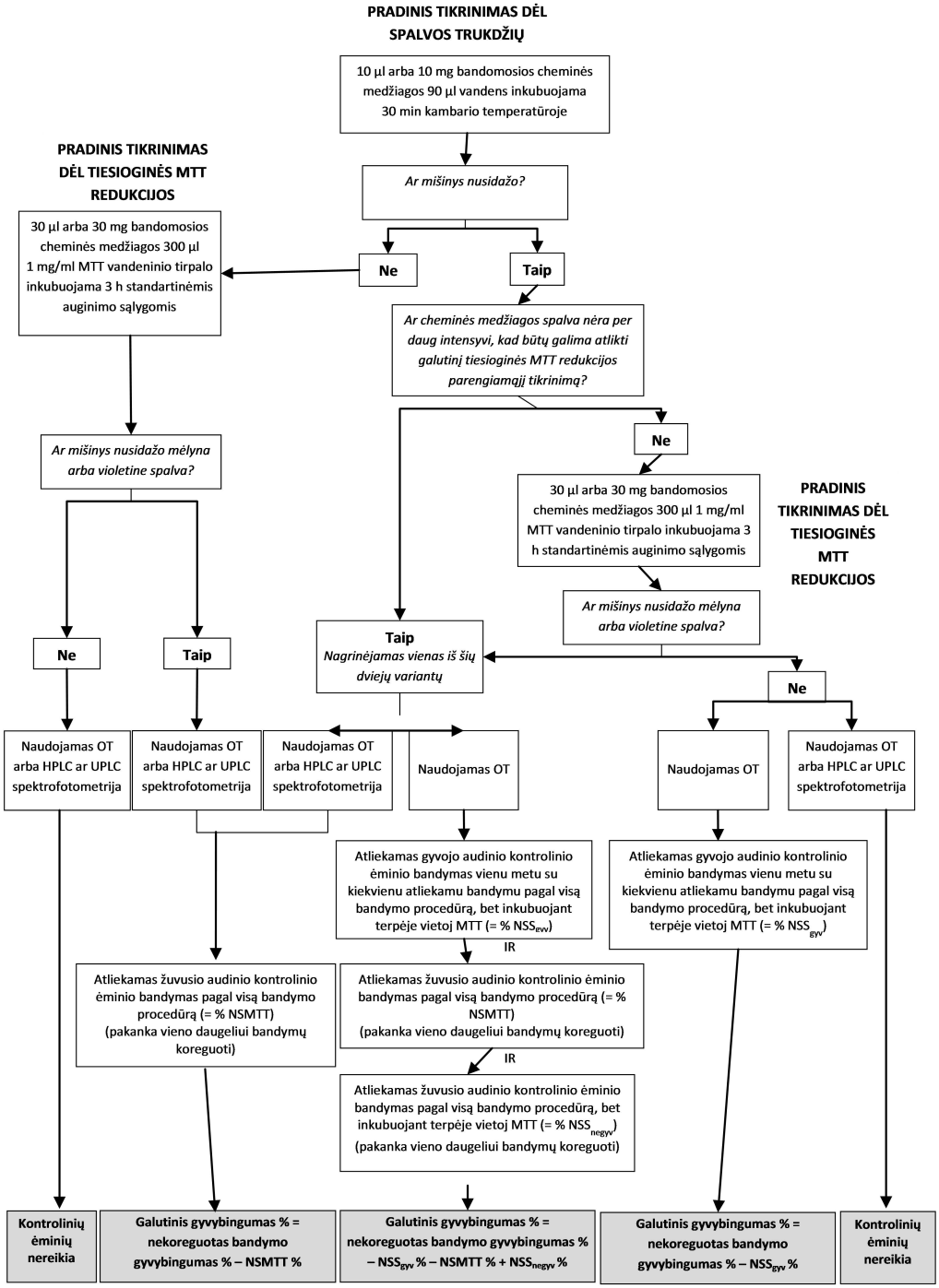
3 priedėlis

TIESIOGINIŲ MTT REDUKTORIŲ IR (ARBA) SPALVOS TRUKDŽIUS SUKELIANČIŲ CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ IDENTIFIKAVIMO IR TVARKYMO REKOMENDACIJŲ AIŠKINIMO SCHEMA, PAGRĮSTA PPM1 SVP



4 priedėlis

TIESIOGINIŲ MTT REDUKTORIŲ IR (ARBA) SPALVOS TRUKDŽIUS SUKELIANČIŲ CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ IDENTIFIKAVIMO IR TVARKYMO REKOMENDACIJŲ AIŠKINIMO SCHEMA, PAGRĮSTA PPM2 SVP



5 priedėlis

HPLC ARBA UPLC IR SPEKTROFOTOMETRIJOS SISTEMOS, SKIRTOS IŠ RHCE AUDINIO DARINIŲ EKSTRAHUOTAM MTT FORMAZANUI MATUOTI, TINKAMUMO ĮVERTINIMO PAGRINDINIAI PARAMETRAI IR PRIIMTINUMO KRITERIJAI

Parametras	Protokolas, parengtas pagal FDA rekomendacijas (36) (38)	Priimtinumo kriterijai
Atrankumas	Izopropanolio, gyvųjų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų RhCE audinio darinio gyvųjų ląstelių izopropanolio ekstrakto), negyvų audinių tuščiojo ėminio (neapdorotų RhCE audinio darinio negyvų ląstelių izopropanolio ekstrakto) ir dažiklio (pvz., metileno mėlynojo) analizė	$Plotas_{trukdžių} \leq 20\ \%\ Plotas_{L\text{-}LOQ}$ (1)
Preciziškumas	Kokybės kontrolės ėminiai (t. y. MTT formazano 1,6 μg/ml, 16 μg/ml ir 160 μg/ml tirpalas) izopropanolyje (n = 5)	VK ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Tikslumas	Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	% Nuokr. ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ
Matricos efektas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 5)	85 % ≤ matricos efektas ≤ 115 %
Pernaša	Izopropanolio analizė po ULOQ (2) etaloninio tirpalo	$Plotas_{trukdžių} \leq 20\ \%\ Plotas_{L\text{-}LOQ}$
Atkuriamumas (vienos dienos)	3 nepriklausomos kalibravimo kreivės (gautos nuosekliai skiedžiant 6 kartus MTT formazaną izopropanolyje santykiu 1/3, pradedant ULOQ, t.y. 200 μg/ml); Kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 5)	Kalibravimo kreivės: % Nuokr. ≤ 15 % arba ≤ 20 % dėl LLOQ Kokybės kontrolės ėminiai: % Nuokr. ≤ 15 % ir VK ≤ 15 %
Atkuriamumas (tarp dienų)	1 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 2 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3) 3 diena: 1 kalibravimo kreivė ir kokybės kontrolės ėminiai izopropanolyje (n = 3)	
MTT formazano RhCE audinio ekstrakte trumpalaikis stabilumas	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po 24 h laikymo kambario temperatūroje	% Nuokr. ≤ 15 %
MTT formazano RhCE audinio ekstrakte ilgalaikis stabilumas, jei reikia	Kokybės kontrolės medžiagos gyvųjų audinių tuščiajame ėminyje (n = 3), analizuojamos paruošimo dieną ir po kelių laikymo −20 °C temperatūroje dienų	% Nuokr. ≤ 15 %

(1) LLOQ: apatinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip sudaranti 1–2 % audinio gyvybingumo, t. y. 0,8 μg/ml.
(2) ULOQ: viršutinė kiekybinio nustatymo riba, nurodoma kaip koncentracija, ne mažiau kaip du kartus didesnė nei didžiausia tikėtina MTT formazano koncentracija neigiamų kontrolinių ėminių izopropanolio ekstraktuose (~70 μg/ml taikant PPM), t. y. 200 μg/ml.

B.70 ŽMOGAUS REKOMBINANTINIO ESTROGENŲ RECEPTORIAUS (hrER) *IN VITRO* BANDYMAI PRIJUNGIMO PRIE ER GIMININGUMU PASIŽYMINČIOMS CHEMINĖMS MEDŽIAGOMS APTIKTI

BENDRASIS ĮVADAS

EBPO į rezultatus orientuotos bandymo gairės

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 493 (2015). TG 493 yra į rezultatus orientuotos bandymo gairės (PBTG), aprašančios žmogaus rekombinantų *in vitro* bandymo metodus, siekiant aptikti medžiagas, pasižyminčias prijungimo prie estrogenų receptorių gimininguma (prijungimo prie hrER bandymai). Jas sudaro du mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašūs bandymai estrogenų receptorių (t. y. ERα) jungiamoms medžiagoms identifikuoti, ir jos turėtų palengvinti naujų panašių ar modifikuotų bandymų kūrimą, atsižvelgiant į patvirtinimo principus, išdėstytus EBPO rekomendaciniame dokumente dėl naujų ar atnaujintų pavojaus vertinimo bandymo metodų patvirtinimo ir tarptautinio pripažinimo (1). Visiškai patvirtinti pamatiniai bandymo metodai (2 priedėlis ir 3 priedėlis), kurie sudaro šio į rezultatus orientuoto PBTG bandymo metodo pagrindą, yra:

— Freyberger-Wilson (FW) *in vitro* estrogenų receptoriaus (ER) prijungimo bandymas, naudojant viso ilgio žmogaus rekombinantinį estrogenų receptorių ERα (2), ir

— Cheminių medžiagų įvertinimo ir tyrimų instituto (CERI) *in vitro* estrogenų receptoriaus (ER) prijungimo bandymas, naudojant žmogaus rekombinantinį ligandų prijungimo domeno baltymą (2).

Yra naudojimo charakteristikų standartai (3), skirti palengvinti tos pačios pavojaus vertinamosios baigties panašių bandymo metodų vystymą bei patvirtinimą ir laiku iš dalies pakeisti PBTG 493, kad nauji panašūs bandymai galėtų būti įtraukti į atnaujintas PBTG. Tačiau panašūs bandymai bus įtraukti tik tada, kai tik EBPO atliks peržiūrą ir sutiks, kad jie atitinka naudojimo charakteristikų standartus. Į TG 493 įtraukti bandymai gali būti naudojami sprendžiant be skirtumo klausimus, susijusius su EBPO valstybės narės reikalavimais jungimo prie estrogenų receptorių bandymo rezultatams, ir turėti naudos iš abipusio duomenų pripažinimo.

Į šį bandymo metodą įtrauktų bandymų pagrindimas ir principai

2. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėta labai svarbi veikla, kurios tikslas – patikslinti esamas ir parengti naujas galimų endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema (CF) buvo peržiūrėta 2012 m. Originalios ir peržiūrėtos CF yra įtrauktos kaip priedai į rekomendacinį dokumentą dėl endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų vertinimo standartizuotų bandymo gairių (4). CF sudaro penki lygiai, kai kiekvienas lygis atitinka skirtingą biologinio sudėtingumo lygį. Šiame bandymo metode aprašyti prijungimo prie ER bandymai yra 2 lygio ir juos sudaro *in vitro bandymai, kuriais gaunami duomenys apie pasirinktą (-us) endokrininį (-ius) mechanizmą (-us) ir (arba) kelią (-ius)*. Šis bandymo metodas taikomas *in vitro* prisijungimo prie receptorių bandymams, skirtiems identifikuoti žmogaus estrogenų receptoriaus alfa (ERα) ligandus.

3. Buvo aiškiai įrodytas *in vitro* prijungimo prie ER bandymo ryšys su biologinėmis funkcijomis. Prijungimo prie ER bandymai yra skirti identifikuoti chemines medžiagas, kurios gali suardyti estrogenų hormonų seką, ir pastaruosius du dešimtmečius yra plačiai naudojami ER pasiskirstymui audiniuose apibūdinti, taip pat ER agonistams arba antagonistams identifikuoti. Šie bandymai rodo ligando ir receptoriaus sąveiką, kuri yra pradinis estrogenų signalų perdavimo kelio žingsnis ir yra svarbi visų stuburinių reprodukcijos funkcijai.

4. Estrogenų sąveika su estrogenų receptoriais gali turėti įtakos estrogenų valdomų genų transkripcijai ir sukelti negenominius poveikius, kurie gali sukelti arba slopinti ląstelių procesus, įskaitant tuos, kurie būtini ląstelių proliferacijai, normaliam vaisiaus vystymuisi ir reprodukcijos funkcijai (5) (6) (7). Normalių estrogeninių sistemų sutrikimas gali sukelti neigiamą poveikį normaliam vystymuisi (ontogenezei), reprodukcinei sveikatai ir reprodukcijos sistemos vientisumui. Netinkama ER signalų perdavimas gali sukelti tokius reiškinius, kaip didesnė nuo hormonų priklausančio vėžio rizika, mažesnis vaisingumas, vaisiaus augimo ir vystymosi pakitimai (8).

5. *In vitro* prijungimo bandymai yra pagrįsti tiesiogine medžiagos sąveika su specifinio receptoriaus ligando prijungimo vieta, kuri reguliuoja geno transkripciją. Pagrindinis žmogaus rekombinantinio estrogenų receptoriaus alfa (hrERα) prijungimo bandymo komponentas matuoja radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando ([^{3}H]17β-estradiolio) gebėjimą jungtis prie ER, esant didėjančiai bandomosios cheminės medžiagos (t. y. konkurento) koncentracijai. Didelį giminingumą ER turinčios bandomosios cheminės medžiagos konkuruoja su radioaktyviuoju izotopu žymėtu ligandu esant mažesnei koncentracijai palyginti su tomis cheminėmis medžiagomis, kurių giminingumas receptoriui yra mažesnis. Šį bandymą sudaro du pagrindiniai komponentai: sotinamojo prijungimo bandymo, skirto apibūdinti receptoriaus ir ligando sąveikos parametrus ir pagrįsti ER specifiškumą, ir konkurencinio prijungimo bandymo, kuris apibūdina bandomosios cheminės medžiagos ir radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando konkurencija dėl prijungimo prie ER.

6. CERI ir FW prijungimo bandymų patvirtinimo tyrimai įrodė jų tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą tikslą (2).

7. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

Prijungimo prie receptorių bandymų taikymo sritis ir su jais apribojimai

8. Šie bandymai yra siūlomi atrankos ir pirmumo nustatymo tikslais, tačiau taip pat gali suteikti informacijos apie molekulinės iniciacijos įvykį (MIE), kuri gali būti naudojama taikant įrodomosios vertės analizės metodą. Jie nagrinėja cheminių medžiagų prijungimą prie ERα ligandų prijungimo domeno *in vitro* sistemoje. Todėl rezultatų nereikėtų tiesiogiai ekstrapoliuoti į nepaliestos endokrininės sistemos *in vivo* sudėtingą signalizavimą ir reguliavimą.

9. Gamtinio ligando 17β-estradiolio prijungimas yra molekulinių įvykių serijos pradinis žingsnis, kuris aktyvina tikslinių genų transkripciją ir dėl kurio galiausiai įvyksta fiziologinis pokytis (9). Todėl prijungimas prie ERα ligandų prijungimo domeno laikomas vienu iš pagrindinių ER tarpininkaujamų endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, nors yra kitų endokrininės sistemos ardymo mechanizmų, įskaitant i) sąveikas su kitomis nei ERα ligandų prijungimo domenas sritimis, ii) sąveikas su kitais su estrogenų signalų perdavimu susijusiais receptoriais, ERβ ir G baltymo sujungto estrogenų receptoriumi, kitais kitais receptoriais ir fermentų sistemomis endokrininės sistemos viduje, iii) hormonų sintezę, iv) hormonų metabolinį aktyvinimą ir (arba) inaktyvinimą, v) hormonų pasiskirstymą tiksliniuose audiniuose ir vi) hormonų pašalinimą iš kūno. Nei viename pagal šį bandymo metodą atliekamų bandymų šie veikimo būdai nenagrinėjami.

10. Taikant šį bandymo metodą tiriamas cheminių medžiagų gebėjimas prisijungti prie žmogaus ERα, bet skirtumas tarp ERα agonistų ar antagonistų nėra nustatomas. Atliekant šiuos bandymus nenagrinėjami tolesni įvykiai, pvz., genų transkripcija arba fiziologiniai pokyčiai. Atsižvelgiant į tai, kad atliekant patvirtinimą buvo naudotos tik atskiros vienkomponentės medžiagos, tinkamumo mišiniams klausimas nebuvo sprendžiamas. Bandymai vis dėlto laikomi teoriškai tinkamais bandyti daugiakomponentes medžiagas ir mišinius. Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

11. Ląstelių laisvųjų receptorių sistemos neturi būdingos metabolinės gebos ir nebuvo patvirtintos kartu su metabolinėmis fermentų sistemomis. Tačiau galbūt būtų galima įtraukti metabolinį aktyvumą į tyrimo planą, bet tam reikės papildomų patvirtinimo tyrimų.

12. Cheminės medžiagos, galinčios denatūruoti baltymą (t. y. receptoriaus baltymą), pvz., paviršinio aktyvumo medžiagos arba medžiagos, keičiančios bandymo buferinio tirpalo pH, negali būti bandomos arba gali būti bandomos tik tokios koncentracijos, kuriai esant tokios sąveikos nevyksta. Arba bandomoji cheminė medžiaga bandoma esant tokiam koncentracijos intervalui, kurį riboja jos tirpumas bandymo buferiniame tirpale.

13. Informacijos tikslais 1 lentelėje pateikti bandymo rezultatai, gauti 24 medžiagoms, kurios buvo bandomos atliekant abu šiame bandymo metode aprašytus visiškai patvirtintus bandymus. 17 šių medžiagų klasifikuojamos kaip prie ER jungiamos medžiagos ir 6 – kaip nejungiamos, atsižvelgiant į paskelbtas ataskaitas, įskaitant *in vitro* ER transkripcijos aktyvacijos bandymus ir (arba) uterotrofinį bandymą (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Atsižvelgiant į 1 lentelėje apibendrintus duomenis, buvo beveik 100 % visų medžiagų klasifikavimo pagal abu tyrimus sutapimas iki 10^{-4} M, ir kiekviena medžiaga buvo teisingai klasifikuota kaip jungiama prie ER ar nejungiama. Papildomos informacijos apie šią medžiagų grupę, taip pat apie papildomas medžiagas, bandytas atliekant jungimo prie ER bandymų patvirtinimo tyrimus, pateikiama prijungimo prie hrER bandymui skirtuose naudojimo charakteristikų standartuose (3), 2 priedėlis (1, 2 ir 3 lentelės).

1 lentelė

Medžiagų klasifikavimas kaip prie ER jungiamų ar nejungiamų medžiagų, kai jos bandomos atliekant FW ir CERI prijungimo prie hrER bandymus ir lyginant su numanomu atsaku

	Medžiagos pavadinimas	CAS RN	Numanomas atsakas	FW bandymas		CERI bandymas		MESH cheminė klasė	Produkto klasė
				Koncentracijos intervalas (M)	Klasifikavimas	Koncentracijos intervalas (M)	Klasifikavimas		
1	17*β*-estradiolis	50-28-2	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Jungiama medžiaga	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
2	Noretinodrelis	68-23-5	*Jungiama medžiaga*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Jungiama medžiaga	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
3	Noretindronas	68-22-4	*Jungiama medžiaga*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Jungiama medžiaga	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
4	Di-*n*-butilftalatas	84-74-2	*Nejungiama medžiaga* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga (**) ()	Angliavandenilis (ciklinis), esteris	Plastifikatorius, tarpinis cheminis produktas
5	DES	56-53-1	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
6	17α-etinilestradiolis	57-63-6	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
7	*Mezo*-heksestrolis	84-16-2	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
8	Genisteinas	446-72-0	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Angliavandenilis (heterociklinis), flavonoidas	Gamtinis produktas
9	Ekuolis	531-95-3	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Fitoestrogenų metabolitas	Gamtinis produktas
10	Butilparabenas (*n* butil-4-hidroksibenzenkarboksilatas)	94-26-8	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Parabenas	Konservantas

	Medžiagos pavadinimas	CAS RN	Numanomas atsakas	FW bandymas		CERI bandymas		MESH cheminė klasė	Produkto klasė
				Koncentracijos intervalas (M)	Klasifikavimas	Koncentracijos intervalas (M)	Klasifikavimas		
11	Nonilfenolis (mišinys)	84852-15-3	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Alkilfenolis	Tarpinis junginys
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Chloro organinis junginys	Insekticidas
13	Kortikosteronas	50-22-6	*Nejungiama medžiaga* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga	Steroidas	Gamtinis produktas
14	Zearalenonas	17924-92-4	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Angliavandenilis (heterociklinis), laktonas	Gamtinis produktas
15	Tamoksifenas	10540-29-1	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai, veterinarijos priemonė
16	5α-dihidrotestosteronas	521-18-6	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Steroidas, nefenolinis	Gamtinis produktas
17	Bisfenolis A	80-05-7	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
18	4-*n*-heptilfenolis	1987-50-4	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Abejotina medžiaga ([2])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Alkilfenolis	Tarpinis produktas
19	Keponas (chlordekonas)	143-50-0	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Angliavandenilis (halogenintas)	Pesticidas
20	Benz[a]antracenas	56-55-3	*Nejungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nejungiama medžiaga ([3])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nejungiama medžiaga ([3])	Aromatinis angliavandenilis	Tarpinis produktas
21	Enterolaktonas	78473-71-9	*Jungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Jungiama medžiaga	Fitoestrogenas	Gamtinis produktas
22	Progesteronas	57-83-0	*Nejungiama medžiaga* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga	Steroidas	Gamtinis produktas

	Medžiagos pavadinimas	CAS RN	Numanomas atsakas	FW bandymas		CERI bandymas		MESH cheminė klasė	Produkto klasė
				Koncentracijos intervalas (M)	Klasifikavimas	Koncentracijos intervalas (M)	Klasifikavimas		
23	Oktiltrietoksisilanas	2943-75-1	*Nejungiama medžiaga*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nejungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Nejungiama medžiaga	Silanas	Paviršiaus įtempties modifikatorius
24	Atrazinas	1912-24-9	*Nejungiama medžiaga* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Nejungiama medžiaga	Heterociklinis junginys	Herbicidas

(*) Tirpumo riba < 1×10^{-4} M.

(**) Di-n-butilftalato (DBP) naudojimas ir klasifikavimas kaip nejungiamos medžiagos buvo pagrįstas ne didesnės 10^{-4} M koncentracijos bandymais, nes atliekant parengiamojo patvirtinimo tyrimus kai kurios laboratorijos pastebėjo, kad medžiaga netirpsta esant 10^{-3} M (pvz., drumstumas).

(1) Atliekant patvirtinimo tyrimą, di-*n*-butilftalatas (DBP) buvo bandomas kaip užkoduota bandomoji cheminė medžiaga, esant mažesnei kaip 10^{-3}M koncentracijai. Šiomis sąlygomis kai kuriose laboratorijose buvo stebimas žymėtojo ligando prijungimo sumažėjimas esant didžiausiajai koncentracijai (10^{-3} M) ir (arba) nevienareikšmiškas kreivės priderinimas. Atliekant šiuos atskirus bandymus, DBP buvo klasifikuojamas kaip „abejotinas“ arba „jungiama medžiaga“ 3/5 laboratorijų, naudojančių CERI bandymą, ir 5/6 laboratorijų, naudojančių FW bandymą (žr. (2) nuorodos IV.B.3a,b ir VI.A skirsnius).

(2) Klasifikacija neatitiko numanomos klasifikacijos. 4-*n*-heptilfenolio priskyrimas „abejotinai“ arba „nejungiamai medžiagai“ 3/5 laboratorijų davė vidutinę klasifikacija kaip abejotinos medžiagos. Nuodugnesnis tikrinimas parodė, kad tai buvo susiję cheminės medžiagos tirpumo apribojimais, kurie trukdė gauti visą prijungimo kreivę.

(3) Atliekant patvirtinimo tyrimą, benz(a)antracenas buvo perklasifikuotas į nejungiamą medžiagą (t. y. neigiamą), atsižvelgiant į paskelbtus literatūrinius duomenis, įrodančius, kad šiai medžiagai patvirtintas *in vitro* estrogeninis aktyvumas (16) visų pirma priklauso nuo jos metabolinio aktyvinimo(17)(18). Medžiagos fermentinis metabolinis aktyvinimas nebūtų numatytas, atliekant prijungimo prie ląstelių laisvojo hrER bandymus, kurie naudojami atliekant šį tarplaboratorinį patvirtinimo tyrimą. Todėl tinkamas šios medžiagos klasifikavimas yra „nejungiama medžiaga“, kai naudojama FW ir CERI bandymų sąlygomis.

PRIJUNGIMO PRIE HRER BANDYMO KOMPONENTAI

Pagrindiniai bandymo komponentai

14. Šis bandymo metodas taikomas atliekant bandymus, naudojančius ER receptorių ir pakankamai stiprų receptoriaus ligandą, kuris gali būti naudojamas kaip bandymo žymeklis ir gali būti pavaduotas vis didesnės koncentracijos bandomąja chemine medžiaga. Prijungimo bandymus sudaro tokie du pagrindiniai komponentai: 1) sotinamasis prijungimas ir 2) konkurencinis prijungimas. Sotinamojo prijungimo bandymas naudojamas receptoriaus preparatų specifiškumui ir aktyvumui patvirtinti, kai konkurencinio prijungimo bandymas naudojamas bandomosios cheminės medžiagos gebėjimui jungtis prie hrER įvertinti.

Kontroliniai ėminiai

15. Turėtų būti aprašytas pasiūlyto konkurencinio etaloninio estrogeno ir kontrolinių medžiagų pagrindimas. Vienalaikiai kontroliniai ėminiai (tirpiklio (nešiklio), teigiami (prie ER jungiamos medžiagos; stipriai ir silpnai gimininggos), neigiami (nejungiamos medžiagos)), jei tinka, naudojami kaip rodiklis, kad bandymas yra veiksmingas bandymo sąlygomis ir sudaro pagrindą bandymus lyginti tarpusavyje; paprastai jie yra tam tikro bandymo priimtinumo kriterijai (1). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių (t. y. silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos) visų koncentracijos verčių kreivės turėtų būti naudojamos vienoje plokštelėje atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Visose kitose plokštelėse turėtų būti: 1) po tris E2 ir silpnai jungiamos medžiagos didelės (maždaug visiškas pavadavimas radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando) ir vidutinės (maždaug IC_{50}) koncentracijos kartotinius ėminius; 2) po tris kartotinius tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius.

Standartinės kokybės kontrolės procedūros

16. Turėtų būti atliekamos kiekvienam bandymui aprašytos standartinės kokybės kontrolės procedūros, siekiant užtikrinti receptorių aktyvumą, tinkamas cheminių medžiagų koncentracijas, stabilias daugelio kartotinių bandymų leidžiamųjų nuokrypų ribas, ir ilgą laiką išsaugoti gebėjimą duoti tikėtinus prijungimo prie ER atsakus.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

17. Prieš nežinomų cheminių medžiagų bandymus pagal šį bandymo metodą, kiekviena laboratorija turėtų įrodyti bandymo šiuo metodu kvalifikaciją, atlikdama sotinamojo prijungimo bandymus ER preparato specifiškumui ir aktyvumui patvirtinti bei etaloninio estrogeno ir kontrolinių medžiagų (silpnai jungiamos ir nejungiamos medžiagos) konkurencinio prijungimo bandymus. Laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kurioje būtų etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių rezultatai, gauti skirtingomis dienomis atliekant 3–5 nepriklausomus bandymus. Šie bandymai būtų laboratorijos etaloninio estrogeno ir istorinių kontrolinių ėminių duomenų pagrindas ir būtų naudojami kaip bandymo priimtinumo vertinimo dalis, ateityje atliekant atskirus bandymus.

18. Bandymo sistemos jautris taip pat būtų patvirtintas bandant kvalifikacijai įrodyti skirtas medžiagas, išvardytas 2 lentelėje. Kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas sudaro prijungimo prie ER bandymams skirtuose naudojimo charakteristikų standartuose pateiktų etaloninių medžiagų rinkinio dalį (3). Šių medžiagų yra prekyboje, jos reprezentuoja cheminių medžiagų klases, paprastai susijusias su prijungimo prie ER aktyvumu, rodo tinkamą prie ER jungiamų medžiagų (t. y. nuo silpnų iki stiprių) ir nejungiamų (t. y. neigiamų) medžiagų tikėtino veiksmingumo intervalą. Kiekvienos kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos bandymo koncentracija turėtų aprėpti 2 lentelėje nurodytą intervalą. Turėtų būti atliekami bent trys kiekvienos medžiagos bandymai, kurių rezultatai turėtų atitikti numanomą cheminį aktyvumą. Kiekvienas bandymas turėtų būti atliekamas nepriklausomai (t. y. iš naujo skiedžiant receptoriaus, cheminių medžiagų ir reagento tirpalus), ruošiant tris kiekvienos koncentracijos kartotinius ėminius. Kvalifikacija įrodoma, jei teisingai klasifikuojama kiekviena kvalifikacijai įrodyti skirta medžiaga (teigiama ar neigiama). Kvalifikaciją turėtų pasitikrinti kiekvienas laborantas, kai mokosi atlikti bandymus.

2 lentelė

hrER konkurencinio prijungimo bandymų kontrolinių medžiagų ir kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų sąrašas [1]

Nr.	Medžiagos pavadinimas	CASRN [2]	Numanomas atsakas [3] [4]	Bandymo koncentracijos intervalas (M)	MESH cheminė klasė [5]	Produkto klasė [6]
Kontrolinės medžiagos (etaloninis estrogenas, silpnai jungiama medžiaga, nejungiama medžiaga)						
1	17−εστραδιολισ	50-28-2	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
2	Noretinodrelis (arba) noretindronas	68-23-5 (arba) 68-22-4	Jungiama medžiaga	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
3	Oktiltrietoksisilanas	2943-75-1	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Silanas	Paviršiaus įtempties modifikatorius
Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos [6]						
4	Dietilstilbestrolis	56-53-1	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
5	17α-etinilestradiolis	57-63-6	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroidas	Vaistai, veterinarijos priemonė
6	*Mezo*-heksestrolis	84-16-2	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Angliavandenilis (ciklinis), fenolis	Vaistai, veterinarijos priemonė
7	Tamoksifenas	10540-29-1	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Angliavandenilis (ciklinis)	Vaistai, veterinarijos priemonė
8	Genisteinas	446-72-0	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Heterociklinis junginys, flavonoidas	Gamtinis produktas

Nr.	Medžiagos pavadinimas	CASRN ([2])	Numanomas atsakas ([3]) ([4])	Bandymo koncentracijos intervalas (M)	MESH cheminė klasė ([5])	Produkto klasė ([6])
9	Bisfenolis A	80-05-7	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Fenolis	Tarpinis cheminis produktas
10	Zearalononas	17924-92-4	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Heterociklinis junginys, laktonas	Gamtinis produktas
11	Butilparabenas	94-26-8	Jungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Karboksirūgštis, fenolis	Konservantas
12	Atrazinas	1912-24-9	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Heterociklinis junginys	Herbicidas
13	Di-*n*-butilftalatas (DBP) ([7])	84-74-2	Nejungiama medžiaga ([8])	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Angliavandenilis (ciklinis), esteris	Plastifikatorius, tarpinis cheminis produktas
14	Kortikosteronas	50-22-6	Nejungiama medžiaga	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-4}$	Steroidas	Gamtinis produktas

([1]) Jei kvalifikacijai įrodyti skirtų medžiagų nebėra prekyboje, gali būti naudojama tos pačios prijungimo prie ER klasės, palyginamo veiksmingumo ir tos pačios cheminių medžiagų klasės medžiaga.
([2]) Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.
([3]) Klasifikavimas kaip prie ERα jungiamos medžiagos ar nejungiamos medžiagos atliekant CERI ir FW prijungimo prie hrER bandymų patvirtinimo tyrimą (2).
([4]) Prijungimo prie ER aktyvumas buvo pagrįstas prijungimo prie ER ir TA bandymų ICCVAM bendraisiais apžvalginiais dokumentais (BRD) (9), taip pat empiriniais duomenimis ir kita informacija, gauta iš paskelbtų ir peržiūrėtų nuorodose pateiktų bandymų (10) (11) (12) (13) (14) (15).
([5]) Cheminė klasė buvo priskirta medžiagoms, naudojant JAV Nacionalinės medicinos bibliotekos Vaistų mediciniių dalykines antraštes (MeSH), tarptautiniu mastu pripažintą standartizuota klasifikavimo schemą (adresu: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Medžiagos buvo priskirtos vienai ar daugiau produktų klasių, naudojant JAV nacionalinės medicinos bibliotekos pavojingųjų medžiagų duomenų bazę (adresu: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
([7]) DBP gali būti naudojamas kaip alternatyvi kontrolinė nejungiama medžiaga, kai jos didžiausia koncentracija yra 10^{-4} M.
([8]) Šios medžiagos tirpumo riba yra 10^{-4} M. Di-n-butilftalato (DBP) naudojimas ir klasifikavimas kaip nejungiamos medžiagos yra pagrįstas ne didesnės 10^{-4} M koncentracijos bandymais, nes atliekant parengiamojo patvirtinimo tyrimus kai kurios laboratorijos pastebėjo, kad medžiaga netirpsta esant 10^{-3} M (pvz., drumstumas).

Bandomųjų cheminių medžiagų tirpumo bandymas ir koncentracijos intervalo nustatymas

19. Reikėtų atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima nustatyti kiekvienos cheminės medžiagos tirpumo ribą ir identifikuoti reikiamą koncentracijos intervalą, kuris būtų naudojamas bandymui atlikti. Iš pradžių turi būti nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo tirpiklyje riba ir vėliau patvirtinama bandymo sąlygomis. Didžiausia bandoma koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 mM. Intervalo nustatymo bandymą sudaro tirpiklio kontrolinio ėminio ir aštuonių pagal logaritminę eilutę atskiestų tirpalų bandymas, pradedant didžiausiąja leidžiama koncentracija (pvz., 1 mM ar mažesne, atsižvelgiant į tirpumo ribą) ir esant drumstumui ar nuosėdoms. Antrojo ir trečiojo bandymo koncentracijos turėtų būti atitinkamai koreguojamos, kad būtų galima geriau apibūdinti atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Atskiro bandymo priimtinumo kriterijai

20. Atskiro bandymo priėmimas arba atmetimas grindžiamas kiekvieno bandymo etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių rezultatų įvertinimu. Visų pirma, kiekvieno bandymo 1 plokštelės etaloninių kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės turėtų atitikti kreivės priderinimo parametrams (pvz., IC_{50} ir Hillo krypties koeficientui) taikomus veiksmingumo matus, pagrįstus paskelbtais atitinkamų CERI ir FW bandymų protokolų rezultatais (2 ir 3 priedėliai) ir bandymą atliekančios laboratorijos istoriniais kontrolinių ėminių duomenimis. Visos kontrolinės medžiagos (etaloninis estrogenas, silpnai jungiama medžiaga ir nejungiama medžiaga) turėtų būti tinkamai klasifikuojamos atliekant kiekvieną bandymą. Antra, visų kitų plokštelių kontroliniai ėminiai turi būti vertinami dėl suderinamumo su 1 plokštele. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pakankamai platus, kad būtų galima aiškiai nustatyti konkurencinio prijungimo kreivės viršutinę dalį. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinių ėminių, taip pat trijų nepriklausomų atskirų bandymų rezultatų kintamumas turėtų būti priimtinas ir moksliškai pagrįstas. Gebėjimas nuosekliai atlikti bandymą turėtų būti įrodytas sukuriant ir tvarkant etaloninio estrogeno ir kontrolinių medžiagų istorinių duomenų bazę. Kaip laboratorijos atkuriamumo matą galima naudoti kartotinių bandymų skaičiui gautų etaloninių estrogeno ir kontrolinės silpnai jungiamos medžiagos kreivių priderinimo parametrų vidurkių standartinius nuokrypius (SN) arba variacijos koeficientus (VK). Atliekant kiekvieno atskiro bandymo, taip pat kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos plokštelių kontrolinių ėminių rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai.

Be to, reikėtų atitikti šiuos priimtinumo kriterijams taikomus principus:

— duomenų turėtų pakakti prijungimo prie ER kiekybiniam vertinimui;

— bandymo koncentracijos turėtų atitikti bandomosios cheminės medžiagos tirpumo intervalą.

Duomenų analizė

21. Taikant nustatytą sotinamojo ir konkurencinio prijungimo duomenų analizės procedūrą, būtina laikytis pagrindinių receptoriaus ir ligandų sąveikų apibūdinimo principų. Paprastai sotinamojo prijungimo duomenys analizuojami naudojant netiesinės regresijos modelį, kuris atsižvelgia į bendrąjį ir nespecifinį prijungimą. Gali prireikti koregavimo dėl ligando kiekio sumažėjimo (pvz., Swillens, 1995 m. (19)), kai nustatoma B_{max} ir K_d. Konkurencinio prijungimo bandymų duomenys paprastai transformuojami (pvz., specifinio prijungimo procentinė dalis ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (log (M)). Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos log (IC_{50}) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hillo lygčiai priderinti. Baigus pradinę analizę, reikėtų atlikti kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurtai konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Kartais gali tekti atlikti papildomą analizę geriausiam kreivės priderinimui gauti (pvz., riboti kreivės viršų ir (arba) apačią, taikyti 10 % taisyklę, žr. 4 priedėlį ir 2 nuorodą (III.A.2 skirsnį).

22. Atitiktis priimtinumo kriterijams (20 pastraipa) rodo tinkamą bandymo sistemos veikimą, bet tai neužtikrina, kad atliekant konkretų bandymą bus gauti tikslūs duomenys. Pirmojo bandymo tikslių rezultatų pakartojimas yra geriausias tikslių duomenų gavimo rodiklis.

Bendrieji duomenų aiškinimo kriterijai

23. Šiuo metu nėra visuotinai sutarto prijungimo prie ER duomenų aiškinimo metodo. Tačiau hrER tarpininkaujamo aktyvumo kokybinius (pvz., jungiama ar nejungiama medžiaga) ir (arba) kiekybinius (pvz., IC_{50}, santykinis prijungimo gimiringumas (RBA) ir kt.) vertinimo rezultatus reikėtų pagrįsti empiriniais duomenimis ir svariais moksliniais įrodymais.

Bandymo ataskaita

24. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandymas:

— naudotas bandymas;

Kontrolinė medžiaga, pamatinis etalonas, bandomoji cheminė medžiaga;

— šaltinis, partijos numeris, naudojimo pabaigos data, jei yra;

— pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;

— pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

— apibūdinimas (tipas, tiekėjas ir partija);

— tirpiklio ir (arba) nešiklio pasirinkimo pagrindimas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje ar nešiklyje, jei yra žinomas;

Receptoriai:

— receptorių šaltinis (tiekėjas, katalogo Nr., partija, receptoriaus rūšis, tiekėjo nurodyta aktyvioji receptoriaus koncentracija, tiekėjo sertifikatas);

— receptorių apibūdinimas (įskaitant sotinamojo prijungimo rezultatus): K^d, B_{max},

— receptorių laikymo sąlygos;

— radioaktyviuoju izotopu žymėtas ligandas:

— tiekėjas, katalogo Nr., partija, savitasis aktyvumas;

Bandymo sąlygos:

— tirpumo apribojimai bandymo sąlygomis;

— prijungimo buferinio tirpalo sudėtis;

— receptoriaus koncentracija;

— izotopinio žymeklio (t. y. radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando) koncentracija;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija;

— nešiklio procentinė dalis atliekant galutinį bandymą;

— inkubavimo temperatūra ir trukmė,

— prijungto ir laisvojo kiekio atskyrimo metodas;

— teigiamos ir neigiamos kontrolinės ir (arba) etaloninės medžiagos;

— bandymų vertinimo kaip teigiamų, neigiamų ar abejotinų kriterijai;

Priimtinumo tikrinimas:

— vienalaikių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių ir (arba) etaloninių medžiagų faktinės IC_{50} ir Hillo krypties koeficiento vertės;

Rezultatai:

— neapdoroti ir prijungto bei laisvojo kiekio duomenys;

— denatūravimo patvirtinamasis tikrinimas, jei tinka;

— mažiausioji efektyvioji koncentracija (LEC), jei yra;

— RBA ir (arba) IC_{50} vertės, jei tinka;

— koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,

— statistinės analizės duomenys, jei yra, kartu su paklaidų ir pasikliovimo matu (pvz., vidurkio standartinė paklaida, SN, VK arba 95 % pasikliovimo intervalas) ir šių verčių gavimo būdo aprašymas;

Rezultatų aptarimas

— 10 % taisyklės taikymas.

Išvada

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 priedėlis

APIBRĖŽTYS IR SANTRUMPOS

10 % taisyklė– galimybė pašalinti iš analizės duomenų taškus, kurių kartotinių ėminių [^{3}H]17β-estradiolio specifinio prijungimo vidurkio procentinė dalis yra 10 % arba daugiau didesnė nei esant mažesnei koncentracijai stebima vidutinė vertė (žr.
4 priedėlį).

Priimtinumo kriterijai– minimalūs reikalavimai, keliami bandymo kontrolinių ėminių ir pamatinių etalonų bandymo rezultatams. Būtina atitikti visus priimtinumo kriterijus, kad bandymą būtų galima laikyti tinkamu.

Tikslumas (sutapimas)– bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (1).

CF– endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo EBPO konceptuali sistema (angl. *Conceptual Framework*).

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

VK– variacijos koeficientas.

E2– 17β-estradiolis

ED– endokrininės sistemos ardymas

hERα– žmogaus estrogenų receptoriaus alfa.

ER– estrogenų receptorius.

Estrogeninis aktyvumas– cheminės medžiagos gebėjimas rodyti panašias į 17β-estradiolio savybes jungtis prie estrogenų receptorių. Prisijungimas prie hERα gali būti aptiktas šiuo bandymo metodu.

IC_{50}– pusė didžiausiosios efektyviosios slopinančios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

ICCVAM– alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas.

Atkuriamumas tarp laboratorijų– laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, naudodamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas, atliekant parengiamąjį patvirtinimą ir tinkamumo patvirtinimą, ir rodo laipsnį, kuriuo bandymas gali būti sėkmingai perkeliamas tarp laboratorijų; taip pat vadinamas tarplaboratoriniu atkuriamumu (1).

Atkuriamumas laboratorijoje– laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, skirtingu metu naudodami tam tikrą protokolą, matas. Dar vadinamas *laboratoriniu atkuriamumu* (1).

LEC– mažiausioji efektyvioji koncentracija (angl. lowest effective concentration) yra mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant gaunamas atsakas (t. y. mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant indukcijos pokytis kartais statistiškai skiriasi nuo vienalaikio nešiklio kontrolinio ėminio).

„Aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymas– šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriniu ir funkciniu požiūriu panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Taikomas kaip lygiavertis terminui „panašus bandymo metodas“.

PBTG– į rezultatus orientuotos bandymo gairės.

Naudojimo charakteristikų standartai– patvirtintu bandymo metodu pagrįsti standartai, kurie yra pagrindas įvertinti mechanizmo ir funkciniu požiūriu panašaus siūlomo bandymo metodo palyginamumą. Įtraukti: 1) esminiai bandymo metodo komponentai; 2) etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų patvirtinto bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, būtinasis sąrašas; ir 3) palyginamieji tikslumo bei patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtintam bandymo metodui, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų rodyti, kai yra įvertinamas naudojant būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (1).

Kvalifikacijai įrodyti skirtos medžiagos– į naudojimo charakteristikų standartus įtrauktų etaloninių medžiagų, kurias laboratorijos gali naudoti, norėdamos įrodyti standartizuoto bandymo metodo taikymo techninę kompetenciją, rinkinio dalis. Šių medžiagų atrankos kriterijus paprastai sudaro jų atitiktis atsakų intervalui, galimybė jų nusipirkti ir aukštos kokybės etaloninių duomenų buvimas.

Kvalifikacija– įrodytas gebėjimas tinkamai atlikti bandymą prieš bandant nežinomas medžiagas.

Etaloninis estrogenas– 17β-estradiolis (E2, CAS 50-28-2).

Pamatiniai bandymo metodai– bandymai, kuriais pagrįstos PBTG 493.

RBA– santykinis prijungimo gimiringumas (angl. *Relative Binding Affinity*). Medžiagos RBA skaičiuojamas kaip procentais išreikštas medžiagos log (IC_{50}) ir 17β-estradiolio log (IC_{50}) santykis.

Tinkamumas– santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio apibūdinimas bei bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo nustatymas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymo metodo tikslumo (atitikties) aspektą (1).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo, ilgą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų.

SN– standartinis nuokrypis

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas– bandymo metodas, kurio tinkamumo tam tikram tikslui pasiekti patvirtinimo tyrimai buvo atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti (1).

Tinkamumo patvirtinimas– tam tikro būdo, metodo, bandymo, proceso ar vertinimo patikimumo ir tinkamumo nurodytam tikslui nustatymo procesas (1).

2 priedėlis

FREYBERGER-WILSON IN VITRO ESTROGENŲ RECEPTORIAUS (ERA) SOTINAMOJO IR KONKURENCINIO PRIJUNGIMO BANDYMAI, NAUDOJANT VISO ILGIO REKOMBINANTINĮ ESTROGENŲ RECEPTORIŲ ERA

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Atliekant šį *in vitro* sotinamojo ir konkurencinio prijungimo prie estrogenų receptoriaus (ERα) bandymą naudojamas viso ilgio žmogaus estrogenų receptorius ERα(hrERα), kuris gaunamas ir išskiriamas iš bakulovirusu infekuotų vabzdžių ląstelių. Buvo atliktas Freyberger ir Wilson sukurto protokolo tarplaboratorinis patvirtinimo tyrimas (2), kuris įrodė protokolo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą bandymo tikslą.

2. Šis bandymas yra atrankos procedūra, skirta identifikuoti medžiagas, kurios gali prisijungti prie viso ilgio hrERα. Jis naudojamas nustatant bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą konkuruoti su 17β-estradioliu dėl prisijungimo prie hrERα. Kiekybinius bandymo duomenis gali sudaryti IC_{50} (bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuriai esant pavaduojama pusė prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio, matas) ir bandomųjų cheminių medžiagų santykinis prijungimo prie hrERα gimininguma palyginti su 17β-estradioliu. Cheminių medžiagų atrankos tikslais priimtinus kokybinius bandymo rezultatus gali sudaryti bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimas kaip prie hrERα jungiamų, nejungiamų arba abejotinų medžiagų pagal prijungimo kreivėms aprašytus kriterijus.

3. Atliekant bandymą naudojamas radioaktyvusis ligandas, todėl laboratorijai reikia gauti darbo su radioaktyviosiomis medžiagomis licenciją. Visos procedūros su radioaktyviaisiais izotopais ir pavojingosiomis cheminėmis medžiagomis turėtų atitikti reglamentus ir procedūras, aprašytas nacionaliniuose teisės aktuose.

4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti ***BENDRASIS ĮVADAS*** IR ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI***. Šiose bandymo gairėse vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

5. Atliekant prijungimo prie hrERα bandymą, matuojama radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando ([^{3}H]17β-estradiolio) gebėjimas prisijungti prie ER, didėjant bandomosios cheminės medžiagos (t. y. konkurento) koncentracijai. Didelį gimininguma ER turinčios bandomosios cheminės medžiagos konkuruoja su radioaktyviuoju izotopu žymėtu ligandu esant mažesnei koncentracijai palyginti su tomis cheminėmis medžiagomis, kurių gimininguma receptoriui yra mažesnis.

6. Šį bandymą sudaro du pagrindiniai komponentai: sotinamojo prijungimo bandymo, skirto apibūdinti receptoriaus ir ligando sąveikos parametrus, ir konkurencinio prijungimo bandymo, kuris apibūdina bandomosios cheminės medžiagos ir radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando konkurencija dėl prijungimo prie ER.

7. Sotinamojo prijungimo bandymo tikslas – apibūdinti prijungimo prie tam tikros receptorių grupės gimininguma ir jų skaičių, ruošiant konkurencinio prijungimo bandymą. Atliekant sotinamojo prijungimo bandymą pusiausvyros sąlygomis, nustatomas pastovios koncentracijos estrogeno receptoriaus gimininguma jo natūraliam ligandui (rodo disociacijos konstanta, K_d) ir aktyviųjų receptorių vietų koncentracija (B_{max}).

8. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas medžiagos gimininguma konkuruoti su [^{3}H]17β-estradioliu dėl prijungimo prie ER. Gimininguma kiekybiškai įvertinamas kaip bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri esant pusiausvyrai slopina 50 % [^{3}H]17β-estradiolio specifinio prijungimo (vadinama „50 % slopinamąja koncentracija“ arba IC_{50}). Jį taip pat galima įvertinti naudojant santykinį prijungimo gimininguma (RBA, atžvilgiu estradiolio IC_{50}, išmatuotos atskirai atliekant tą patį atskirą bandymą). Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas pastovios koncentracijos [^{3}H]17β-estradiolio prijungimas, esant dideliam bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalui (aštuonios dydžio eilės). Tada duomenys priderinami, jei įmanoma, Hillo lygčiai gauti (Hill, 1910 m.), kuri aprašo žymėtojo ligando pavadavimą konkurencine vienoje vietoje jungiama medžiaga. Radioaktyviuoju izotopu žymėto estradiolio pavadavimo esant pusiausvyrai laipsnis naudojamas bandomajai cheminei medžiagai apibūdinti kaip jungiamai, nejungiamai arba duodančiai abejotiną atsaką.

PROCEDŪRA

Priimtinų hrERα baltymo veikimo charakteristikų įrodymas

9. Prieš pradedant atlikti įprastinius sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus, reikėtų įrodyti, kad kiekvienos naujai gautos hrERα partijos savybės atitinka laboratorijos, kurioje ji bus naudojama, reikalavimus. Turėtų būti atliekamas dviejų veiksmų procesas tinkamumo charakteristikoms įrodyti. Tai būtų tokie veiksmai:

— Atliekamas [^{3}H]-17β-estradiolio sotinamojo prijungimo bandymas, kad būtų įrodytas hrERα specifiškumas ir prisotinimas. Šių duomenų netiesinės regresijos analizė (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.) ir vėliau gautas Scatchardo grafikas turėtų dokumentais patvirtinti kiekvienos hrERα partijos [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo prie hrERα giminingumą (K_d) ir receptorių skaičių (B_{max}).

— Atliekamas konkurencinio prijungimo bandymas, naudojant kontrolines medžiagas (etaloninį estrogeną (17β-estradiolį)), silpnai jungiamą medžiagą (pvz., noretinodrelį arba noretindroną) ir nejungiamą medžiagą (oktiltrietoksisilaną, OTES). Kiekviena laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kad būtų galima dokumentuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos IC_{50} ir kitų reikiamų verčių pastovumą tarp bandymų ir naudojant skirtingas hrERα partijas. Kontrolinių medžiagų konkurencinio prijungimo kreivių parametrai turėtų atitikti 95 % pasikliovimo intervalo ribas (žr. 1 lentelę), kurios buvo gautos naudojant šio bandymo patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų duomenis (2).

1 lentelė.

Etaloniniam estrogenui ir silpnai jungiamai medžiagai sukurti veiksmingumo kriterijai, atliekant FW prijungimo prie hrER bandymą

Medžiaga	Parametras	Vidurkis [a]	Standartinis nuokrypis (n)	95 % pasikliovimo intervalai [b]	
				Apatinė riba	Viršutinė riba
17β-estradiolis	Viršus (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Apačia (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hillo krypties koeficientas	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	Log IC_{50} (M)	–8,92 [c]	0,18 (67)	–8,97	–8,88
Noretinodrelis	Viršus (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Apačia (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillo krypties koeficientas	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	Log IC_{50} (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindronas [c]	Viršus (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Apačia (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillo krypties koeficientas	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	Log IC_{50}(M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

[a] Vidurkis (n) ± standartinis nuokrypis (SN) buvo apskaičiuoti naudojant kreivės priderinimo parametrų įverčius (4 parametrų Hillo lygties), patvirtinimo tyrimo metu gautus keturiose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus (žr. 2 nuorodos N priedą).

[b] 95 % pasikliovimo intervalai yra pateikti kaip priimtinumo kriterijų rodiklis.

[c] Noretindrono bandymas buvo neprivalomas kaip 4 papildomos užduoties bandymas atliekant patvirtinimo tyrimą (žr. 2 nuorodą, žr. 4 papildomą užduotį). Taigi, vidurkis ± SN (n) buvo apskaičiuojami naudojant kreivės priderinimo įverčius (4 parametrų Hillo lygties), dviejose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus.
IC_{50}*intervalas priklausys nuo receptoriaus kompozicijos* K_d *ir nuo kiekvienoje laboratorijoje naudojamo radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando koncentracijos. Būtų priimtinas atitinkamas* IC_{50}*intervalo koregavimas, atsižvelgiant į bandymui atlikti naudojamas sąlygas.*

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

10. Žr. šio bandymo metodo ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI*** 17 ir 18 pastraipas bei 2 lentelę. Kiekvieną bandymą (sotinamojo ir konkurencinio prijungimo) turėtų sudaryti trys skirtingomis dienomis atliekami atskiri bandymai (t. y. su iš naujo atskiestais receptoriaus, cheminių medžiagų ir reagentų tirpalais), ir kiekvienas atskiras bandymas būtų trijų kartotinių ėminių bandymas.

Receptoriaus (hrERα) koncentracijos nustatymas

11. Aktyviojo receptoriaus koncentracija kažkiek skiriasi priklausomai nuo partijos ir laikymo sąlygų. Dėl šios priežasties reikėtų nustatyti iš tiekėjo gauto aktyviojo receptoriaus koncentraciją. Taip būtų gauta atitinkama aktyviojo receptoriaus koncentracija atskiro bandymo atlikimo metu.

12. Nominaliosios 0,25, 0,5, 0,75 ir 1 nM koncentracijos receptorius turėtų būti inkubuojamas konkurencinio prijungimo sąlygomis (t. y. 1 nM [^{3}H]-estradiolio), nesant 1 μM nežymėtojo estradiolio (bendrasis prijungimas) ir jam esant (nespecifinis prijungimas). Braižoma specifinio prijungimo, apskaičiuojamo kaip bendrojo ir nespecifinio prijungimo skirtumas, priklausomybės nuo nominaliosios receptoriaus koncentracijos kreivė. Receptoriaus koncentracija, kuriai gaunamos specifinio prijungimo vertes, atitinkančios 20 % pridėto radioaktyviojo žymeklio, susiejama su atitinkama nominaliąja receptoriaus koncentracija, ir ši receptoriaus koncentracija turėtų būti naudojama atliekant sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus. Galutinė 0,5 nM hrER koncentracija dažnai atitiktų šią sąlygą.

13. Jei 20 % kriterijų negalima įvykdyti kelis kartus, reikėtų patikrinti bandymo schemą dėl galimų klaidų. Negebėjimas atitikti 20 % kriterijų gali rodyti, kad rekombinanto partijoje yra labai mažai aktyviojo receptoriaus, reikėtų spręsti klausimą dėl kitos receptoriaus partijos naudojimo.

Sotinamojo prijungimo bandymas

14. Reikėtų įvertinti tris kartotinius aštuonių didėjančių [^{3}H]17β-estradiolio koncentracijos verčių ėminius esant tokioms trims sąlygoms (žr. 2 lentelę):

— Nesant nežymėtojo 17β-estradiolio ir nesant ER. Taip nustatomas bendrasis prijungimas, matuojant radioaktyvumą šulinėliuose, kuriuose yra tik [^{3}H]17β-estradiolis.

— Esant 1 000 kartų didesnei nežymėtojo 17β-estradiolio koncentracijai palyginti su žymėtojo 17β-estradiolio koncentracija ir esant ER. Šios sąlygos tikslas – prisotinti aktyviąsias prijungimo vietas nežymėtuoju 17β-estradioliu ir matuojant radioaktyvumą šulinėliuose nustatyti nespecifinį prijungimą. Laikoma, kad visas likęs žymėtasis estradiolis, kuris galėtų jungtis prie receptoriaus, jungiasi prie nespecifinės vietos, nes nežymėtojo estradiolio koncentracija turėtų būti tokia didelė, kad jis prisijungtų prie visų esamų specifinių receptoriaus vietų.

— Nesant nežymėtojo 17β-estradiolio ir nesant ER (bendrojo radioaktyvumo nustatymas).

[^{3}H]-17β-estradiolio ir nežymėtojo 17β-estradiolio tirpalų ruošimas

15. Atskiesti [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalai turėtų būti ruošiami įpilant bandymo buferinio tirpalo į 12 nM [^{3}H]-17β-estradiolio pradinį tirpalą, kad gautos pradinės koncentracijos būtų nuo 0,12 nM iki 12 nM. Įpilant 40 μl šių tirpalų į atitinkamus 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlius (galutinio 160 μl tūrio), gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,03 nM iki 3,0 nM. Bandymo buferio, [^{3}H]-17β-estradiolio pradinio tirpalo ir atskiestų tirpalų ruošimas bei koncentracijos nustatymas yra nuodugniai aprašytas FW protokole (2).

16. Etanolinio 17β-estradiolio atskiesti tirpalai turėtų būti ruošiami įpilant bandymo buferinio tirpalo, kad būtų gauti aštuoni didėjančios pradinės koncentracijos nuo 0,06 μM iki 6 μM tirpalai. Įpilant 80 μl šių tirpalų į atitinkamus 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlius (galutinio 160 μl tūrio), gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,03 μM iki 3,0 μM. Galutinė nežymėtojo 17β-estradiolio koncentracija atskiruose nespecifinio prijungimo bandymo šulinėliuose turėtų būti 1 000 kartų didesnė nei žymėtojo [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracija. Nežymėtojo 17β-estradiolio atskiestų tirpalų ruošimas nuodugniai aprašytas FW protokole (2).

17. Reikėtų naudoti tokią nominaliąją receptoriaus koncentraciją, kuriai gaunamas 20±5 % specifinis prijungimas (žr. 12–13 pastraipas). hrERα tirpalą reikėtų ruošti prieš pat naudojimą.

18. 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės ruošiamos kaip parodyta 2 lentelėje, imant 3 kartotinius kiekvienos koncentracijos ėminius. [^{3}H]-17β-estradiolio, nežymėtojo 17β-estradiolio, buferinio tirpalo ir receptoriaus koncentracijos ir tūrio priskyrimo plokštelėje pavyzdys pateiktas 2.2 priedėlyje.

2 lentelė.

Sotinamojo prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema

	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			Bendrasis prijungimas (tirpiklis)
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] E_2 + ER+ 0,10 μM E_2			Nespecifinis prijungimas
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] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2 –: [3H]-17β-estradiolis.
ER –: estrogenų receptorius.
E2 –: nežymėtasis 17β-estradiolis

19. Bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti inkubuojamos nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje nuo 16 iki 20 h ir inkubavimo laikotarpiui dedamos ant sukamosios purtyklės.

Prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio matavimas

20. Prie hrERα prijungtą [^{3}H]-17β-estradiolį reikėtų atskirti nuo laisvojo [^{3}H]-17β-estradiolio, į kiekvieną šulinėlį įpilant 80 μl šaltos DCC suspensijos, 10 min purtant mikrotitravimo plokšteles ir centrifuguojant 10 min maždaug 2 500 aps/min greičiu. Siekiant kiek įmanoma sumažinti prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio ir hrERα disociaciją šio proceso metu, yra ypač svarbu, kad buferiniai tirpalai ir bandymo šulinėlių temperatūra būtų nuo 2 °C iki 8 °C ir kiekvienas veiksmas būtų atliekamas greitai. Būtinai reikia turėti mikrotitravimo plokštelių purtyklę, kad plokštelės būtų apdorojamos efektyviai ir greitai.

21. Tada ypač atsargiai reikėtų paimti 50 μl skysčio virš nuosėdų, kuriame yra prie hrERα prijungtas [^{3}H]-17β-estradiolis, kad būtų išvengta šulinėlių užteršimo dėl DCC patekimo, ir pernešti į antrąją mikrotitravimo plokštelę.

22. Į kiekvieną šulinėlį (nuo A1 iki B12 ir nuo D1 iki E12) įpilama po 200 μl scintiliacijų skysčio, galinčio paversti kinetinę branduolių spinduliuotės energiją šviesos energija. G1-H12 šulinėliai (identifikuojami kaip bendrojo skilimų per minutę skaičiaus (dpm) šulinėliai) yra [^{3}H]-17β-estradiolio vienu santykiu atskiesti tirpalai (40 μl), kuriuos reikėtų tiesiogiai įpilti į matavimo šulinėlių scintiliacijų skystį, kaip nurodyta 3 lentelėje, t. y. šiuose šulinėliuose yra tik 200 μl scintiliacijų skysčio ir atitinkamos koncentracijos [^{3}H]-17β-estradiolio. Šie matavimai rodo, kiek dpm vienetais išreikšto [^{3}H]-17β-estradiolio buvo įdėtą į kiekvieną bendrojo prijungimo ir nespecifinio prijungimo šulinėlių rinkinį.

3 lentelė.

Sotinamojo prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, radioaktyvumo matavimas

	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			Bendrasis prijungimas (tirpiklis)
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] E_2+ ER+ 0,10 μM E_2			Nespecifinis prijungimas
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] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G	0,03 nM [3H] E_2 (bendrasis dpm)			0,06 nM [3H] E_2			0,08 nM [3H] E_2			0,10 nM [3H] E_2			Bendrasis 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			

[3H] E2 –: [3H]-17*β*-estradiolis.
ER –: estrogenų receptorius.
E2 –: nežymėtasis 17*β*-estradiolis;
dpm –: skilimų per minutę skaičius.
(*) Žymėtojo [^{3}H]-17*β*-estradiolio vienu santykiu atskiesti tirpalai turėtų būti tiesiogiai įpilami į 200 μl scintiliacijų skysčio G1–H12 šulinėliuose.

23. Matavimą reikėtų pradėti praėjus mažiausiai 2 h, ir skaičiavimo trukmė turėtų būti 40 min kiekvienam šulinėliui. Reikėtų naudoti mikrotitravimo plokštelės scintiliacijų skaitiklį dpm/šulinėliui nustatyti, koreguojant dėl gesinimo. Arba, jei mikrotitravimo plokštelės scintiliacijų skaitiklio nėra, ėminius galima matuoti įprastu skaitikliu. Šiomis sąlygomis galbūt būtų galima sumažinti skaičiavimo trukmę.

Konkurencinio prijungimo bandymas

24. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas vienos koncentracijos [^{3}H]-17*β*-estradiolio prijungimas, esant vis didesnei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Atliekant atskirą bandymą, turėtų būti po tris vienalaikius vienos koncentracijos ėminius. Be to, turėtų būti atliekami trys nevienalaikiai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiri bandymai. Bandymas turėtų būti ruošiamas vienoje 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelėje arba jų gali būti daugiau.

Kontroliniai ėminiai

25. Atliekant bandymą, į kiekvieną jų reikėtų įtraukti vienalaikius tirpiklio ir kontrolinius ėminius (t. y. etaloninio etalono, silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių (t. y. silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos) visų koncentracijos verčių kreivės turėtų būti naudojamos vienoje plokštelėje atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Visose kitose plokštelėse turėtų būti i) po tris didžiausios (didžiausio pavadavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; ii) ne mažiau kaip po tris kartotinius tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius. Bandymo buferinio tirpalų, kontrolinių medžiagų, [^{3}H]-17*β*-estradiolio, hrERα ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpalų ruošimo procedūros aprašytos 2 nuorodoje (K priedas, žr. FW bandymo protokolą).

Tirpiklio kontrolinis ėminys:

26. Tirpiklio kontrolinis ėminys rodo, kad nėra tirpiklio sąveikos su bandymo sistema, ir taip pat matuojamas bendrasis prijungimas (TB). Tinkamiausias tirpiklis yra etanolis. Arba galima naudoti DMSO, jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga netirpsta etanolyje. Etanolio arba DMSO, jei naudojamas, koncentracija galutinio bandymo šulinėliuose yra 1,5 % ir negali viršyti 2 %.

Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys:

27. Buferinio tirpalo kontroliniame ėminyje (BK) neturėtų būti tirpiklio ar bandomosios cheminės medžiagos, bet turėtų būti visi kiti bandymo komponentai. Buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai lyginami su tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai.

Stipriai jungiama medžiaga (etaloninis estrogenas)

28. 17*β*-estradiolis (CAS 50-28-2) yra endogeninis ligandas, kurio prijungimo prie alfa potipio ER gimiringumas yra didelis. Turėtų būti gauta kiekvieno konkurencinio prijungimo prie hrERα bandymo standartinė kreivė, naudojant nežymėtąjį 17*β*-estradiolį, kad būtų galima vertinti kintamumą, kai bandymas ilgą laiką atliekamas toje pačioje laboratorijoje. Reikėtų paruošti aštuonis nežymėtojo 17*β*-estradiolio tirpalus etanolyje, kai koncentracijų bandymo šulinėliuose intervalas yra nuo 100 nM iki 10 pM (nuo −7[log(M)/l)] iki −11[log(M)]) ir jos skiriasi taip: (−7[log(M)], −8[log(M)], −8,5[log(M)], −9[log(M)], −9,5[log(M)], −10[log(M)], −11[log(M)]). Didžiausios koncentracijos nežymėtasis 17*β*-estradiolis (1 μM) taip pat naudojamas kaip nespecifinio prijungimo indikatorius. Ši koncentracija 4 lentelėje pažymėta kaip nespecifinis prijungimas (NSB), nors ji taip pat yra standartinės kreivės dalis.

Silpnai jungiama medžiaga

29. Reikėtų įtraukti silpnai jungiamą medžiagą (noretinodrelį (CAS68-23-5) arba noretindroną (CAS 68-22-4)), kad būtų įrodytas kiekvieno bandymo jautris ir kad būtų galima įvertinti kintamumą, kai bandymas atliekamas ilgą laiką. Reikėtų paruošti aštuonis silpnai jungiamos medžiagos tirpalus etanolyje, kai koncentracijų bandymo šulinėliuose intervalas yra nuo 3 nM iki 30 μM (nuo −8,5[log(M)] iki −4,5[log(M)]) ir jos skiriasi taip: −4,5[log(M)], −5[log(M)], −5,5[log(M)], −6[log(M)], −6,5[log(M)], −7[log(M)],−7,5[log(M)], −8,5[log(M)].

Nejungiama medžiaga

30. Kaip neigiama kontrolinė medžiaga (nejungiama medžiaga) turėtų būti naudojamas oktiltrietoksisilanas (OTES, CAS 2 943-75-1). Taip užsitikrinama, kad atliekant bandymą bus nustatytos bandomosios cheminės medžiagos, kurios nesijungia prie hrERα. Reikėtų paruošti aštuonis silpnai jungiamos medžiagos tirpalus etanolyje, kai koncentracijų bandymo šulinėliuose intervalas yra nuo 0,1 nM iki 1 000 μM (nuo −10[log(M)] iki −3[log(M)]), log prieaugiais. Di-*n*-butilftalatas (DBP) gali būti naudojamas kaip alternatyvi kontrolinė nejungiama medžiaga. Buvo įrodyta, kad jo didžiausias tirpumas yra −4[log(M)].

hrERα koncentracija

31. Reikėtų naudoti tokį receptoriaus kiekį, kuriam gaunamas 1 nM žymėtojo ligando 20±5 % specifinis prijungimas (žr. 2 priedėlio 12–13 pastraipas). hrERα tirpalą reikėtų ruošti prieš pat naudojimą.

[^{3}H]-17β-estradiolis

32. [^{3}H]-17*β*-estradiolio koncentracija bandymo šulinėliuose turėtų būti 1,0 nM.

Bandomosios cheminės medžiagos

33. Iš pradžių būtina atlikti tirpumo bandymą, kad būtų nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo riba ir identifikuotas reikiamas koncentracijos intervalas, kuris būtų naudojamas pagal bandymo protokolą. Iš pradžių turi būti nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo tirpiklyje riba ir vėliau patvirtinama bandymo sąlygomis. Didžiausia bandoma koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 mM. Intervalo nustatymo bandymą sudaro tirpiklio kontrolinio ėminio ir 8 pagal logaritminę eilutę atskiestų tirpalų bandymas, pradedant didžiausiąja leidžiama koncentracija (pvz., 1 mM ar mažesne, atsižvelgiant į tirpumo ribą) ir esant drumstumui ar nuosėdoms (taip pat žr. 35 pastraipą). Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma naudojant pagal logaritminį mastelį išdėstytų 8 koncentracijos verčių kreives, kaip nurodyta prieš tai aprašytame intervalo nustatymo bandyme. Antrojo ir trečiojo bandymo koncentracijos turėtų būti atitinkamai koreguojamos, kad būtų galima geriau apibūdinti atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

34. Atskiesti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti ruošiami atitinkamame tirpiklyje (žr. 2 priedėlio 26 pastraipą). Jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga neištirpsta etanolyje ar DMSO, ir įpilant daugiau tirpiklio jo koncentracija galutinio tirpalo mėgintuvėlyje viršytų leidžiama ribą, didžiausią koncentraciją galima sumažinti iki gretimos mažesnės koncentracijos. Šiuo atveju galima įtraukti dar vieną mažiausią koncentracijos verčių serijos koncentraciją. Kitos serijos koncentracijos turėtų likti tos pačios.

35. Į bandymo šulinėlį pilami bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti atidžiai stebimi, nes bandomoji cheminė medžiaga gali iškristi į nuosėdas ją pilant į šulinėlį. Visų šulinėlių, kuriuose yra nuosėdų, duomenys neturėtų būti įtraukiami į kreivės priderinimą, ir reikėtų nurodyti jų pašalinimo priežastį.

36. Jei yra kitų šaltinių ankstesnė informacija apie bandomosios cheminės medžiagos log(IC_{50}), galbūt tiktų atskiestų tirpalų koncentraciją išdėstyti pagal geometrinę progresiją (t. y. kas 0,5 log vieneto į abi puses nuo numanomos log(IC_{50}). Galutinis rezultatas turėtų rodyti pakankamą koncentracijų aprėptį į abi puses nuo log(IC_{50}), įskaitant „viršų“ ir „apačią“, kad būtų galima tinkamai apibūdinti prijungimo kreivę.

Išdėstymo bandymo plokštelėje schema

37. Žymėtųjų medžiagų mikrotitravimo plokštelės turėtų būti ruošiamos, atsižvelgiant į tai, kad inkubuojama po šešis kartotinius koduotus tirpiklio kontrolinius ėminius, didžiausios koncentracijos etaloninio estrogeno, kuris taip pat yra nespecifinio prijungimo (NSB) indikatorius, ėminius ir buferinio tirpalo kontrolinius ėminius, ir atsižvelgiant tai, kad inkubuojama po tris koduotus visų aštuonių koncentracijų nejungiamos kontrolinės medžiagos (oktiktrietoksisilano) ėminius, 7 mažesnės koncentracijos etaloninio estrogeno ėminius, aštuonių koncentracijų silpnai jungiamos medžiagos ėminius ir 8 kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminius (TC). Etaloninio estrogeno ir kontrolinio ėminio visų koncentracijos verčių kreivių plokštelės išdėstymo schemos pavyzdys pateiktas toliau 4 lentelėje. Naudojamos papildomos bandomųjų cheminių medžiagų plokštelės ir į jas reikėtų įtraukti plokštelės kontrolinius ėminius, t. y.: 1) po tris didžiausios (didžiausio pavadavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; 2) po šešis tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius (5 lentelė)). Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelių išdėstymo schemos pavyzdys, naudojant tris nežinomas bandomąsias chemines medžiagas, pateikiamas 2.3 priedėlyje. 4 ir 5 lentelėse nurodytos koncentracijos yra galutinės bandymo koncentracijos. Didžiausioji E2 koncentracija turėtų būti 1×10^{-7} M, ir, kalbant apie silpnai jungiamą medžiagą, turėtų būti naudojama silpnai jungiamos medžiagos 1 plokštelės koncentracija. Laboratorija turėtų nustatyti IC_{50} koncentraciją, pagrįsta istorinių kontrolinių ėminių duomenų baze. Tikimasi, kad ši vertė turėtų būti panaši į stebimą atliekant patvirtinimo tyrimus (žr. 1 lentelę).

4 lentelė.

Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės (1 plokštelė)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tik tirpiklis)			TB (tik tirpiklis)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Tuščiasis ėminys (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio) (**)			Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio) (**)			Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys			Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys		

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).
(*) Tikrasis tuščiasis ėminys, šulinėlis nenaudojamas.
(**) Tuščiasis ėminys, kuris nenaudojamas inkubavimo metu, bet naudojamas bendrajam pridėtam radioaktyvumui nustatyti.

5 lentelė.

Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, bandomųjų cheminių medžiagų ir plokštelės kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tik tirpiklis)			TB (tik tirpiklis)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).

Konkurencinio prijungimo bandymo atlikimas

38. Kaip parodyta 6 lentelėje, į šulinėlius reikėtų įpilti 80 µl tirpiklio kontrolinio ėminio, buferinio tirpalo kontrolinio ėminio, pamatinio estrogeno, silpnai jungiamos medžiagos, nejungiamos medžiagos ir bandymo buferiniame tirpale paruoštų bandomųjų cheminių medžiagų ėminių. Tada į kiekvieną šulinėlį reikėtų įpilti 40 µl 4 nM [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalo. Po nestipraus nuo 10 iki 15 min trukmės maišymo ant sukamosios purtyklės nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje, reikėtų įpilti 40 µl hrERα tirpalo. Bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti inkubuojamos nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje nuo 16 iki 20 h ir inkubavimo laikotarpiui dedamos ant sukamosios purtyklės.

6 lentelė.

Bandymo komponentų mikrotitravimo plokštelėse tūris, atliekant konkurencinio prijungimo prie hrER bandymą

Tūris (µl)	Sudedamoji dalis
80	Nežymėtasis 17β-estradiolis, noretinodrelis, OTES, bandomosios cheminės medžiagos, tirpiklis arba buferinis tirpalas
40	4 nM [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalas
40	hrERα tirpalas, koncentracija kaip nustatyta
160	***Bendrasis kiekvieno šulinėlio tūris***

39. Tada reikėtų atlikti prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio kiekybinį nustatymą, kaip aprašyta sotinamojo prijungimo bandymo 20–23 pastraipose, atskyrus prie hrERα prijungtą [^{3}H]-17β-estradiolį nuo laisvojo [^{3}H]-17β-estradiolio, į kiekvieną šulinėlį įpilant 80 µl šaltos DCC suspensijos.

40. H1-6 šulinėliai (identifikuojami kaip 4 lentelės tuštieji ėminiai (žymėtųjų ėminių)) rodo 40 µl esančio [^{3}H]-17β-estradiolio skilimų per minutę skaičių. 40 µl alikvotinį tūrį reikėtų įpilti tiesiai į scintiliacijų skystį H1–H6 šulinėliuose.

Priimtinumo kriterijai

Sotinamojo prijungimo bandymas

41. Naudojant vis didesnę [^{3}H]-17β-estradiolio koncentraciją, turėtų būti pasiekta specifinio prijungimo kreivės gulstė, kuri rodo hrERα prisotinimą ligandu.

42. Specifinis prijungimas, esant 1 nM [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracijai, turėtų patekti į priimtiną nuo 15 % iki 25 % bendrojo radioaktyvumo, pridėto atliekant visus atskirus bandymus, išmatuoto vidurkio intervalą. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją ir kartoti sotinamojo prijungimo bandymą.

43. Duomenims turėtų būti gautas tiesinis Scatchardo grafikas.

44. Nespecifinis prijungimas neturėtų būti per didelis. Nespecifinio prijungimo vertė paprastai turėtų būti < 35 % bendrojo prijungimo. Tačiau santykis kartais gali būti gerokai didesnis nei ši riba, kai bandant mažiausios koncentracijos radioaktyviuoju izotopu žymėtą 17β-estradiolį matuojamas labai mažas dpm.

Konkurencinio prijungimo bandymas

45. Vis didėjančios koncentracijos nežymėtasis 17β-estradiolis turėtų pavaduoti [^{3}H]-17β-estradiolį prie receptoriaus konkurencinį prijungimą vienoje vietoje atitinkančiu būdu.

46. Pamatinio estrogeno (t. y. 17β-estradiolio) IC_{50} vertė turėtų būti maždaug lygi molinei [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracijai plius K_d, nustatytą atliekant sotinamojo prijungimo bandymą.

47. Bendrasis specifinis prijungimas nuolat turėtų patekti į priimtiną 20 ± 5 % intervalą, kai atliekant visus atskirus bandymus į kiekvieną šulinėlį pridėto bendrojo radioaktyvumo vidutinė išmatuota koncentracija buvo 1 nM. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją.

48. Tirpiklis neturėtų pakeisti bandymo jautrį arba atkuriamumą. Tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatai (TB šulinėliai) lyginami su buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai. TB ir buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti palyginami, jei tirpiklis nedaro įtakos bandymui.

49. Nejungiama medžiaga neturėtų pavaduoti daugiau kaip 25 % prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio, kai jos bandymo koncentracija yra ne didesnė kaip 10^{-3} M (OTES) arba 10^{-4} M (DBP).

50. Veiksmingumo kriterijai buvo sukurti etaloniniam estrogenui ir dviem silpnai jungiamoms medžiagoms (pvz., noretinodreliui, noretindronui), naudojant FW prijungimo prie hrER bandymo patvirtinimo tyrimo duomenis (2 nuorodos N priedas). Pateikti visų patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų visų atskirtų kontrolinių ėminių atskirų bandymų vidurkio (n) ± SN 95 % pasikliovimo intervalai. Buvo apskaičiuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kreivės priderinimo parametrų (t. y. viršaus, apačios, Hillo krypties koeficiento, log IC_{50}) ir silpnai jungiamų medžiagų $\log_{10}$RBA atžvilgiu etaloninio estrogeno 95 % pasikliovimo intervalai, kurie yra pateikti kaip teigiamų kontrolinių ėminių veiksmingumo kriterijai. 1 lentelėje pateikti kreivės priderinimo parametrų, kurie gali būti naudojami kaip veiksmingumo kriterijai, tikėtini intervalai. Praktiškai IC_{50} intervalas gali kažkiek kisti priklausomai nuo receptoriaus kompozicijos K_d ir ligando koncentracijos.

51. Bandomųjų cheminių medžiagų kreivės priderinimo parametrų veiksmingumo kriterijai nebuvo sukurti dėl labai didelės grupės potencialių bandomųjų cheminių medžiagų ir dėl potencialaus gimininguмo bei rezultatų kitimo (pvz., visa kreivė, dalinė kreivė, nėra kreivės priderinimo). Tačiau, atliekant kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pakankamai platus (pvz., 90–100 % prijungimo), kad būtų galima aiškiai nustatyti konkurencinio prijungimo kreivės viršutinę dalį. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinių ėminių, taip pat 3 nevienalaikių atskirų bandymų rezultatų kintamumas turėtų būti priimtinas ir moksliškai pagrįstas. Kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo kontroliniai ėminiai turėtų artėti prie nurodytų šio FW bandymo veiksmingumo matų ir atitikti kiekvienos atitinkamos laboratorijos istorinius kontrolinių ėminių duomenis.

DUOMENŲ ANALIZĖ

Sotinamojo prijungimo bandymas

52. Matuojamas bendrasis ir nespecifinis prijungimas. Pagal šias vertes apskaičiuojamas didėjančios koncentracijos [^{3}H]-17β-estradiolio specifinis prijungimas pusiausvyros sąlygomis, iš bendrojo prijungimo rezultato atimant nespecifinio prijungimo rezultatą. Specifinio prijungimo priklausomybės nuo [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracijos kreivėje turėtų būti gauta didžiausiojo specifinio prijungimo gulstė, kuri rodo hrERα prisotinimą [^{3}H]-17β-estradioliu. Be to, duomenų analizė turėtų dokumentuoti [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimą vienoje, didelio gimininguмo prijungimo vietoje. Sotinamojo prijungimo kreivėje turėtų būti rodomas nespecifinis, bendrasis ir specifinis prijungimas. Toliau šie duomenys turėtų būti analizuojami atliekant netiesinės regresijos analizę (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.), kai galutinai duomenys pateikiami kaip Scatchardo grafikas.

53. Atliekant duomenų analizę, B_{max} ir K_d turėtų būti nustatomi vien tik pagal bendrojo prijungimo duomenis, darant prielaidą, kad nespecifinis prijungimas yra tiesinis, jei nebūtų pagrįstas skirtingo metodo taikymas. Be to, reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Turėtų būti nurodytas atspariosios regresijos metodas. Visada reikėtų atlikti koregavimą dėl ligando kiekio sumažėjimo (pvz., taikant Swillens metodą, 1995 m.), kai pagal sotinamojo prijungimo duomenis nustatoma B_{max} ir K_d.

Konkurencinio prijungimo bandymas

54. Konkurencinio prijungimo kreivė braižoma kaip specifinio [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo priklausomybės nuo konkurento koncentracijos (išreikštos $\log_{10}$ vienetais) kreivė. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant slopinama 50 % didžiausiojo specifinio [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo yra IC_{50} vertė.

55. Teigiamų kontrolinių ėminių (pvz., etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos) log(IC_{50}) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hillo lygčiai priderinti. (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.). Priderinant šias kreives, viršus, apačia, krypties koeficientas ir log(IC_{50}) paprastai turėtų likti neapriboti. Reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Koregavimas dėl ligando kiekio sumažėjimo neturėtų būti atliekamas. Po pradinės analizės kiekviena prijungimo kreivė turėtų būti analizuojama iš naujo, kad būtų užtikrintas geriausias priderinimas prie modelio. Silpnai jungiamos medžiagos santykinį prijungimo gimininguмą (RBA) reikėtų skaičiuoti kaip procentais išreikštą silpnai jungiamos medžiagos log (IC_{50}) ir 17β-estradiolio log (IC_{50}) santykį. Teigiamų medžiagų kontrolinių ėminių ir nejungiamos medžiagos kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti įvertinti, taikant 2 priedėlio 45–50 pastraipose pateiktus naudojimo charakteristikų matus.

56. Visų bandomųjų cheminių medžiagų duomenys turėtų būti analizuojami taikant pakopinį metodą, siekiant užtikrinti, kad duomenų analizė būtų tinkamai atlikta ir kiekviena konkurencinio prijungimo kreivė būtų teisingai klasifikuojama. Rekomenduojama, kad iš pradžių būtų atliekama kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo standartizuota duomenų analizė, kuri atitiktų etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kontrolinių ėminių analizę (žr. 55 pastraipa). Baigus šią analizę, reikėtų atlikti kiekvieno atskiro bandymo techninę kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurtai konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Atliekant šią techninę analizę gauti specifiškai prijungiamo ^{3}H]-17β-estradiolio procentinės dalies sumažėjimo priklausomai nuo koncentracijos stebėjimo duomenys, mažas kiekvienos koncentracijos techninių kartotinių ėminių kintamumas ir trims atskiriems bandymams gautas priderinimo parametrų pastovumas yra geras tinkamo bandymų atlikimo ir duomenų analizės rodiklis.

Duomenų aiškinimas

57. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma prie hrERα jungiama medžiaga, jei gali būti priderinta prijungimo kreivė ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 % (1 paveikslas).

58. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma nejungiama prie hrERα, jei:

— galima priderinti prijungimo kreivę ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio priderintos atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %, arba

— prijungimo kreivė negali būti priderinta ir procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.

59. Bandomosios cheminės medžiagos laikomos abejotinomis medžiagomis, jei nevykdoma jokia iš pirmiau nurodytų sąlygų (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

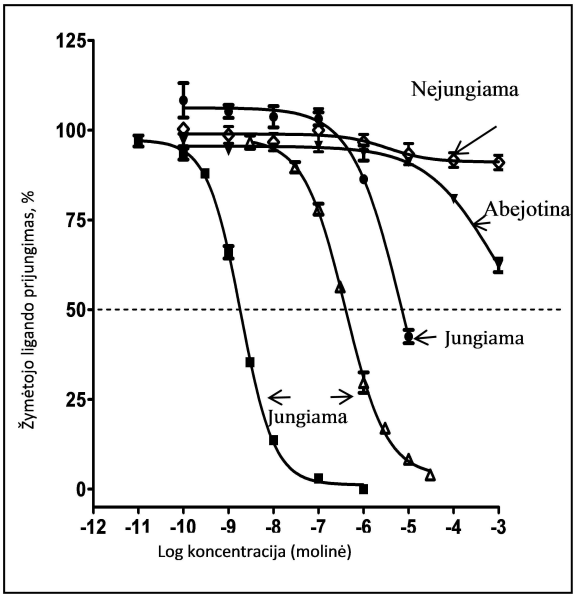
7 lentelė.

Klasifikavimo pagal bandomosios cheminės medžiagos konkurencinio prijungimo kreivę kriterijai

Klasifikavimas	Kriterijai
Jungiama medžiaga[a]	Prijungimo kreivė gali būti priderinta. **Duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 %.**
Nejungiama medžiaga[b]	Jei prijungimo kreivė gali būti priderinta, **duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %.** Jei prijungimo kreivė negali būti priderinta, **procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.**
Abejotina medžiaga[c]	Atliekant atskirą bandymą bandyta medžiaga, kuri nėra jungiama ar nejungiama (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

1 paveikslas.

Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo naudojant konkurencinio prijungimo kreivę pavyzdžiai



60. Laboratorijoje atlikti bandomosios cheminės medžiagos kartotiniai atskiri bandymai sujungiami kiekvienam iš jų priskiriant skaitinę vertę ir gaunant atskirų bandymų vidurkį, kaip parodyta 8 lentelėje. Kiekvienos laboratorijos sujungtų atskirų bandymų rezultatai lyginami su kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos numanoma klasifikacija.

8 lentelė.

Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo metodas, laboratorijoje atliekant kartotinius atskirus bandymus

Priskirti vertę kiekvienam atskiram bandymui:	
Klasifikavimas	**Skaitinė vertė**
Jungiama medžiaga	2
Abejotina medžiaga	1
Nejungiama medžiaga	0
Klasifikuoti visų atskirų bandymų skaitinės vertės vidurkį:	
Klasifikavimas	**Skaitinė vertė**
Jungiama medžiaga	Vidurkis ≥ 1,5
Abejotina medžiaga	0,5 ≤ vidurkis < 1,5
Nejungiama medžiaga	Vidurkis < 0,5

BANDYMO ATASKAITA

61. Žr. šio bandymo metodo ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI*** 24 pastraipą.

2.1 priedėlis

TERMINŲ SĄRAŠAS

[^{3}H]E2– 17β-estradiolis, žymėtas radioaktyviuoju tričio izotopu.

DCC– dekstranu dengtos medžio anglys.

E2– nežymėtasis 17β-estradiolis (inertinis).

Bandymo buferinis tirpalas– 10 mM tris-(hidroksimetil)aminometano, 10 mg galvijų kraujo serumo albumino /ml, 2 mM ditiotreitolio, 10 % glicerolio, 0,2 mM leupeptino, pH 7,5.

hrERα– žmogaus rekombinantinio estrogenų receptoriaus alfa.

Kartotinis ėminys– vienas iš kartotinių tos pačios sudėties ir koncentracijos šulinėlių, bandomų vienu metu atliekant vieną atskirą bandymą. Pagal šį protokolą bandomi trys kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminiai; t. y. vienu metu bandomi trys kartotiniai bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos ėminiai.

Atskiras bandymas– vienu metu atliekamas viso mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlių rinkinio bandymas, kai gaunama visa informacija, kuri yra būtina bandomosios cheminės medžiagos prijungimui prie hrERα apibūdinti (t. y. bendrasis [^{3}H]-17β-estradiolis, pridėtas į bandymo šulinėlį, didžiausiasis [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimas prie hrERα, nespecifinis prijungimas ir įvairios koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos bendrasis prijungimas). Atskirą bandymą gali sudaryti keli kaip vienas (t. y. kartotiniai) bandymo šulinėliai viena koncentracijai, bet kadangi pagal šį protokolą reikalaujama bandyti tris kartotinius ėminius, vieną atskirą bandymą sudaro trijų vienos koncentracijos bandymo šulinėlių bandymas. Be to, pagal šį protokolą reikalaujama atlikti tris nepriklausomus (t. y. nevienalaikius) kiekvienos cheminės medžiagos atskirus bandymus.

2.2 priedėlis

TIPINIS SOTINAMOJO PRIJUNGIMO PRIE [^{3}H]-17*B*-ESTRADIOLIO BANDYMAS, NAUDOJANT TRIS KARTOTINIŲ ĖMINIŲ ŠULINĖLIUS

Tipinis sotinamojo prijungimo prie [^{3}H]-17β-estradiolio bandymas, naudojant tris kartotinių ėminių šulinėlius											
Padėtis	**Kartotinis ėminys**	**Šulinėlio tipo kodas**	**Žymėtojo E2 pradinė koncentracija (nM)**	**Žymėtojo E2 tūris (µl)**	**Žymėtojo E2 galutinė koncentracija (nM)**	**Nežymėtojo E2 pradinė koncentracija (µM)**	**Nežymėtojo E2 tūris (µl)**	**Nežymėtojo E2 galutinė koncentracija (µM)**	**Buferinio tirpalo tūris (µl)**	**Receptoriaus tūris (µl)**	**Bendrasis šulinėlio tūris**
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

Tipinis sotinamojo prijungimo prie [^{3}H]-17β-estradiolio bandymas, naudojant tris kartotinių ėminių šulinėlius											
Padėtis	**Kartotinis ėminys**	**Šulinėlio tipo kodas**	**Žymėtojo E2 pradinė koncentracija (nM)**	**Žymėtojo E2 tūris (µl)**	**Žymėtojo E2 galutinė koncentracija (nM)**	**Nežymėtojo E2 pradinė koncentracija (µM)**	**Nežymėtojo E2 tūris (µl)**	**Nežymėtojo E2 galutinė koncentracija (µM)**	**Buferinio tirpalo tūris (µl)**	**Receptoriaus tūris (µl)**	**Bendrasis šulinėlio tūris**
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

Tipinis sotinamojo prijungimo prie [^{3}H]-17β-estradiolio bandymas, naudojant tris kartotinių ėminių šulinėlius											
Padėtis	**Kartotinis ėminys**	**Šulinėlio tipo kodas**	**Žymėtojo E2 pradinė koncentracija (nM)**	**Žymėtojo E2 tūris (µl)**	**Žymėtojo E2 galutinė koncentracija (nM)**	**Nežymėtojo E2 pradinė koncentracija (µM)**	**Nežymėtojo E2 tūris (µl)**	**Nežymėtojo E2 galutinė koncentracija (µM)**	**Buferinio tirpalo tūris (µl)**	**Receptoriaus tūris (µl)**	**Bendrasis šulinėlio tūris**
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	Žymėtasis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Žymėtasis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Žymėtasis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Žymėtasis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Žymėtasis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Žymėtasis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Žymėtasis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Žymėtasis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Žymėtasis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Žymėtasis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Žymėtasis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Žymėtasis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Žymėtasis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Žymėtasis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Žymėtasis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Žymėtasis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Tipinis sotinamojo prijungimo prie [^{3}H]-17β-estradiolio bandymas, naudojant tris kartotinių ėminių šulinėlius

Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipo kodas	Žymėtojo E2 pradinė koncentracija (nM)	Žymėtojo E2 tūris (µl)	Žymėtojo E2 galutinė koncentracija (nM)	Nežymėtojo E2 pradinė koncentracija (µM)	Nežymėtojo E2 tūris (µl)	Nežymėtojo E2 galutinė koncentracija (µM)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Receptoriaus tūris (µl)	Bendrasis šulinėlio tūris
H5	2	Žymė-tasis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Žymė-tasis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Žymė-tasis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Žymė-tasis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Žymė-tasis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Žymė-tasis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Žymė-tasis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Žymė-tasis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Atkreipiamas dėmesys į tai, kad „žymėtieji“ šulinėliai yra tušti inkubavimo metu. 40 µl įpilama tik scintiliacijoms skaičiuoti.

2.3 priedėlis.

KONKURENCINIO PRIJUNGIMO BANDYMO ŠULINĖLIŲ SCHEMA

Plokštelė	**Padėtis**	**Kartotinis ėminys**	**Šulinėlio tipas**	**Šulinėlio kodas**	**Koncentracijos kodas**	**Konkurento pradinė koncentracija (M)**	**hrER pradinio tirpalo tūris (µl)**	**Buferinio tirpalo tūris (µl)**	**Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)**	**Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)**	**Galutinis tūris (µl)**	**Konkurento galutinė koncentracija (M)**
S	A1	1	bendrasis prijungimas	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	bendrasis prijungimas	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	bendrasis prijungimas	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	bendrasis prijungimas	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	bendrasis prijungimas	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	bendrasis prijungimas	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	nežymėtasis E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	nežymėtasis E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	nežymėtasis E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	nežymėtasis E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	nežymėtasis E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	nežymėtasis E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	nežymėtasis E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	nežymėtasis E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	nežymėtasis E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	B10	1	nežymėtasis E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	nežymėtasis E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	nežymėtasis E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	nežymėtasis E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	nežymėtasis E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	nežymėtasis E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	nežymėtasis E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	nežymėtasis E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	nežymėtasis E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	nežymėtasis E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	nežymėtasis E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	nežymėtasis E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tuščiasis ėminys	tuščiasis ėminys	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	tuščiasis ėminys	tuščiasis ėminys	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	tuščiasis ėminys	tuščiasis ėminys	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretinodrelis	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrelis	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrelis	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrelis	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrelis	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrelis	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	D7	1	noretinodrelis	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrelis	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrelis	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrelis	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrelis	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrelis	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrelis	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrelis	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrelis	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	E11	2	noretinodrelis	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrelis	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

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (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	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	žymėtasis	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Atkreipiamas dėmesys į tai, kad „žymėtieji“ šulinėliai yra tušti inkubavimo metu. 40 µl įpilama tik scintiliacijoms skaičiuoti.

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	A1	1	bendrasis prijungimas	TB	TBB1-B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	bendrasis prijungimas	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	bendrasis prijungimas	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	bendrasis prijungimas	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	bendrasis prijungimas	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	bendrasis prijungimas	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	nežymėtasis E2 (didelė)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	C1	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Bandomoji cheminė medžiaga 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	E1	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Bandomoji cheminė medžiaga 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Konkurencinio prijungimo bandymo šulinėlių schema

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	G1	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Bandomoji cheminė medžiaga 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrelis	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrelis	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrelis	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrelis	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrelis	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrelis	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	nežymėtasis E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	nežymėtasis E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	nežymėtasis E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	nežymėtasis E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	nežymėtasis E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	nežymėtasis E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

3 priedėlis

CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ ĮVERTINIMO IR TYRIMŲ INSTITUTO (CERI) *IN VITRO* ESTROGENŲ RECEPTORIAUS (ER) PRIJUNGIMO BANDYMAS, NAUDOJANT ŽMOGAUS REKOMBINANTINĮ ERA LIGANDŲ PRIJUNGIMO DOMENO BALTYMĄ

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

1. Atliekant šį *in vitro* estrogenų receptoriaus (ERα) prisotinimo ir konkurencinio prijungimo bandymą naudojamas žmogaus ERα (hrERα) ligandų prijungimo domenas (LBD). Šis baltymų darinys buvo pagamintas Japonijos cheminių medžiagų įvertinimo ir tyrimų institute (CERI) ir yra kaip *E. coli* ekspresuotas glutationo-S-transferazės (GST) susiliejimo baltymas. Buvo atliktas CERI protokolo tarplaboratorinis patvirtinimo tyrimas (2), kuris įrodė protokolo tinkamumą ir patikimumą atsižvelgiant į numatytą bandymo tikslą.

2. Šis bandymas yra atrankos procedūra, skirta identifikuoti medžiagas, kurios gali prisijungti prie hrERα. Jis naudojamas nustatant bandomosios cheminės medžiagos gebėjimą konkuruoti su 17β-estradioliu dėl prisijungimo prie hrERα-LBD. Kiekybinius bandymo duomenis gali sudaryti IC_{50} (bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuriai esant pavaduojama pusė prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio, matas) ir bandomųjų cheminių medžiagų santykinis prijungimo prie hrERα gimiringumas palyginti su 17β-estradioliu. Cheminių medžiagų atrankos tikslais priimtinus kokybinius bandymo rezultatus gali sudaryti bandomųjų cheminių medžiagų klasifikavimas kaip prie hrERα jungiamų, nejungiamų arba abejotinų medžiagų pagal prijungimo kreivėms aprašytus kriterijus.

3. Atliekant bandymą naudojamas radioaktyvusis ligandas, todėl laboratorijai reikia gauti darbo su radioaktyviosiomis medžiagomis licenciją. Visos procedūros su radioaktyviaisiais izotopais ir pavojingosiomis cheminėmis medžiagomis turėtų atitikti reglamentus ir procedūras, aprašytas nacionaliniuose teisės aktuose.

4. Prieš naudojant šį bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų perskaityti ***BENDRASIS ĮVADAS*** ir ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI***. Šiose bandymo gairėse vartojamos apibrėžtys ir santrumpos pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAI (TAIP PAT ŽR. *BENDRASIS ĮVADAS*)

5. Atliekant prijungimo prie hrERα bandymą, matuojama radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando ([^{3}H]17β-estradiolio) gebėjimas prisijungti prie ER, didėjant bandomosios cheminės medžiagos (t. y. konkurento) koncentracijai. Didelį gimiringumą ER turinčios bandomosios cheminės medžiagos konkuruoja su radioaktyviuoju izotopu žymėtu ligandu esant mažesnei koncentracijai palyginti su tomis cheminėmis medžiagomis, kurių gimiringumas receptoriui yra mažesnis.

6. Šį bandymą sudaro du pagrindiniai komponentai: sotinamojo prijungimo bandymo, skirto apibūdinti receptoriaus ir ligando sąveikos parametrus, ir konkurencinio prijungimo bandymo, kuris apibūdina bandomosios cheminės medžiagos ir radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando konkurencija dėl prijungimo prie ER.

7. Sotinamojo prijungimo bandymo tikslas – apibūdinti prijungimo prie tam tikros receptorių grupės gimiringumą ir jų skaičių, ruošiant konkurencinio prijungimo bandymą. Atliekant sotinamojo prijungimo bandymą pusiausvyros sąlygomis, nustatomas pastovios koncentracijos estrogeno receptoriaus gimiringumas jo natūraliam ligandui (rodo disociacijos konstanta, K_d) ir aktyviųjų receptorių vietų koncentracija (B_{max}).

8. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas medžiagos gimiringumas konkuruoti su [^{3}H]17β-estradioliu dėl prijungimo prie ER. Gimiringumas kiekybiškai įvertinamas kaip bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri esant pusiausvyrai slopina 50 % [^{3}H]17β-estradiolio specifinio prijungimo (vadinama „50 % slopinamąja koncentracija“ arba IC_{50}). Jį taip pat galima įvertinti naudojant santykinį prijungimo gimiringumą (RBA, atžvilgiu estradiolio IC_{50}, išmatuotos atskirai atliekant tą patį atskirą bandymą). Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas pastovios koncentracijos [^{3}H]17β-estradiolio prijungimas, esant dideliam bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos intervalui (aštuonios dydžio eilės). Tada duomenys priderinami, jei įmanoma, Hillo lygčiai gauti (Hill, 1910 m.), kuri aprašo žymėtojo ligando pavadavimą konkurencine vienoje vietoje jungiama medžiaga. Radioaktyviuoju izotopu žymėto estradiolio pavadavimo esant pusiausvyrai laipsnis naudojamas bandomajai cheminei medžiagai apibūdinti kaip jungiamai, nejungiamai arba duodančiai abejotiną atsaką.

PROCEDŪRA

Priimtinų hrERα baltymo veikimo charakteristikų įrodymas

9. Prieš pradedant atlikti įprastinius sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus, reikėtų įrodyti, kad kiekvienos naujai gautos hrERα partijos savybės atitinka laboratorijos, kurioje ji bus naudojama, reikalavimus. Turėtų būti atliekamas dviejų veiksmų procesas tinkamumo charakteristikoms įrModyti. Tai būtų tokie veiksmai:
   — Atliekamas [^{3}H]-17β-estradiolio sotinamojo prijungimo bandymas, kad būtų įrodytas hrERα specifiškumas ir prisotinimas. Šių duomenų netiesinės regresijos analizė (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.) ir vėliau gautas Scatchardo grafikas turėtų dokumentais patvirtinti konkrečios hrERα partijos [3H]-17β-estradiolio prijungimo prie hrERα giminingumą (K_d) ir receptorių skaičių (B_{max}).
   — Atliekamas konkurencinio prijungimo bandymas, naudojant kontrolines medžiagas (etaloninį estrogeną (17β-estradiolį), silpnai jungiamą medžiagą (pvz., noretinodrelį arba noretindroną) ir nejungiamą medžiagą (oktiltrietoksisilaną, OTES). Kiekviena laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kad būtų galima dokumentuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos IC_{50} ir kitų reikiamų verčių pastovumą tarp bandymų ir naudojant skirtingas hrERα partijas. Be to, kontrolinių medžiagų konkurencinio prijungimo kreivių parametrai turėtų atitikti 95 % pasikliovimo intervalo ribas (žr. 1 lentelę), kurios buvo gautos naudojant šio bandymo patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų duomenis (2).

1 lentelė

Etaloniniam estrogenui ir silpnai jungiamai medžiagai sukurti veiksmingumo kriterijai, atliekant CERI prijungimo prie hrER bandymą

Medžiaga	Parametras	Vidurkis [a]	Standartinis nuokrypis (n)	95 % pasikliovimo intervalai [b]	
				Apatinė riba	Viršutinė riba
17β-estradiolis	Viršus	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Apačia	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillo krypties koeficientas	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretinodrelis	Viršus	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Apačia	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillo krypties koeficientas	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindronas [c]	Viršus	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Apačia	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillo krypties koeficientas	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN), kai imties dydis (n), buvo apskaičiuoti naudojant kreivės priderinimo parametrų įverčius (4 parametrų Hillo lygties), patvirtinimo tyrimo metu gautus keturiose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus (žr. 2 nuorodos N priedą).

[b] 95 % pasikliovimo intervalai yra pateikti kaip priimtinumo kriterijų rodiklis.

[c] Noretindrono bandymas buvo neprivalomas kaip 4 papildomos užduoties bandymas atliekant patvirtinimo tyrimą (žr. 2 nuorodą, žr. 4 papildomą užduotį). Taigi, vidurkis ± SN (n) buvo apskaičiuojami naudojant kreivės priderinimo įverčius (4 parametrų Hillo lygties), dviejose laboratorijose atliekant kontrolinių ėminių atskirus bandymus.
intervalas priklausys nuo receptoriaus kompozicijos K_d ir nuo kiekvienoje laboratorijoje naudojamo radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando koncentracijos. Būtų priimtinas atitinkamas IC_{50} intervalo koregavimas, atsižvelgiant į bandymui atlikti naudojamas sąlygas.

Laboratorijos kvalifikacijos įrodymas

10. Žr. šio bandymo metodo ***PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI*** 17 ir 18 pastraipas bei 2 lentelę. Kiekvieną bandymą (sotinamojo ir konkurencinio prijungimo) turėtų sudaryti trys skirtingomis dienomis atliekami atskiri bandymai (t. y. su iš naujo atskiestais receptoriaus, cheminių medžiagų ir reagentų tirpalais), ir kiekvienas atskiras bandymas būtų trijų kartotinių ėminių bandymas.

Receptoriaus (hrERα) koncentracijos nustatymas

11. Aktyviojo receptoriaus koncentracija kažkiek skiriasi priklausomai nuo partijos ir laikymo sąlygų. Dėl šios priežasties reikėtų nustatyti iš tiekėjo gauto aktyviojo receptoriaus koncentraciją. Taip būtų gauta atitinkama aktyviojo receptoriaus koncentracija atskiro bandymo atlikimo metu.

12. Nominaliosios 0,1, 0,2, 0,4 ir 0,6 nM koncentracijos receptorius turėtų būti inkubuojamas konkurencinį prijungimą atitinkančiomis sąlygomis (t. y. 0,5 nM [^{3}H]-estradiolio), nesant 1 μM nežymėtojo estradiolio (bendrasis prijungimas) ir jam esant (nespecifinis prijungimas). Braižoma specifinio prijungimo, apskaičiuojamo kaip bendrojo ir nespecifinio prijungimo skirtumas, priklausomybės nuo nominaliosios receptoriaus koncentracijos kreivė. Receptoriaus koncentracija, kuriai gaunamos specifinio prijungimo vertes, atitinkančios 40 % pridėto radioaktyviojo žymeklio, susiejama su atitinkama receptoriaus koncentracija, ir ši receptoriaus koncentracija turėtų būti naudojama atliekant sotinamojo ir konkurencinio prijungimo bandymus. Galutinė 0,2 nM hrER koncentracija dažnai atitiktų šią sąlygą.

13. Jei 40 % kriterijų negalima įvykdyti kelis kartus, reikėtų patikrinti bandymo schemą dėl galimų klaidų. Negebėjimas atitikti 40 % kriterijų gali rodyti, kad rekombinanto partijoje yra labai mažai aktyviojo receptoriaus, reikėtų spręsti klausimą dėl kitos receptoriaus partijos naudojimo.

Sotinamojo prijungimo bandymas

14. Reikėtų įvertinti tris kartotinius aštuonių didėjančių [^{3}H]17β-estradiolio koncentracijos verčių ėminius esant tokioms trims sąlygoms (žr. 2 lentelę):

a. Nesant nežymėtojo 17β-estradiolio ir nesant ER. Taip nustatomas bendrasis prijungimas, matuojant radioaktyvumą šulinėliuose, kuriuose yra tik [^{3}H]17β-estradiolis.

b. Esant 2000 kartų didesnei nežymėtojo 17β-estradiolio koncentracijai palyginti su žymėtojo 17β-estradiolio koncentracija ir esant ER. Šios sąlygos tikslas – prisotinti aktyviąsias prijungimo vietas nežymėtuoju 17β-estradioliu ir matuojant radioaktyvumą šulinėliuose nustatyti nespecifinį prijungimą. Laikoma, kad visas likęs žymėtasis estradiolis, kuris galėtų jungtis prie receptoriaus, jungiasi prie nespecifinės vietos, nes nežymėtojo estradiolio koncentracija turėtų būti tokia didelė, kad jis prisijungtų prie visų esamų specifinių receptoriaus vietų.

c. Nesant nežymėtojo 17β-estradiolio ir nesant ER (bendrojo radioaktyvumo nustatymas).

[^{3}H]-17β-estradiolio, nežymėtojo 17β-estradiolio tirpalų ir hrERα ruošimas

15. 40 nM [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalą reikėtų ruošti iš 1 μM [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalo DMSO, įpilant DMSO (kad būtų gauta 200 nM) ir bandymo buferinio tirpalo kambario temperatūroje (kad būtų gauta 40 nM). Iš 40 nM tirpalo ruošiami vienodu santykiu atskiesti [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalai nuo 0,313 nM iki 40 nM, įpilant bandymo buferinio tirpalo kambario temperatūroje (kaip parodyta 2 lentelės 12 eilutėje). Įpilant 10 μl šių tirpalų į atitinkamus 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlius, gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,0313 nM iki 4,0 nM (žr. 2 ir 3 lenteles). Bandymo buferio ruošimas, [^{3}H]-17β-estradiolio pradinio tirpalo koncentracijos skaičiavimas, atsižvelgiant į jo savitąjį aktyvumą, atskiestų tirpalų ruošimas ir koncentracijos nustatymas yra nuodugniai aprašytas CERI protokole (2).

16. Nežymėtojo 17*β*-estradiolio atskiesti tirpalai turėtų būti ruošiami į pradinį 1 nM 17*β*-estradiolio tirpalą įpilant bandymo buferinio tirpalo, kad būtų gauti aštuoni didėjančios pradinės koncentracijos nuo 0,625 µM iki 80 µM tirpalai. Įpilant 10 µl šių tirpalų į nespecifiniam prijungimui matuoti skirtos 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės atitinkamus bandymo šulinėlius, gaunamos galutinės bandymo koncentracijos nuo 0,0625 µM iki 8,0 µM (žr. 2 ir 3 lenteles). Nežymėtojo 17*β*-estradiolio atskiestų tirpalų ruošimas nuodugniai aprašytas CERI protokole (2).

17. Reikėtų naudoti tokią receptoriaus koncentraciją, kuriai gaunamas 40±10 % specifinis prijungimas (žr. 12–13 pastraipas). hrERα tirpalas turėtų būti ruošiamas pieš pat naudojimą skiedžiant ledinės temperatūros buferiniu tirpalu, t. y. po to, kai yra paruošti visi bendrojo prijungimo, nespecifinio prijungimo ir vien tik žymėtojo ligando šulinėliai.

18. 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelės ruošiamos kaip parodyta 2 lentelėje, imant 3 kartotinius vienos [^{3}H]-17*β*-estradiolio koncentracijos ėminius. [^{3}H]-17*β*-estradiolio, nežymėtojo 17*β*-estradiolio, buferinio tirpalo ir receptoriaus tūrio priskyrimas pateiktas 3 lentelėje.

2 lentelė

Sotinamojo prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	TB matavimas			NSB matavimas			Vien tik žymėtajam ligandui nustatyti				Plokštelės 4–6 stulpelio nežymėtojo E2 atskiesti tirpalai	Plokštelės 1–9 stulpelio [^{3}H] E2 atskiesti tirpalai
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	30,125 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 [^{3}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- bendrasis prijungimas;
NSS- nespecifinis prijungimas;
[^{3}H]E2- [^{3}H]-17*β*-estradiolis;
E2- nežymėtasis 17*β*-estradiolis;
(*) Čia nurodytos koncentracijos yra galutinės koncentracijos kiekviename šulinėlyje.
(**) Nežymėtojo E2 ir [^{3}H] E2 tirpalai gali būti ruošiami skirtingoje plokštelėje.

3 lentelė

Sotinamojo bandymo mikrotitravimo plokštelės reagentų tūriai

Eilutės numeris		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (**)
Ruošimo veiksmai		TB šulinėliai			NSB šulinėliai			Vien tik žymėtasis ligandas		
Pirmiau nurodytų reakcijos šulinėlių komponentų tūris ir įpylimo tvarka	Buferinis tirpalas	60 µl			50 µl			90 µl		
	nežymėtasis E2 iš 2 lentelės 11 eilutės	–			10 µl			–		
	[^{3}H]E2 iš 2 lentelės 12 eilutės	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Bendrasis reakcijos tūris		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubavimas		**PO 2 VALANDŲ INKUBAVIMO REAKCIJOS**						Radioaktyvumo kiekybinis nustatytas iškart po paruošimo. Be inkubavimo		
Apdorojimas 0,4 % DCC		Taip			Taip			**Ne**		
0,4 % DCC tūris		100 µl			100 µl			–		
Filtravimas		Taip			Taip			Ne		
DPM MATAVIMAS										
Kiekybinio nustatymo tūris, įpiltas į scintiliacijų mišinį		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jei mikroplokštelių dpm matuoti naudojamas scintiliacijų skystyje skaičiavimas (LSC), vien tik žymėtojo ligando ruošimas vienoje plokštelėje su TB ir NSB šulinėliais netinka. Vien tik žymėtasis ligandas turėtų būti ruošiamas atskiroje plokštelėje.
(**) Jei DCC atskiriamas centrifugavimu, 50 µl skysčio virš nuosėdų reikėtų matuoti taikant LSC, kad būtų išvengta DCC užteršimo.

19. Bendrajam prijungimui ir nespecifiniam prijungimui nustatyti naudojamos bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti dviem valandoms inkubuojamos kambario temperatūroje (nuo 22 °C iki 28 °C).

Prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio matavimas

20. Prie hrERα prijungtą [^{3}H]-17β-estradiolį po dvejų valandų inkubavimo laikotarpio reikėtų atskirti nuo laisvojo [^{3}H]-17β-estradiolio, į šulinėlius įpilant 100 µl ledinės 0,4 % DCC suspensijos. Toliau plokšteles reikėtų dėti 10 min ant ledo ir reakcijos mišinys su DCC suspensiją turėtų būti filtruojamas, pernešant į mikrotitravimo plokštelės filtrą, kad būtų pašalintas DCC. Tada į scintiliacijų skystį LSC buteliukuose reikėtų įpilti 100 µl filtrato, kad būtų nustatytas skilimų skaičius per minutę (dpm) vienam buteliukui, atliekant scintiliacijų skystyje skaičiavimą.

21. Arba, jei mikrotitravimo plokštelės filtro nėra, DCC galima pašalinti centrifugavimu. Tada ypač atsargiai reikėtų paimti 50 µl skysčio virš nuosėdų, kuriame yra prie hrERα prijungtas [^{3}H]-17β-estradiolis, kad būtų išvengta šulinėlių užteršimo dėl DCC patekimo, ir jį naudoti scintiliacijų skaičiavimui.

22. Nustatant į bandymo šulinėlius įpilto [^{3}H]-17β-estradiolio skilimų skaičių per minutę (dpm), reikėtų, kad būtų vien tik žymėtasis ligandas. Kiekybinis radioaktyvumo nustatymas turėtų būti atliekamas iš karto po paruošimo. Šie šulinėliai neturėtų būti inkubuojami ir turėtų būti apdoroti DCC suspensija, bet jų turinį reikėtų įpilti tiesiai į scintiliacijų skystį. Šie matavimai rodo, kiek dpm vienetais išreikšto [^{3}H]-17β-estradiolio buvo įdėtą į kiekvieną bendrojo prijungimo ir nespecifinio prijungimo šulinėlių rinkinį.

Konkurencinio prijungimo bandymas

23. Atliekant konkurencinio prijungimo bandymą matuojamas vienos koncentracijos [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimas, esant vis didesnei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Atliekant atskirą bandymą, turėtų būti po tris vienalaikius vienos koncentracijos ėminius. Be to, turėtų būti atliekami trys nevienalaikiai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiri bandymai. Bandymas turėtų būti ruošiamas vienoje 96 šulinėlių mikrotitravimo plokštelėje arba jų gali būti daugiau.

Kontroliniai ėminiai

24. Atliekant bandymą, į kiekvieną jų reikėtų įtraukti vienalaikius tirpiklio ir kontrolinius ėminius (t. y. etaloninio etalono, silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių (t. y. silpnai jungiamos medžiagos ir nejungiamos medžiagos) visų koncentracijos verčių kreivės turėtų būti naudojamos vienoje plokštelėje atliekant kiekvieną atskirą bandymą. Visose kitose plokštelėse turėtų būti i) po tris didžiausios (didžiausio pavadavimo, t. y. maždaug visiško radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando pavadavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; ii) po tris kartotinius tirpiklio kontrolinio ir nespecifinio prijungimo ėminius. Bandymo buferinio tirpalų, [^{3}H]-17β-estradiolio, hrERα ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpalų ruošimo procedūros nuodugniai aprašytos CERI protokole.

Tirpiklio kontrolinis ėminys:

25. Tirpiklio kontrolinis ėminys rodo, kad nėra tirpiklio sąveikos su bandymo sistema, ir taip pat matuojamas bendrasis prijungimas (TB). Tinkamiausias tirpiklis yra DMSO. Arba galima naudoti etanolį, jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga netirpsta DMSO. DMSO koncentracija galutinio bandymo šulinėliuose turėtų būti 2,05 % ir ją būtų galima padidinti iki 2,5 %, jei bandomosios medžiagos tirpumas yra per mažas. Didesnės kaip 2,5 % koncentracijos DMSO neturėtų būti naudojamas dėl didesnės koncentracijos trukdžių atliekant bandymą. Jei bandomosios cheminės medžiagos netirpsta DMSO, bet tirpsta etanolyje, galima naudoti ne didesnės kaip 2 % koncentracijos etanolį, kad atliekant bandymą būtų išvengta trukdžių.

Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys:

26. Buferinio tirpalo kontroliniame ėminyje (BK) neturėtų būti tirpiklio ar bandomosios cheminės medžiagos, bet turėtų būti visi kiti bandymo komponentai. Buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai lyginami su tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai.

Stipriai jungiama medžiaga (etaloninis estrogenas)

27. 17β-estradiolis (CAS 50-28-2) yra endogeninis ligandas, kurio prijungimo prie alfa potipio ER gimininguma yra didelis. Turėtų būti gauta kiekvieno konkurencinio prijungimo prie hrERα bandymo standartinė kreivė, naudojant nežymėtąjį 17β-estradiolį, kad būtų galima vertinti kintamumą, kai bandymas ilgą laiką atliekamas toje pačioje laboratorijoje. Reikėtų paruošti aštuonis nežymėtojo 17β-estradiolio tirpalus DMSO ir bandymo buferiniame tirpale, kai standartinei kreivei gauti naudojamos galutinės koncentracijos bandymo šulinėliuose turėtų skirtis taip: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Didžiausios koncentracijos nežymėtasis 17β–estradiolis (1 μM) taip pat turėtų būti naudojamas kaip nespecifinio prijungimo indikatorius. Ši koncentracija 4 lentelėje pažymėta kaip nespecifinis prijungimas (NSB), nors ji taip pat yra standartinės kreivės dalis.

Silpnai jungiama medžiaga

28. Reikėtų įtraukti silpnai jungiamą medžiagą (noretinodrelį (CAS 68-23-5) arba noretindroną (CAS 68-22-4)), kad būtų įrodytas kiekvieno bandymo jautris ir kad būtų galima įvertinti kintamumą, kai bandymas atliekamas ilgą laiką. Reikėtų paruošti aštuonis silpnai jungiamos medžiagos tirpalus DMSO ir bandymo buferiniame tirpale, kai galutinės koncentracijos bandymo šulinėliuose turėtų būti tokios: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} ir 10^{-9} M.

Nejungiama medžiaga

29. Kaip neigiama kontrolinė medžiaga (nejungiama medžiaga) turėtų būti naudojamas oktiltrietoksisilanas (OTES, CAS 2943-75-1). Taip užsitikrinama, kad atliekant bandymą bus nustatytos bandomosios cheminės medžiagos, kurios nesijungia prie hrERα. Reikėtų paruošti aštuonis nejungiamos medžiagos tirpalus DMSO ir bandymo buferiniame tirpale, kai galutinės koncentracijos bandymo šulinėliuose turėtų būti tokios: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} ir 10^{-10} M. Kaip alternatyvioji nejungiama medžiaga gali būti naudojamas dibutilftalatas (DBP, CAS 84-72-2), bet jį galima bandyti tik ne didesnės kaip 10^{-4} M koncentracijos. Įrodyta, kad didžiausias DBP tirpumas bandymo sąlygomis yra 10^{-4} M.

hrERα koncentracija

30. Reikėtų naudoti tokį receptoriaus kiekį, kuriam gaunamas 40±10 % specifinis prijungimas (žr. 3 priedėlio 12–13 pastraipas). hrERα tirpalą reikėtų ruošti prieš pat naudojimą, skiedžiant aktyvųjį hrERα lediniu bandymo buferiniu tirpalu.

[^{3}H]-17β-estradiolis

31. Galutinė [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracija bandymo šulinėliuose turėtų būti 0,5 nM.

Bandomosios cheminės medžiagos

32. Iš pradžių būtina atlikti tirpumo bandymą, kad būtų nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo riba ir identifikuotas reikiamas koncentracijos intervalas, kuris būtų naudojamas pagal bandymo protokolą. Iš pradžių turi būti nustatyta kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpumo tirpiklyje riba ir vėliau patvirtinama bandymo sąlygomis. Didžiausia bandoma koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 mM. Intervalo nustatymo bandymą sudaro tirpiklio kontrolinio ėminio ir ne mažiau kaip 8 pagal logaritminę eilutę atskiestų tirpalų bandymas, pradedant didžiausiąja leidžiama koncentracija (pvz., 1 mM ar mažesne, atsižvelgiant į tirpumo ribą) ir esant drumstumui ar nuosėdoms (taip pat žr. 3 priedėlio 35 pastraipą). Nustačius bandymo koncentracijos verčių intervalą, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma naudojant pagal logaritminį mastelį išdėstytas 8 koncentracijos vertes, kaip nurodyta prieš tai aprašytame intervalo nustatymo bandyme. Antrojo ir trečiojo bandymo koncentracijos turėtų būti toliau atitinkamai koreguojamos, jei būtina, kad būtų galima geriau apibūdinti atsako priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

33. Atskiesti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti ruošiami atitinkamame tirpiklyje (žr. 3 priedėlio 25 pastraipą). Jei didžiausios koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga neištirpsta etanolyje ar DMSO, ir įpilant daugiau tirpiklio jo koncentracija galutinio tirpalo mėgintuvėlyje viršytų leidžiama ribą, didžiausią koncentraciją galima sumažinti iki gretimos mažesnės koncentracijos. Šiuo atveju galima įtraukti dar vieną mažiausią koncentracijos verčių serijos koncentraciją. Kitos serijos koncentracijos turėtų likti tos pačios.

34. Į bandymo šulinėlį pilami bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti atidžiai stebimi, nes bandomoji cheminė medžiaga gali iškristi į nuosėdas ją pilant į šulinėlį. Visų šulinėlių, kuriuose yra nuosėdų, duomenys neturėtų būti įtraukiami į kreivės priderinimą, ir reikėtų nurodyti jų pašalinimo priežastį.

35. Jei yra kitų šaltinių ankstesnė informacija apie bandomosios cheminės medžiagos log(IC_{50}), galbūt tiktų atskiestų tirpalų koncentraciją išdėstyti glaudžiau pagal geometrinę progresiją į abi puses nuo numanomos log(IC_{50} (t. y. kas 0,5 log vieneto). Galutinis rezultatas turėtų rodyti gana pakankamą koncentracijų aprėptį į abi puses nuo log(IC_{50}), įskaitant „viršų“ ir „apačią“, kad būtų galima tinkamai apibūdinti prijungimo kreivę.

Išdėstymo bandymo plokštelėje schema

36. Žymėtųjų medžiagų mikrotitravimo plokštelės turėtų būti ruošiamos inkubuojant po šešis kartotinius koduotus tirpiklio kontrolinius ėminius, didžiausios koncentracijos etaloninio estrogeno (E2), kuris taip pat yra nespecifinio prijungimo (NSB) indikatorius, ėminius, buferinio tirpalo kontrolinius ėminius ir inkubuojant po tris kiekvienos iš aštuonių koncentracijų nejungiamos kontrolinės medžiagos (oktiktrietoksisilano) ėminius, septynis mažesnės koncentracijos etaloninio estrogeno (E2) ėminius, aštuonių koncentracijų silpnai jungiamos medžiagos (noretinodrelio arba noretindrono) ėminius ir aštuonis kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminius (TC). Etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivių plokštelės išdėstymo schemos pavyzdys pateiktas toliau 4 lentelėje. Naudojamos papildomos bandomosios cheminės medžiagos plokštelės ir į jas reikėtų įtraukti plokštelės kontrolinius ėminius, (t. y.: i) po tris didžiausios (didžiausio pavadavimo) ir vidutinės (t. y. maždaug IC_{50}) koncentracijos E2 ir silpnai jungiamos medžiagos kartotinius ėminius; ii) po šešis tirpiklio kontrolinio (kaip bendrojo prijungimo) ir nespecifinio prijungimo ėminius (5 lentelė)). Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelių išdėstymo schemos pavyzdys, naudojant tris nežinomas bandomąsias chemines medžiagas, pateikiamas 3.3 priedėlyje. Schemoje bei 4 ir 5 lentelėse nurodytos koncentracijos yra galutinės koncentracijos, naudojamos kiekviename bandymo šulinėlyje. Didžiausioji E2 koncentracija turėtų būti 1×10^{-7} M, ir, kalbant apie silpnai jungiamą medžiagą, turėtų būti naudojama silpnai jungiamos medžiagos 1 plokštelės koncentracija. Laboratorija turėtų nustatyti IC_{50} koncentraciją, pagrįsta istorinių kontrolinių ėminių duomenų baze. Tikimasi, kad ši vertė turėtų būti panaši į stebimą atliekant patvirtinimo tyrimus (žr. 1 lentelę).

4 lentelė

Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema [1] [2]**, etaloninio estrogeno ir kontrolinių ėminių visų koncentracijos verčių kreivės (1 plokštelė)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Buferinio tirpalo ir teigiamos medžiagos kontroliniai ėminiai (E2)			Silpnai jungiama teigiama medžiaga (noretinodrelis)			Neigiamos medžiagos kontrolinis ėminys (OTES)			TB ir NSB		
A	Tuščiasis ėminys (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (tirpiklio kontrolinis ėminys) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10}M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8}M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio) (**)		
H	E2 (1×10^{-7}M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Atliekant kiekvieną bandymą naudojamų etaloninių medžiagų mikrotitravimo plokštelės pavyzdinė schema.
([2]) Atkreipiamas dėmesys į tai, kad ši mikrotitravimo plokštelė ruošiama naudojant ankstesniuose skirsniuose aprašytus etaloninių medžiagų atskiestus tirpalus.
Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).
(*) Tikrasis tuščiasis ėminys, šulinėlis nenaudojamas.
(**) Tuščiasis ėminys, kuris nenaudojamas inkubavimo metu, bet naudojamas bendrajam pridėtam radioaktyvumui nustatyti.

5 lentelė

Konkurencinio prijungimo bandymo mikrotitravimo plokštelės schema, papildomos bandomųjų cheminių medžiagų (TC) ir plokštelės kontroliniai ėminiai

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Bandomoji cheminė medžiaga 1 (TC-1)			Bandomoji cheminė medžiaga 2 (TC-2)			Bandomoji cheminė medžiaga 3 (TC-3)			Kontroliniai ėminiai		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10}M)			TC-3 (1×10^{-10}M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (tirpiklio kontrolinis ėminys)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Šiame pavyzdyje silpnai jungiama medžiaga yra noretinodrelis (NE).

Konkurencinio prijungimo bandymo atlikimas

37. Išskyrus bendrojo prijungimo ir tuščiojo ėminio (žymėtojo ėminio) šulinėlius, kaip parodyta 6 lentelėje, į kiekvieną šulinėlį reikėtų įpilti 50 µl bandymo buferinio tirpalo, kurį reikėtų sumaišyti su 10 µl tirpiklio kontrolinio ėminio, etaloninio estrogeno (E2), silpnai jungiamos medžiagos, nejungiamos medžiagos ir bandomųjų cheminių medžiagų tirpalų, ir įpilti 10 µl 5 nM [^{3}H]-17β-estradiolio tirpalo. Tada į kiekvieną plokštelę įpilama 30 µl ledinio receptoriaus tirpalo ir nestipriai maišoma. hrERα tirpalas turėtų būti paskutinis pridedamas reagentas. Bandymo mikrotitravimo plokštelės turėtų būti inkubuojamos 2 h kambario temperatūroje (nuo 22 °C iki 28 °C).

6 lentelė

Bandymo komponentų mikrotitravimo plokštelėse tūris, atliekant konkurencinio prijungimo prie hrER bandymą

Ruošimo veiksmai		Kiti nei TB šulinėliai	TB šulinėliai	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)
Pirmiau nurodytų reakcijos šulinėlių komponentų tūris ir įpylimo tvarka	Kambario temperatūros bandymo buferinis tirpalas	50 µl	60 µl	90 µl
	Nežymėtasis E2, silpnai jungiama medžiaga, nejungiama medžiaga, tirpiklis ir bandomosios cheminės medžiagos (*)	10 µl	–	–
	[^{3}H]-17β-estradiolis galutinei 0,5 nM koncentracijai gauti (t. y. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα koncentracija, kaip nustatyta (žr. 12–13 pastraipas)	30 µl	30 µl	-
Bendrasis kiekvieno šulinėlio tūris		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Tinkamai paruoštas galutinei koncentracijai gauti naudojant priimtinos koncentracijos tirpiklį.

38. Tada reikėtų atlikti prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio kiekybinį nustatymą, kaip aprašyta 3 priedėlio sotinamojo prijungimo bandymo 21–23 pastraipose, atskyrus prie hrERα prijungtą [^{3}H]-17β-estradiolį nuo laisvojo [^{3}H]-17β-estradiolio, į kiekvieną šulinėlį įpilant 80 µl ledinės DCC suspensijos.

39. G10-12 ir H10-12 šulinėliai (identifikuoti kaip tuštieji ėminiai (žymėtojo ėminio) 4 lentelėje) rodo žymėtojo [^{3}H]-estradiolio dpm 10 µl. 10 µl alikvotinį tūrį reikėtų įpilti tiesiai į scintiliacijų skystį.

Priimtinumo kriterijai

Sotinamojo prijungimo bandymas

40. Naudojant vis didesnę [^{3}H]-17β-estradiolio koncentraciją, turėtų būti pasiekta specifinio prijungimo kreivės gulstė, kuri rodo hrERα prisotinimą ligandu.

41. Specifinis prijungimas, esant 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracijai, turėtų patekti į priimtiną nuo 30 % iki 50 % bendrojo radioaktyvumo, pridėto atliekant visus atskirus bandymus, išmatuoto vidurkio intervalą. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją ir kartoti sotinamojo prijungimo bandymą.

42. Duomenims turėtų būti gautas tiesinis Scatchardo grafikas.

43. Nespecifinis prijungimas neturėtų būti per didelis. Nespecifinio prijungimo vertė paprastai turėtų būti < 35 % bendrojo prijungimo. Tačiau santykis kartais gali būti gerokai didesnis nei ši riba, kai bandant mažiausios koncentracijos radioaktyviuoju izotopu žymėtą 17β-estradiolį matuojamas labai mažas dpm.

Konkurencinio prijungimo bandymas

44. Vis didėjančios koncentracijos nežymėtasis 17β-estradiolis turėtų pavaduoti [^{3}H]-17β-estradiolį prie receptoriaus konkurencinį prijungimą vienoje vietoje atitinkančiu būdu.

45. Pamatinio estrogeno (t. y. 17β-estradiolio) IC_{50} vertė turėtų būti maždaug lygi molinei [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracijai plius K_d, nustatytą atliekant sotinamojo prijungimo bandymą.

46. Bendrasis specifinis prijungimas nuolat turėtų patekti į priimtiną 40 ± 10 % intervalą, kai atliekant visus atskirus bandymus į kiekvieną šulinėlį pridėto bendrojo radioaktyvumo vidutinė išmatuota koncentracija buvo 0,5 nM. Atsitiktiniai nedideli nukrypimai nuo šių intervalo ribų yra priimtini, tačiau, jei atskirų bandymų rezultatai nuolat yra už šio intervalo ribų arba kurio nors atskiro bandymo rezultatas reikšmingai neatitinka šio intervalo, reikia koreguoti baltymo koncentraciją.

47. Tirpiklis neturėtų pakeisti bandymo jautrį arba atkuriamumą. Tirpiklio kontrolinio ėminio rezultatai (TB šulinėliai) lyginami su buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatais, kad būtų galima patikrinti, ar naudojamas tirpiklis nedaro įtakos bandymo sistemai. TB ir buferinio tirpalo kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti palyginami, jei tirpiklis nedaro įtakos bandymui.

48. Nejungiama medžiaga neturėtų pavaduoti daugiau kaip 25 % prie hrERα prijungto [^{3}H]-17β-estradiolio, kai jos bandymo koncentracija yra ne didesnė kaip 10^{-3} M (OTES) arba 10^{-4} M (DBP).

49. Veiksmingumo kriterijai buvo sukurti etaloniniam estrogenui ir dviem silpnai jungiamoms medžiagoms (pvz., noretinodreliui, noretindronui), naudojant CERI prijungimo prie hrER bandymo patvirtinimo tyrimo duomenis (2 nuorodos N priedas). Pateikti keturių patvirtinimo tyrime dalyvavusių laboratorijų visų atskirtų kontrolinių ėminių atskirų bandymų vidurkio ± SN (n) 95 % pasikliovimo intervalai. Buvo apskaičiuoti etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kreivės priderinimo parametrų (t. y. viršaus, apačios, Hillo krypties koeficiento, log IC_{50}) ir silpnai jungiamų medžiagų $\log_{10}$RBA atžvilgiu etaloninio estrogeno 95 % pasikliovimo intervalai. 1 lentelėje pateikti kreivės priderinimo parametrų, kurie gali būti naudojami kaip veiksmingumo kriterijai, tikėtini intervalai. Praktiškai IC_{50} intervalas gali kažkiek kisti priklausomai nuo bandymo keliu gauto receptoriaus kompozicijos K_d ir atliekant bandymą naudojamo radioaktyviuoju izotopu žymėto ligando koncentracijos.

50. Bandomųjų cheminių medžiagų kreivės priderinimo parametrų veiksmingumo kriterijai nebuvo sukurti dėl labai didelės grupės potencialių bandomųjų cheminių medžiagų ir dėl potencialaus gimiringumo bei rezultatų kitimo (pvz., visa kreivė, dalinė kreivė, nėra kreivės priderinimo). Tačiau, atliekant kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pakankamai platus (pvz., 90 % - 100 % prijungimo), kad būtų galima aiškiai nustatyti konkurencinio prijungimo kreivės viršutinę dalį. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinių ėminių, taip pat 3 nevienalaikių atskirų bandymų rezultatų kintamumas turėtų būti priimtinas ir moksliškai pagrįstas. Kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo kontroliniai ėminiai turėtų artėti prie nurodytų šio CERI bandymo veiksmingumo matų ir atitikti kiekvienos atitinkamos laboratorijos istorinius kontrolinių ėminių duomenis.

DUOMENŲ ANALIZĖ

Sotinamojo prijungimo bandymas

51. Matuojamas bendrasis ir nespecifinis prijungimas. Pagal šias vertes apskaičiuojamas didėjančios koncentracijos [^{3}H]-17β-estradiolio specifinis prijungimas pusiausvyros sąlygomis, iš bendrojo prijungimo rezultato atimant nespecifinio prijungimo rezultatą. Specifinio prijungimo priklausomybės nuo [^{3}H]-17β-estradiolio koncentracijos kreivėje turėtų būti gauta didžiausiojo specifinio prijungimo gulstė, kuri rodo hrERα prisotinimą [^{3}H]-17β-estradioliu. Be to, duomenų analizė turėtų dokumentuoti [^{3}H]-17β- estradiolio prijungimą vienoje, didelio gimiringumo prijungimo vietoje. Sotinamojo prijungimo kreivėje turėtų būti rodomas nespecifinis, bendrasis ir specifinis prijungimas. Toliau šie duomenys turėtų būti analizuojami atliekant netiesinės regresijos analizę (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.), kai galutinai duomenys pateikiami kaip Scatchardo grafikas.

52. Atliekant duomenų analizę, B_{max} ir K_d turėtų būti nustatomi vien tik pagal bendrojo prijungimo duomenis, darant prielaidą, kad nespecifinis prijungimas yra tiesinis, jei nebūtų pagrįstas skirtingo metodo taikymas. Be to, reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Turėtų būti nurodytas atspariosios regresijos metodas. Visada reikėtų atlikti koregavimą dėl ligando kiekio sumažėjimo (pvz., taikant Swillens metodą, 1995 m.), kai pagal sotinamojo prijungimo duomenis nustatoma B_{max} ir K_d.

Konkurencinio prijungimo bandymas

53. Konkurencinio prijungimo kreivė braižoma kaip specifinio [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo priklausomybės nuo konkurento koncentracijos (išreikštos $\log_{10}$ vienetais) kreivė. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant slopinama 50 % didžiausiojo specifinio [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo yra IC_{50} vertė.

54. Teigiamų kontrolinių ėminių (pvz., etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hill lygčiai priderinti. (pvz., BioSoft; McPherson, 1985 m.; Motulsky, 1995 m.). Priderinant šias kreives, viršus, apačia, krypties koeficientas ir log(IC_{50}) paprastai turėtų likti neapriboti. Reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Koregavimas dėl ligando kiekio sumažėjimo neturėtų būti atliekamas. Po pradinės analizės kiekviena prijungimo kreivė turėtų būti analizuojama iš naujo, kad būtų užtikrintas geriausias priderinimas prie modelio. Silpnai jungiamos medžiagos santykinį prijungimo gimiringumą (RBA) reikėtų skaičiuoti kaip procentais išreikštą silpnai jungiamos medžiagos log (IC_{50}) ir 17β-estradiolio log (IC_{50}) santykį. Teigiamų medžiagų kontrolinių ėminių ir nejungiamos medžiagos kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti įvertinti, taikant 3 priedėlio 44–49 pastraipose pateiktus naudojimo charakteristikų matus.

55. Visų bandomųjų cheminių medžiagų duomenys turėtų būti analizuojami taikant pakopinį metodą, siekiant užtikrinti, kad duomenų analizė būtų tinkamai atlikta ir kiekviena konkurencinio prijungimo kreivė būtų teisingai klasifikuojama. Rekomenduojama, kad iš pradžių būtų atliekama kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo standartizuota duomenų analizė, kuri atitiktų etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kontrolinių ėminių analizę (žr. šio 3 priedėlio 54 pastraipą). Baigus šią analizę, reikėtų atlikti kiekvieno atskiro bandymo techninę kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurtai konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Atliekant šią techninę analizę gauti specifiškai prijungiamo ^{3}H]-17β-estradiolio procentinės dalies sumažėjimo priklausomai nuo koncentracijos stebėjimo duomenys, mažas kiekvienos koncentracijos techninių kartotinių ėminių kintamumas ir trims atskiriems bandymams gautas priderinimo parametrų pastovumas yra geras tinkamo bandymų atlikimo ir duomenų analizės rodiklis.

Duomenų aiškinimas

56. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma prie hrERα jungiama medžiaga, jei gali būti priderinta prijungimo kreivė ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 % (1 paveikslas).

57. Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma nejungiama prie hrERα, jei:

— galima priderinti prijungimo kreivę ir duomenų intervalą atitinkančio žemiausio priderintos atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %, arba

— prijungimo kreivė negali būti priderinta ir procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.

58. Bandomosios cheminės medžiagos laikomos abejotinomis medžiagomis, jei nevykdoma jokia iš pirmiau nurodytų sąlygų (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

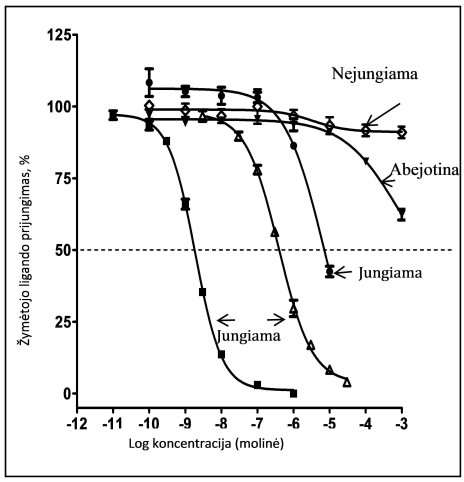
7 lentelė

Klasifikavimo pagal bandomosios cheminės medžiagos konkurencinio prijungimo kreivę kriterijai

Klasifikavimas	Kriterijai
Jungiama medžiaga[a]	Prijungimo kreivė gali būti priderinta. **Duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra mažesnė kaip 50 %.**
Nejungiama medžiaga[b]	Jei prijungimo kreivė gali būti priderinta, **duomenų intervalą atitinkančio žemiausio atsako kreivės taško vertė yra didesnė kaip 75 %.** Jei prijungimo kreivė negali būti priderinta, **procentais išreikštas mažiausias neišlygintas vidutinis prijungimas tarp koncentracijų grupių duomenų yra didesnis kaip 75 %.**
Abejotina medžiaga[c]	Atliekant atskirą bandymą bandyta medžiaga, kuri nėra jungiama ar nejungiama (pvz., žemiausias priderintos atsako kreivės taškas yra 76–51 % intervale).

1 paveikslas

Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo naudojant konkurencinio prijungimo kreivę pavyzdžiai



59. Laboratorijoje atlikti bandomosios cheminės medžiagos kartotiniai atskiri bandymai sujungiami kiekvienam iš jų priskiriant skaitinę vertę ir gaunant atskirų bandymų vidurkį, kaip parodyta 8 lentelėje. Kiekvienos laboratorijos sujungtų atskirų bandymų rezultatai lyginami su kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos numanoma klasifikacija.

8 lentelė

Bandomosios cheminės medžiagos klasifikavimo metodas, laboratorijoje atliekant kartotinius atskirus bandymus

Priskirti vertę kiekvienam atskiram bandymui:	
Klasifikavimas	**Skaitinė vertė**
Jungiama medžiaga	2
Abejotina medžiaga	1
Nejungiama medžiaga	0
Klasifikuoti visų atskirų bandymų skaitinės vertės vidurkį:	
Klasifikavimas	**Skaitinė vertė**
Jungiama medžiaga	Vidurkis ≥ 1,5
Abejotina medžiaga	0,5 ≤ vidurkis < 1,5
Nejungiama medžiaga	Vidurkis < 0,5

BANDYMO ATASKAITA

60. Žr. šio bandymo metodo *PRIJUNGIMO PRIE hrER BANDYMO KOMPONENTAI* 24 pastraipą.

3.1 priedėlis

TERMINŲ SĄRAŠAS

[^{3}H]E2– 17β-estradiolis, žymėtas radioaktyviuoju tričio izotopu.

DCC– dekstranu dengtos medžio anglys.

E2– nežymėtas 17β-estradiolis (inertinis).

Bandymo buferinis tirpalas– 10 mM tris-(hidroksimetil)aminometano hidrochlorido, pH 7,4, turinčio 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % glicerolio, 0,2 mM leupeptino, 1 mM ditiotreitolio ir 10 mg/ml galvijų kraujo serumo albumino.

hrERα– žmogaus rekombinantinio estrogenų receptoriaus alfa (ligandų prijungimo domenas).

Kartotinis ėminys– vienas iš kartotinių tos pačios sudėties ir koncentracijos šulinėlių, bandomų vienu metu atliekant vieną atskirą bandymą. Pagal šį protokolą bandomi trys kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminiai; t. y. vienu metu bandomi trys kartotiniai bandomosios cheminės medžiagos kiekvienos koncentracijos ėminiai.

Atskiras bandymas– vienu metu atliekamas viso mikrotitravimo plokštelės bandymo šulinėlių rinkinio bandymas, kai gaunama visa informacija, kuri yra būtina bandomosios cheminės medžiagos prijungimui prie hrERα apibūdinti (t. y. bendrasis [^{3}H]-17β-estradiolis, pridėtas į bandymo šulinėlį, didžiausiasis [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimas prie hrERα, nespecifinis prijungimas ir įvairios koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos bendrasis prijungimas). Atskirą bandymą gali sudaryti keli kaip vienas (t. y. kartotiniai) bandymo šulinėliai viena koncentracijai, bet kadangi pagal šį protokolą reikalaujama bandyti tris kartotinius ėminius, vieną atskirą bandymą sudaro trijų vienos koncentracijos bandymo šulinėlių bandymas. Be to, pagal šį protokolą reikalaujama atlikti tris nepriklausomus (t. y. nevienalaikius) kiekvienos cheminės medžiagos atskirus bandymus.

3.2 priedėlis

KONKURENCINIO PRIJUNGIMO BANDYMO ŠULINĖLIŲ SCHEMA

Plokštelė	**Padėtis**	**Kartotinis ėminys**	**Šulinėlio tipas**	**Šulinėlio kodas**	**Koncentracijos kodas**	**Konkurento pradinė koncentracija (M)**	**hrER pradinio tirpalo tūris (µl)**	**Buferinio tirpalo tūris (µl)**	**Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)**	**Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)**	**Galutinis tūris (µl)**	**Konkurento galutinė koncentracija (M)**
S	A1	1	Tuščias	BK	BK1	–	–	–	–	–	–	–
S	A2	2	Tuščias	BK	BK2	–	–	–	–	–	–	–
S	A3	3	Tuščias	BK	BK3	–	–	–	–	–	–	–
S	B1	1	nežymėtasis E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	nežymėtasis E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	nežymėtasis E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	nežymėtasis E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	nežymėtasis E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	nežymėtasis E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	nežymėtasis E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	nežymėtasis E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	D3	3	nežymėtasis E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	nežymėtasis E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	nežymėtasis E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	nežymėtasis E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	nežymėtasis E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	nežymėtasis E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	nežymėtasis E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	nežymėtasis E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	nežymėtasis E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	nežymėtasis E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	nežymėtasis E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	nežymėtasis E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	nežymėtasis E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	A4	1	noretinodrelis	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrelis	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrelis	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrelis	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrelis	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrelis	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrelis	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrelis	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrelis	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrelis	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrelis	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrelis	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrelis	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	E5	2	noretinodrelis	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrelis	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrelis	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrelis	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrelis	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrelis	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrelis	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrelis	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrelis	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrelis	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrelis	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

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (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

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (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	bendrasis prijungimas	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	bendrasis prijungimas	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	bendrasis prijungimas	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	bendrasis prijungimas	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	B11	5	bendrasis prijungimas	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	bendrasis prijungimas	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Buferinio tirpalo kontrolinis ėminys	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)	Žymėtasis	H1	—	90	—	10	—	100	—

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
S	G11 (*)	2	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)	Žymėtasis	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)	Žymėtasis	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)	Žymėtasis	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)	Žymėtasis	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Tuščiasis ėminys (žymėtojo ėminio)	Žymėtasis	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Nežinoma 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Nežinoma 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Nežinoma 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Nežinoma 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Nežinoma 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Nežinoma 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Nežinoma 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Nežinoma 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Nežinoma 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	D1	1	Nežinoma 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Nežinoma 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Nežinoma 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Nežinoma 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Nežinoma 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Nežinoma 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Nežinoma 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Nežinoma 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Nežinoma 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Nežinoma 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Nežinoma 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Nežinoma 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Nežinoma 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Nežinoma 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	H3	3	Nežinoma 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Nežinoma 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Nežinoma 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Nežinoma 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Nežinoma 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Nežinoma 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Nežinoma 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Nežinoma 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Nežinoma 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Nežinoma 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Nežinoma 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Nežinoma 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Nežinoma 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Nežinoma 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	E5	2	Nežinoma 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Nežinoma 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Nežinoma 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Nežinoma 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Nežinoma 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Nežinoma 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Nežinoma 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Nežinoma 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Nežinoma 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Nežinoma 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Nežinoma 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Nežinoma 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Nežinoma 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Nežinoma 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	B7	1	Nežinoma 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Nežinoma 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Nežinoma 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Nežinoma 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Nežinoma 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Nežinoma 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Nežinoma 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Nežinoma 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Nežinoma 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Nežinoma 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Nežinoma 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Nežinoma 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Nežinoma 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Nežinoma 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	F9	3	Nežinoma 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Nežinoma 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Nežinoma 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Nežinoma 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Nežinoma 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Nežinoma 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Nežinoma 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontrolinis E2 (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontrolinis E2 (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontrolinis E2 (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontrolinis E2 (IC_{50})	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Kontrolinis E2 (IC_{50})	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolinis E2 (IC_{50})	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	C10	1	Kontrolinis NE (max)	S	NEmax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolinis NE (max)	S	NEmax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolinis NE (max)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolinis NE (IC_{50})	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolinis NE (IC_{50})	S	NEIC502	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolinis NE (IC_{50})	S	NEIC503	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	nežymėtasis E2 (didelė)	NS-B	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Plokštelė	Padėtis	Kartotinis ėminys	Šulinėlio tipas	Šulinėlio kodas	Koncentracijos kodas	Konkurento pradinė koncentracija (M)	hrER pradinio tirpalo tūris (µl)	Buferinio tirpalo tūris (µl)	Žymeklio (žymėtojo E2) tūris (µl)	Tūris iš skiedimo plokštelės (µl)	Galutinis tūris (µl)	Konkurento galutinė koncentracija (M)
P1	G10	1	bendrasis prijungimas	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	bendrasis prijungimas	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	bendrasis prijungimas	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	bendrasis prijungimas	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	bendrasis prijungimas	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	bendrasis prijungimas	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Atkreipiamas dėmesys į tai, kad „karšti“ šulinėliai yra tušti inkubavimo metu. 10 µl įpilama tik scintiliacijoms skaičiuoti.

4 priedėlis

PRIJUNGIMO PRIE HRER KONKURENCINIO BANDYMO DUOMENŲ ANALIZĖS ASPEKTAI

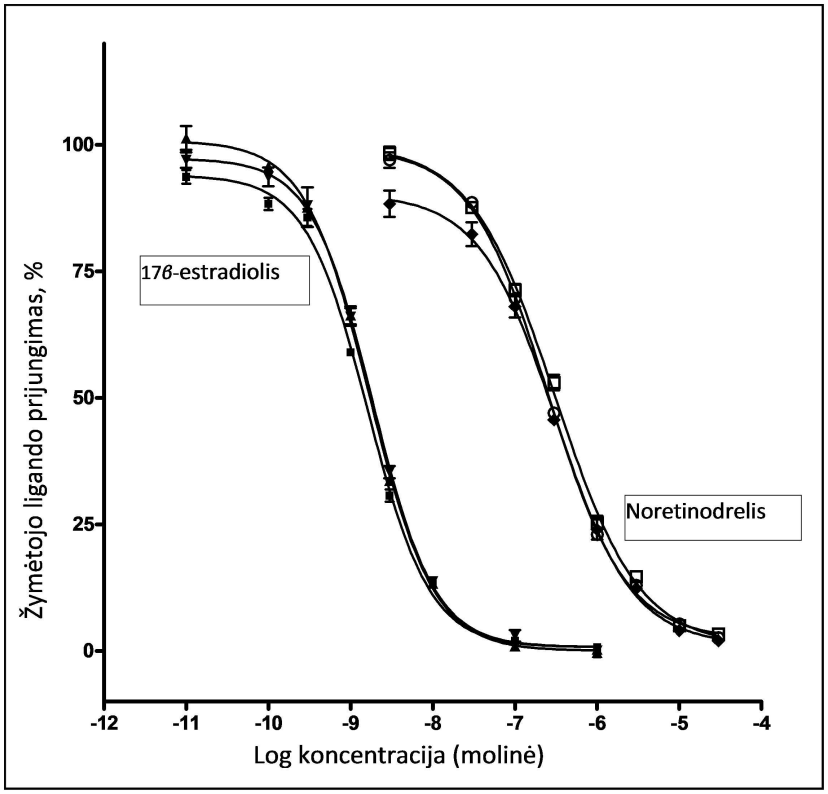
1. Atliekant konkurencinio prijungimo prie hrERα bandymą matuojamas vienos koncentracijos [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimas, esant vis didesnei bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Konkurencinio prijungimo kreivė braižoma kaip specifinio [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo priklausomybės nuo konkurento koncentracijos (log10 vienetai) kreivė. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant slopinama 50 % didžiausiojo specifinio [^{3}H]-17β-estradiolio prijungimo yra IC_{50}.

   Etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos duomenų analizė (1)

2. Kontrolinių ėminių atskirų bandymų duomenys yra transformuojami (t. y [^{3}H]-17β-estradiolio specifinio prijungimo procentinė dalis ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmas) tolesnei analizei. Teigiamų kontrolinių ėminių
   (pvz., etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos) įverčiai turėtų būti nustatyti naudojant tinkamą netiesinio kreivių priderinimo programą keturių parametrų Hill lygčiai priderinti (pvz., BioSoft; GraphPad Prism) (2). Priderinant šias kreives, viršus, apačia, krypties koeficientas ir log(IC50) paprastai gali likti neapriboti. Reikėtų naudoti atspariąją regresiją, kai nustatomas geriausias priderinimas, jei nebūtų pateiktas pagrindimas. Turėtų būti nurodytas atspariosios regresijos metodas. Koregavimas dėl ligando kiekio sumažėjimo nebuvo būtinas atliekant FW ar CERI hrER bandymus, bet į jį galima atsižvelgti, jei reikia. Po pradinės analizės kiekviena prijungimo kreivė turėtų būti analizuojama iš naujo, kad būtų užtikrintas geriausias priderinimas prie modelio. Silpnai jungiamos medžiagos santykinį prijungimo giminingumą (RBA) galima skaičiuoti kaip procentais išreikštą silpnai jungiamos medžiagos log (IC_{50}) ir 17β-estradiolio log (IC_{50}) santykį. Teigiamų medžiagų kontrolinių ėminių ir nejungiamos medžiagos kontrolinio ėminio rezultatai turėtų būti įvertinti, taikant naudojimo charakteristikų matus ir priimtinumo kriterijus, kaip aprašyta šiame bandymo metode (20 pastraipa), 2 priedėlyje (FW bandymas, 41–51 pastraipos) ir 3 priedėlyje (CERI bandymas, 41–51 pastraipos). Etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamos medžiagos 3 atskirų bandymų pavyzdžiai pateikti 1 paveiksle.

1 paveikslas.

Etaloninio estrogeno ir kontrolinės silpnai jungiamos medžiagos konkurencinio prijungimo kreivių pavyzdžiai



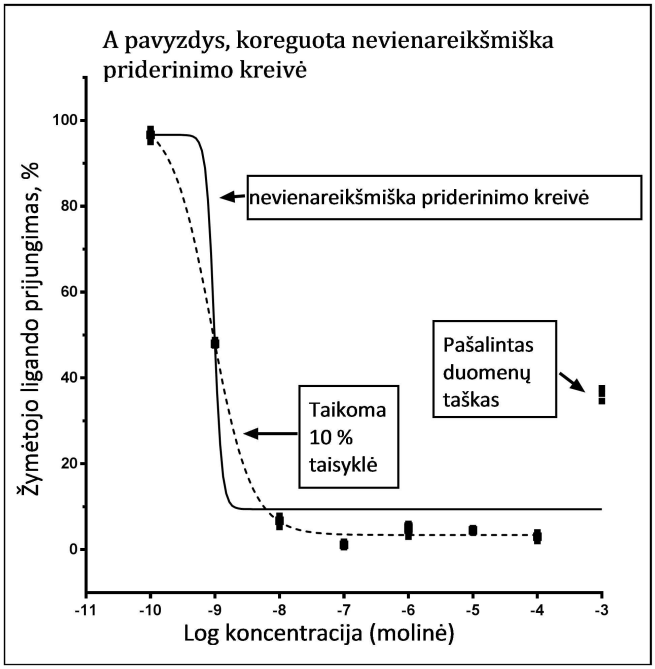
Bandomųjų cheminių medžiagų duomenų analizė

3. Visų bandomųjų cheminių medžiagų duomenys turėtų būti analizuojami taikant pakopinį metodą, siekiant užtikrinti, kad duomenų analizė būtų tinkamai atlikta ir kiekviena konkurencinio prijungimo kreivė būtų teisingai klasifikuojama. Iš pradžių reikėtų atlikti bandomosios cheminės medžiagos kiekvieno atskiro bandymo standartizuotą duomenų analizę, kuri atitiktų etaloninio estrogeno ir silpnai jungiamų medžiagų kontrolinių ėminių analizę. Baigus šią analizę, reikėtų atlikti kiekvieno atskiro bandymo techninę kreivės priderinimo parametrų analizę, taip pat vizualią duomenų atitikties sukurtai konkurencinio prijungimo kreivei analizę. Atliekant šią techninę analizę gauti specifiškai prijungiamo ^{3}H]-17β-estradiolio procentinės dalies sumažėjimo priklausomai nuo koncentracijos stebėjimo duomenys, mažas kiekvienos koncentracijos techninių kartotinių ėminių kintamumas ir trims atskiriems bandymams gautas priderinimo parametrų pastovumas yra geras tinkamo bandymų atlikimo ir duomenų analizės rodiklis. Atliekant kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos atskiro bandymo rezultatų analizę reikėtų, kad juos įvertintų specialistai, ir duomenys, naudojami kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai klasifikuoti kaip jungiamai ar nejungiamai turėtų būti moksliškai pagrįsti.

4. Kartais gali pasitaikyti tokie duomenys, kuriems reikia skirti papildomą dėmesį, kad būtų galima tinkamai analizuoti ir aiškinti prijungimo prie hrER duomenis. Atliekant ankstesnius tyrimus būdavo atvejų, kai konkurencinio prijungimo prie receptoriaus duomenų analizę ir aiškinimą galėjo apsunkinti specifinio prijungimo procentinės dalies padidėjimas, kai bandomos didžiausios koncentracijos cheminės medžiagos (2 paveikslas). Tai yra gerai žinoma problema, su kuria susiduriama, kai protokolai naudojami atliekant kelis konkurencinio prijungimo prie receptoriaus bandymus(3). Šiais atvejais nuo koncentracijos priklausomas atsakas stebimas esant mažesnei koncentracijai, bet bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai artėjant prie tirpumo ribos [^{3}H]17β-estradiolio pavadavimas nebemažėja. Šiais atvejais didesnėms koncentracijoms gauti duomenys rodo, kad pasiekta bandymo biologinė riba. Pavyzdžiui, šis reiškinys labai dažnai yra susijęs su cheminės medžiagos netirpumu ir nuosėdų susidarymu, esant didelei koncentracijai, arba jis gali rodyti, kad dekstranu dengtos medžio anglys nesugeba atskirti neprijungtą radioaktyviuoju izotopu žymėtą ligandą, esant didžiausioms cheminių medžiagų koncentracijoms. Jei tokie duomenų taškai paliekami konkurencinio prijungimo duomenis derinant prie sigmoidės, kartais gali būti klaidingai klasifikuojamas bandomosios cheminės medžiagos prijungimo prie ER potencialas (2 paveikslas). Siekiant to išvengti, pagal FW ir CERI prijungimo prie hrER bandymo protokolus iš analizės duomenų galima pašalinti tuos taškus, kurių kartotinių ėminių
[^{3}H]17β-estradiolio specifinio prijungimo vidurkio procentinė dalis yra 10 % arba daugiau didesnė nei esant mažesnei koncentracijai stebima vidutinė vertė (t. y. tai paprastai vadinama 10 % taisykle). Ši taisyklė gali būti taikoma tik kartą konkrečiai kreivei, ir turi likti ne mažiau kaip likusių 6 koncentracijos verčių duomenys, kad kreivę būtų tinkamai klasifikuoti.

2 paveikslas.

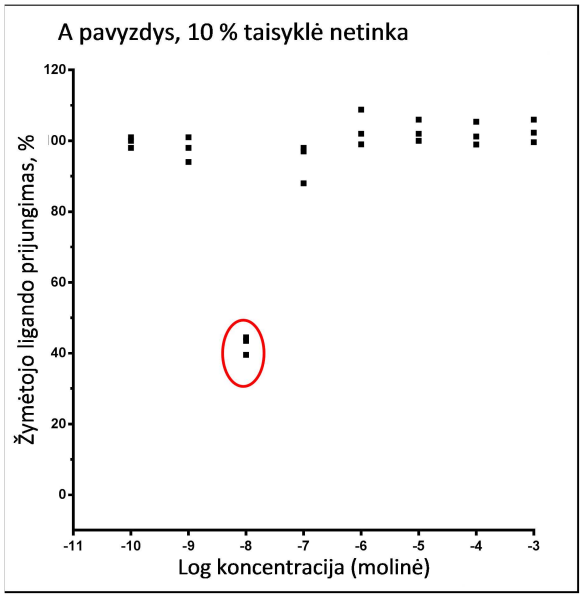
Konkurencinio prijungimo kreivių, taikant 10 % taisyklę ir jos netaikant, pavyzdžiai

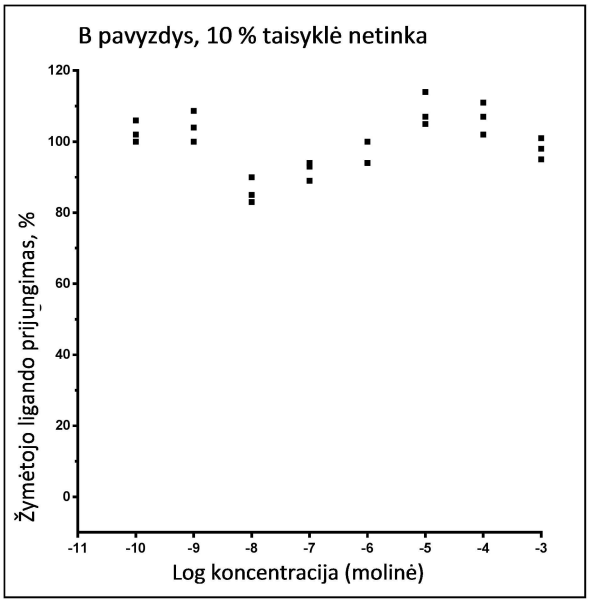


5. Reikėtų atidžiai atsižvelgti į galimybę tinkamai taikyti 10 % taisyklę šioms kreivėms koreguoti ir tai turėtų būti daroma tik tais atvejais, kai yra aiškių įrodymų, kad tai yra prie hrER jungiama medžiaga. Atliekant FW hrER prijungimo bandymo patvirtinimo tyrimo bandymus buvo pastebėta, kad 10 % taisyklės taikymas kartais turėjo netikėtas ir nenumatytas pasekmes. Cheminėms medžiagoms, kurios nesijungia prie receptoriaus (t. y., tikros nejungiamos medžiagos), kintamumas esant maždaug 100 % žymėtojo ligando prijungimui tirtų koncentracijų diapazone buvo didesnis nei 10 %. Jei mažiausioji vertė pasitaikydavo esant mažai koncentracijai, taikant 10 % taisyklę iš analizės galėtų būti pašalinti visų didesnių koncentracijų duomenys, netgi tais atvejais, kai tos koncentracijos galėtų būti naudingos nustatant, ar cheminė medžiaga yra nejungiama medžiaga. 3 paveiksle pateikti pavyzdžiai, kuriems 10 % taisyklė netinka.

3 paveikslas.

Konkurencinio prijungimo duomenų, kuriems netinka 10 % taisyklė, pavyzdžiai





NUORODOS

(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 ODOS JAUTRINIMO *IN VITRO* TYRIMAI, PER KURIUOS TIRIAMAS ODOS JAUTRINIMO NEPALANKIOS BAIGTIES KELIO (AOP) PAGRINDINIS ĮVYKIS – DENDRITINIŲ LĄSTELIŲ AKTYVINIMAS

BENDRASIS ĮVADAS

Pagrindiniu dendritinių ląstelių aktyvinimo įvykiu pagrįstas bandymo metodas

1. Odą jautrinanti medžiaga yra tokia medžiaga, kuri susilietusi su oda sukelia alerginę reakciją, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (JT GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP reglamentas) ([1]). Dėl pagrindinių biologinių reiškinių, nuo kurių priklauso odos jautrinimas, yra visuotinai sutariama. Apibendrinus dabartines žinias apie cheminius ir biologinius mechanizmus, susijusius su odos jautrinimu, nustatytas nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) pagal Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (EBPO) AOP programą (2): nuo molekulinio inicijavimo įvykio per tarpinius įvykius iki neigiamo poveikio, t. y. alerginio kontaktinio dermatito. Šiuo atveju molekulinio inicijavimo įvykis (t. y. pirmasis pagrindinis įvykis) yra kovalentinio ryšio atsiradimas tarp elektrofilinių medžiagų ir odos baltymų nukleofilinių centrų. Antrasis pagrindinis šio nepalankios baigties kelio įvykis vyksta keratinocituose ir apima uždegiminius atsakus, taip pat su specifiniais ląstelių signalizavimo keliais (tokiais kaip nuo antioksidacinio ar elektrofilinio atsako elemento (ARE) priklausomi keliai) susijusios genų ekspresijos pokyčius. Trečiasis pagrindinis įvykis yra dendritinių ląstelių aktyvinimas, paprastai vertinamas pagal specifinių ląstelių paviršinių žymenų, chemokinų ir citokinų, ekspresiją. Ketvirtasis pagrindinis įvykis yra T ląstelių aktyvinimas ir proliferacija; tai netiesiogiai vertinama atliekant pelių vietinių limfmazgių tyrimą (LLNA) (3).

2. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 442E (2017). Pagal jį aprašyti tyrimai *in vitro* atliekami tiriant apibūdintus mechanizmus, kurie būdingi odos jautrinimo nepalankios baigties kelio pagrindiniam įvykiui – dendritinių ląstelių aktyvinimui (2). Šį bandymų metodą sudaro bandymai, naudotini siekiant pagrįsti odą jautrinančių medžiagų skyrimą nuo nejautrinančių medžiagų pagal JT GHS ir CLP sistemą.

   Pagal šį bandymų metodą aprašyti bandymai yra:

   — žmogaus ląstelių linijos aktyvinimo bandymas (h-CLAT);

   — U937 ląstelių linijos aktyvinimo bandymas (U-SENS™);

   — interleukino-8 reporterinio geno tyrimas (IL-8 Luc tyrimas).

3. Į šį bandymų metodą ir į atitinkamas EBPO bandymų gaires įtraukti bandymai gali skirtis naudojama procedūra, pagal kurią gaunami duomenys, ir išmatuotais rodmenimis, bet juos galima vienodai naudoti laikantis valstybių reikalavimų pateikti bandymų rezultatus dėl odos jautrinimo nepalankios baigties kelio pagrindinio įvykio – dendritinių ląstelių aktyvinimo ir pasinaudoti EBPO savitarpiu duomenų pripažinimu (angl. *Mutual Acceptance of Data*).

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353/1, 2008 12 31.

Į šį pagrindiniu įvykiu pagrįstą bandymų metodą įtrauktų bandymų aplinkybės ir principai

4. Odos jautrinimo vertinimas paprastai atliekamas naudojant bandomuosius gyvūnus. Klasikiniai metodai, pagal kuriuos naudojamos jūrų kiaulytės, yra Magnusson'o ir Kligman'o maksimizacijos bandymas su jūrų kiaulytėmis (GMPT) ir Buehler'io bandymas (TM B.6) (4): pagal juos vertinami odos jautrinimo indukcijos ir atsako sukėlimo tarpsniai. Atliekant bandymus su pelėmis, t. y. LLNA (TM B.42) (3) ir du jo variantus nenaudojant radioaktyviųjų medžiagų, LLNA: DA (TM B.50) (5) ir LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), visais atvejais vertinamas tik atsakas į indukciją ir jie taip pat yra pripažinti, nes pranašesni už bandymus su jūrų kiaulytėmis gyvūnų gerovės atžvilgiu ir juos atliekant objektyviai vertinamas odos jautrinimo indukcijos tarpsnis.

5. Neseniai patvirtinti *in chemico* ir *in vitro* mechanizmų tyrimais pagrįsti bandymų metodai, pagal kuriuos tiriamas odos jautrinimo nepalankios baigties kelio pirmasis pagrindinis įvykis (TM B.59; tiesioginio peptidų reaktyvumo tyrimas (7)) ir antrasis pagrindinis įvykis (TM B.60; ARE-Nrf2 liuciferazės bandymo metodas (8)), padedantys vertinti potencialų cheminių medžiagų odos jautrinimo pavojingumą.

6. Pagal šį bandymų metodą aprašytais bandymais arba kiekybiškai nustatomas vieno arba kelių ląstelių paviršinių žymenų, siejamų su monocitų ir dendritinių ląstelių aktyvinimo procesu po jautrinančių medžiagų poveikio (pvz., CD54, CD86), ekspresijos pokytis, arba IL-8 (citokino, siejamo su dendritinių ląstelių aktyvinimu) ekspresijos pokyčiai. Pranešama, kad odą jautrinančios medžiagos sužadina ląstelių membranos žymenų, tokių kaip CD40, CD54, CD80, CD83 ir CD86, ekspresiją kartu su prouždegiminių citokinų, tokių kaip IL-1β ir TNF-α, ir kelių chemokinų, įskaitant IL-8 (CXCL8) ir CCL3 (9) (10) (11) (12), siejamų su dendritinių ląstelių aktyvinimu, indukcija (2).

7. Tačiau kadangi dendritinių ląstelių aktyvinimas yra tik vienas iš pagrindinių odos jautrinimo nepalankios baigties kelio (AOP) įvykių (2) (13), informacijos, gautos vien bandymais, per kuriuos matuojami dendritinių ląstelių aktyvinimo žymenys, gali nepakakti, kad būtų galima daryti išvadą dėl to, ar cheminės medžiagos geba jautrinti odą, ar ne. Todėl siūloma duomenimis, gautais atlikus šiame bandymų metodo aprašyme aprašytus bandymus, papildomai pasinaudoti skiriant odą jautrinančias (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų, naudojant juos pagal integruotuosius bandymo ir vertinimo metodus (angl. *Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA) kartu su kita aktualia papildoma informacija, pvz., gauta iš tyrimų *in vitro* dėl kitų pagrindinių odos jautrinimo AOP įvykių, ir ne bandymų metodais, įskaitant cheminių analogų duomenų naudojimą (analogijos metodas) (13). Paskelbta pavyzdžių, kaip šiais bandymais gauti duomenys naudojami pagal apibrėžtuosius metodus (angl. *Defined Approaches*) – t. y. metodus, pagal kuriuos standartizuoti tiek konkretūs naudojami informacijos šaltiniai, tiek procedūra, pagal kurią, remiantis duomenimis, daromos prognozės (13), ir jie gali būti naudingi elementai IATA sistemoje.

8. Šiame bandymų metodo aprašyme aprašytais bandymais negalima atskirai remtis nei priskiriant odą jautrinančias medžiagas 1A ir 1B subkategorijoms, apibrėžtoms JT GHS arba CLP sistemoje (kai institucijos naudoja šias dvi neprivalomas subkategorijas), nei prognozuojant medžiagų jautrinimo gebą, kai reikia priimti saugos vertinimo sprendimus. Tačiau, priklausomai nuo reglamentavimo sistemos, teigiami rezultatai, gauti šiais metodais, gali būti atskirai naudojami priskiriant cheminę medžiagą prie JT GHS ar CLP 1 kategorijos medžiagų.

9. Šiame bandymų metodo aprašyme vartojamas terminas „bandomoji cheminė medžiaga" reiškia tai, kas yra bandoma ([1]), ir jo reikšmė nėra susijusi su šių bandymų tinkamumu vienkomponentėms cheminėms medžiagoms, daugiakomponentėms cheminėms medžiagoms ir (arba) mišiniams bandyti. Kol kas turima nedaug informacijos apie šių bandymų tinkamumą daugiakomponentėms medžiagoms ar mišiniams (14) (15); nepaisant to, šie bandymai yra techniškai tinkami daugiakomponentėms medžiagoms ir mišiniams bandyti. Vis dėlto, prieš taikant šį bandymų metodą mišiniui siekiant gauti duomenis numatomu reglamentavimo tikslu, reikėtų apsvarstyti, ar juo galima gauti tam tikslui tinkamus rezultatus (ir, jei taip, kodėl tai yra įmanoma) ([2]). Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra teisės aktais nustatytas reikalavimas atlikti mišinio bandymą. Be to, atliekant daugiakomponenčių medžiagų arba mišinių bandymą reikėtų atsižvelgti į tai, kad citotoksiškos jų sudedamosios dalys gali paveikti stebimus atsakus.

([1]) 2013 m. birželio mėn. EBPO bendrame susitikime susitarta, kad, kai įmanoma, naujose ir atnaujintose EBPO bandymų gairėse terminą „bandomoji cheminė medžiaga" reikėtų nuosekliau vartoti tam, kas bandoma, apibūdinti.

([2]) Šį sakinį buvo pasiūlyta įtraukti ir dėl to susitarta 2014 m. balandžio mėn. WNT darbo grupės susitikime.

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. Paskelbta 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. Paskelbta http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Šio priedo B.42 skyrius. Vietinio limfmazgio tyrimas.

(4) Šio priedo B.6 skyrius. Odos jautrinimas.

(5) Šio priedo B.50 skyrius. Odos jautrinimas. Vietinio limfmazgio tyrimas. DA.

(6) Šio priedo B.51 skyrius. Odos jautrinimas. Vietinio limfmazgio tyrimas. BrdU-ELISA.

(7) Šio priedo B.59 skyrius. Odos jautrinimas *in chemico*. Tiesioginio peptidų reaktyvumo tyrimas (DPRA).

(8) Šio priedo B.60 skyrius. Odos jautrinimas *in vitro*. ARE-Nrf2 liuciferazės bandymo metodas.

(9) Steinman R. M. (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 L. L., 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 Z. U., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y., and Tagami H. (2003). p. 38. 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. Paskelbta https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T., Sakaguchi H., Sono S., Kosaka N., Ishikawa M., Nukada Y., Miyazawa M., Ito Y., Nishiyama N., 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 priedėlis

ODOS JAUTRINIMAS IN VITRO. ŽMOGAUS LĄSTELIŲ LINIJOS AKTYVINIMO BANDYMAS (H-CLAT)

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

1. Atliekant h-CLAT bandymą kiekybiškai nustatomi ląstelių paviršinių žymenų, siejamų su monocitų ir dendritinių ląstelių aktyvinimo procesu (t. y. CD86 ir CD54), ekspresijos pokyčiai žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linijos THP-1 ląstelėse, jas paveikus jautrinančiomis medžiagomis (1) (2). Išmatuoti ląstelių paviršinių žymenų CD86 ir CD54 ekspresijos lygiai naudojami tam, kad padėtų atskirti odą jautrinančias ir jos nejautrinančias medžiagas.

2. Bandymas h-CLAT įvertintas atlikus Europos Sąjungos bandymų su gyvūnais alternatyvų etaloninės laboratorijos (EURL ECVAM) koordinuojamą jo tinkamumo patvirtinimo tyrimą ir paskesnę nepriklausomą ekspertizę, kurią atliko EURL ECVAM mokslinis patariamasis komitetas (ESAC). Atsižvelgus į visus turimus įrodymus ir į reguliavimo institucijų bei suinteresuotųjų subjektų nuomones, bandymas h-CLAT buvo EURL ECVAM rekomenduotas (3) naudoti kaip IATA dalis, kad padėtų skirti odą jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas siekiant jas klasifikuoti pagal pavojingumą ir atitinkamai ženklinti. Bandymo h-CLAT duomenų naudojimo kartu su kita informacija pavyzdžių pateikta literatūroje (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Įrodyta, kad metodą h-CLAT galima pritaikyti laboratorijose, turinčiose ląstelių kultūrų auginimo metodų naudojimo ir tėkmės citometrinės analizės atlikimo patirties. Tikėtinas prognozių laboratorinio ir tarplaboratorinio atkuriamumo lygis atliekant šį bandymą yra apie 80 % (3) (12). Iš rezultatų, gautų atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (13) ir kitus paskelbtus tyrimus (14), apskritai matyti, kad, palyginti su LLNA rezultatais, odą jautrinančių (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančių medžiagų skyrimo tikslumas yra 85 % (N = 142), esant 93 % (94/101) jautriui ir 66 % (27/41) specifiškumui (remiantis EURL ECVAM pakartotine analize (12), atsižvelgiant į visus esamus duomenis ir neatsižvelgiant į neigiamus rezultatus cheminių medžiagų, kurių Log K_{ow} didesnis nei 3,5, kaip aprašyta 4 punkte), atveju. Klaidingai neigiamos prognozės atliekant bandymą h-CLAT yra labiau tikėtinos tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra maža arba vidutinė (t. y. JT GHS ar CLP 1B subkategorijos medžiagų) atveju, negu tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra didelė (t. y. JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (4) (13) (15). Iš visos šios informacijos yra aiškus h-CLAT metodo naudingumas padedant nustatyti odos jautrinimo pavojus. Vis dėlto čia pateiktos tikslumo vertės, kai h-CLAT atliekamas kaip atskiras bandymas, yra tik orientacinės, nes šio bandymo duomenis IATA kontekste reikėtų vertinti kartu su informacija iš kitų šaltinių ir atsižvelgti į bendrojo įvado 7 ir 8 punktuose pateiktas nuostatas. Be to, vertinant odos jautrinimo bandymų ne su gyvūnais metodus, reikėtų turėti omenyje, kad LLNA bandymas ir kiti bandymai su gyvūnais gali nevisiškai tiksliai parodyti su žmonėmis susijusią padėtį.

4. Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, įsitikinta, kad h-CLAT metodas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurių organinės funkcinės grupės, reakcijos mechanizmai, odos jautrinimo geba (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus), fizikinės ir cheminės savybės yra įvairūs (3) (14) (15). Metodas h-CLAT tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra tirpios arba sudaro stabilią dispersiją (t. y. koloidus ar suspensijas, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga neiškrenta į nuosėdas ir nesudaro su tirpikliu ar nešikliu skirtingų fazių) tinkamame tirpiklyje ar nešiklyje (žr. 14 punktą). Klaidingai neigiamų rezultatų paprastai gaunama tada, kai bandomųjų cheminių medžiagų Log K_{ow} didesnis nei 3,5 (14), todėl nereikėtų atsižvelgti į gautus neigiamus rezultatus, kai bandomųjų cheminių medžiagų Log K_{ow} yra didesnis nei 3,5. Tačiau teigiami rezultatai, gauti, kai bandomųjų cheminių medžiagų Log K_{ow} yra didesnis nei 3,5, vis tiek galėtų būti naudojami tam, kad padėtų nustatyti, kad bandomoji cheminė medžiaga yra odą jautrinanti medžiaga. Be to, dėl ribotos metabolinės gebos, būdingos naudojamai ląstelių linijai (16), ir dėl šio bandymo sąlygų, tiriant prohaptenus (t. y. medžiagas, kurias būtina aktyvinti fermentais, pvz., P450 fermentais) ir prehaptenus (t. y. medžiagas, kurios aktyvinamos oksidacija), ypač kai oksidacija vyksta lėtai, taip pat galima gauti neigiamus rezultatus atliekant h-CLAT bandymą (15). Fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos gali būti vertinamos pagal metodą h-CLAT (17), tačiau stipriai fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos, kurių skleidžiamų bangų ilgis toks pat kaip fluoresceino izotiocianato (FITC) ar propidiumo jodido (PI), interferuos atliekant tėkmės citometriją, todėl neįmanoma jų tiksliai įvertinti naudojant FITC konjuguotus antikūnus ar PI. Tokiu atveju gali būti atitinkamai naudojami kiti fluorochromu žymėti antikūnai arba kiti citotoksiškumo žymenys, jei galima įrodyti, kad juos naudojant gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC žymėtus antikūnus (žr. 24 punktą) arba PI (žr. 18 punktą), pvz., atliekant 1.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Atsižvelgiant į tai, kas išdėstyta, neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į nustatytus apribojimus ir kartu remiantis kitais informacijos šaltiniais IATA sistemoje. Tais atvejais, kai yra įrodymų, kad h-CLAT metodas netinkamas taikyti kitų konkrečių kategorijų bandomosioms cheminėms medžiagoms, jo nereikėtų taikyti tų konkrečių kategorijų medžiagoms.

5. Kaip aprašyta pirmiau, h-CLAT metodas padeda skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų; tačiau jis taip pat gali padėti vertinti jautrinimo gebą (4) (5) (9), kai taikomas pagal integruotuosius metodus, tokius kaip IATA. Vis dėlto, siekiant nustatyti, kaip h-CLAT rezultatais būtų galima pagrįsti jautrinimo gebos vertinimą, būtina darbuotis toliau (geriausia remiantis duomenimis apie žmones).

6. Terminų apibrėžtys pateiktos 1.1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

7. h-CLAT metodas yra tyrimas *in vitro*, kurį atliekant kiekybiškai nustatomi ląstelių paviršinių žymenų ekspresijos (t. y. CD86 ir CD54) pokyčiai žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linijos (THP-1 ląstelėse) po 24 valandų veikimo bandomąja chemine medžiaga. Šios paviršinės molekulės yra tipiniai monocitinių THP-1 ląstelių aktyvinimo žymenys ir gali atkartoti dendritinių ląstelių aktyvinimą, kuris yra ypač svarbus T ląstelių aktyvinimui. Paviršinių žymenų ekspresijos pokyčiai matuojami tėkmės citometrijos būdu, prieš tai nudažius ląsteles fluorochromu žymėtais antikūnais. Kartu atliekamas ir citotoksiškumo matavimas, vertinant, ar paviršinių žymenų ekspresijos didinimas vyksta esant mažesnėms nei citotoksiškos koncentracijoms. Santykinis paviršinių žymenų fluorescencijos intensyvumas, palyginti su tirpiklio ar nešiklio kontroliniu bandiniu, apskaičiuojamas ir naudojamas pagal prognozavimo modelį (žr. 26 punktą), kad padėtų atskirti jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

8. Prieš pradėdamos įprastai atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją naudodamos 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, kurių sąrašas pateiktas 1.2 priedėlyje. Be to, šio bandymo naudotojai turėtų turėti ankstesnių duomenų bazę, kurioje būtų kaupiami duomenys, gauti atliekant reaktyvumo patikrinimus (žr. 11 punktą) ir naudojant teigiamus bei tirpiklio ar nešiklio kontrolinius bandinius (žr. 20–22 punktus), ir šiais duomenimis naudotis, kad patvirtintų tolesnį šio bandymo atkuriamumą savo laboratorijoje laikui bėgant.

PROCEDŪRA

9. Šis bandymas pagrįstas h-CLAT DB-ALM (angl. *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation* – bandymams su gyvūnais alternatyvių metodų duomenų bazės paslauga) protokolu Nr. 158 (18) – šis protokolas naudotas atliekant EURL ECVAM koordinuotą tinkamumo patvirtinimo tyrimą. Rekomenduojama taikyti šį protokolą diegiant ir naudojant h-CLAT metodą laboratorijoje. Toliau aprašyti pagrindiniai komponentai ir procedūros pagal h-CLAT metodą, kuris susideda iš dviejų etapų: *dozės nustatymo tyrimo* ir *CD86/CD54 ekspresijos vertinimo*.

Ląstelių paruošimas

10. Atliekant bandymą pagal h-CLAT metodą turėtų būti naudojama žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linija THP-1. Patartina, kad ląstelės (TIB-202™) būtų gautos iš kvalifikuoto ląstelių banko, tokio kaip „American Type Culture Collection“.

11. THP-1 ląstelės auginamos 37°C temperatūroje, esant 5 % CO_2 ir drėgnai atmosferai, terpėje RPMI-1640, papildytoje 10 % galvijų vaisiaus serumo (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanolio, 100 vnt./ml penicilino ir 100 μg/ml streptomicino. Auginimo terpėje galima ir nenaudoti penicilino ir streptomicino, tačiau tokiu atveju naudotojai turėtų įsitikinti, jog tai, kad auginimo terpėje nėra antibiotikų, neturi poveikio rezultatams, pavyzdžiui, atlikdami 1.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Bet kokiu atveju, siekiant kuo labiau sumažinti užkrėtimo riziką, reikėtų laikytis gerosios ląstelių auginimo praktikos nepriklausomai nuo to, ar ląstelių auginimo terpėje yra antibiotikų, ar ne. THP-1 ląstelės reguliariai sėjamos kas 2–3 dienas nuo 0,1 iki 0,2 × 10^6 ląstelių/ml tankiu. Jų tankis turėtų būti palaikomas nuo 0,1 iki 1,0 × 10^6 ląstelių/ml intervale. Prieš naudojant ląsteles bandymui, reikėtų patikrinti jų tinkamumą, atliekant reaktyvumo patikrinimą. Ląstelių reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas praėjus dviem savaitėms po atitirpinimo, naudojant teigiamus kontrolinius bandinius su 2,4-dinitrochlorbenzenu (DNCB) (CAS Nr. 97-00-7, ≥99 % grynumo) ir nikelio sulfatu ($NiSO_4$) (CAS Nr. 10101-97-0, ≥99 % grynumo) ir neigiamą kontrolinį bandinį su pieno rūgštimi (CAS Nr. 50-21-5, ≥85 % grynumo). Naudojant ir DNCB, ir $NiSO_4$ turėtų būti gauti teigiami ir CD86, ir CD54 ląstelių paviršinių žymenų atsakai, o naudojant pieno rūgštį turėtų būti gauti neigiami atsakai ir CD86, ir CD54 ląstelių paviršinių žymenų atveju. Tyrimui turi būti naudojamos tik tokios ląstelės, kurių reaktyvumo patikrinimas atliktas. Ląsteles galima dauginti ne ilgiau kaip du mėnesius po atitirpinimo. Sėjimų skaičius neturėtų viršyti 30. Reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas pagal 20–24 punktuose aprašytas procedūras.

12. Bandymui THP-1 ląstelės sėjamos 0,1 × 10^6 ląstelių/ml arba 0,2 × 10^6 ląstelių/ml tankiu ir jų kultūra iš anksto ruošiama auginimo kolbose atitinkamai 72 valandas arba 48 valandas. Svarbu, kad ląstelių tankis auginimo kolboje iškart po kultūros paruošimo periodo būtų kuo pastovesnis atliekant kiekvieną bandymą (renkantis vieną iš dviejų pirmiau apibūdintų kultūros paruošimo sąlygų), nes ląstelių tankis auginimo kolboje iškart po kultūros paruošimo gali turėti įtakos CD86/CD54 ekspresijai, sukeliamai alergenų (19). Bandymo dieną iš auginimo kolbos surinktos ląstelės resuspenduojamos naujoje auginimo terpėje 2 × 10^6 ląstelių/ml tankiu. Tada ląstelės paskirstomos 24 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje, kurios duobučių tūris (500 µl, 1 × 10^6 ląstelių į kiekvieną duobutę), arba 96 duobučių plokščiadugnėje plokštelėje, kurios duobučių tūris (80 µl, 1,6 × 10^5 ląstelių į kiekvieną duobutę).

Dozės nustatymo tyrimas

13. *Dozės nustatymo tyrimas* atliekamas siekiant nustatyti CV75 – bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuriai esant ląstelių gyvybingumas (angl. CV) yra 75 %, palyginti su tirpiklio ar nešiklio kontroliniu bandiniu. CV75 vertė naudojama nustatant bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos vertę, tinkamą *CD86/CD54* ekspresijai matuoti (žr. 20–24 punktus).

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų paruošimas

14. Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Pagal h-CLAT metodą bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba stabiliai disperguojamos (taip pat žr. 4 punktą) fiziologiniame tirpale ar terpėje (šiems tirpikliams ar nešikliams teikiama pirmenybė) arba dimetilsulfokside (DMSO, ≥99 % grynumo), kuris yra antras galimas tirpiklis ar nešiklis, jei bandomoji cheminė medžiaga nėra tirpi arba nesudaro stabilios dispersijos dviejuose pirmiau minėtuose tirpikliuose ar nešikliuose; atitinkamos galutinės koncentracijos yra 100 mg/ml (fiziologiniame tirpale ar terpėje) arba 500 mg/ml (DMSO). Kiti čia neminėti tirpikliai ar nešikliai gali būti naudojami, jei pateikiamas pakankamas mokslinis to pagrindimas. Reikėtų atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos stabilumą galutiniame tirpiklyje ar nešiklyje.

15. Pradedant nuo 100 mg/ml (fiziologiniame tirpale ar terpėje) ar 500 mg/ml (DMSO) bandomųjų cheminių medžiagų pradinių tirpalų, jų skiedimo eiga turėtų būti tokia:

— kai naudojamas tirpiklis ar nešiklis yra fiziologinis tirpalas arba terpė, paruošiami aštuoni (aštuonių koncentracijų) pradiniai tirpalai skiedžiant serijiniu būdu po 2 kartus, naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Tada šie pradiniai tirpalai papildomai 50 kartų praskiedžiami auginimo terpe (darbiniai tirpalai). Jei didžiausia galutinė koncentracija 1 000 µg/ml plokštelėje nėra toksiška, reikėtų pakartotinai nustatyti didžiausią koncentraciją, atliekant naują citotoksiškumo bandymą. Galutinė bandomųjų cheminių medžiagų, ištirpintų arba stabiliai disperguotų fiziologiniame tirpale ar terpėje, koncentracija plokštelėje neturėtų viršyti 5 000 µg/ml;

— kai naudojamas tirpiklis ar nešiklis yra DMSO, paruošiami aštuoni (aštuonių koncentracijų) pradiniai tirpalai skiedžiant serijiniu būdu po 2 kartus, naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Tada šie pradiniai tirpalai papildomai 250 kartų praskiedžiami auginimo terpe (darbiniai tirpalai). Galutinė koncentracija mikrotitravimo plokštelėje neturėtų viršyti 1 000 µg/ml, net jei ši koncentracija nėra toksiška.

Šie darbiniai tirpalai galiausiai naudojami veikimui bandomąja chemine medžiaga tirti, įpilant tiek darbinio tirpalo į THP-1 ląstelių suspensiją plokštelėje, kad jo tūris būtų toks pat kaip ląstelių suspensijos (taip pat žr. 17 punktą), taip dar du kartus jį praskiedžiant (paprastai galutinis koncentracijos verčių intervalas plokštelėje yra 7,81–1 000 µg/ml).

16. Pagal h-CLAT metodą tirpiklio ar nešiklio kontroliniam bandiniui naudojama kultūros auginimo terpė (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra soliubilizuojamos ar stabiliai disperguojamos (žr. 4 punktą) terpėje ar fiziologiniame tirpale) arba DMSO (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios soliubilizuojamos ar stabiliai disperguojamos DMSO), bandymui naudojant vienintelę galutinę 0,2 % koncentraciją plokštelėje. Skiedžiama taip pat, kaip ir darbiniai tirpalai, kaip aprašyta 15 punkte.

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų įterpimas

17. Auginimo terpė arba darbiniai tirpalai, aprašyti 15 ir 16 punktuose, sumaišomi santykiu 1:1 (tūrio) su ląstelių suspensijomis, paruoštomis 24 arba 96 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (žr. 12 punktą). Paruoštos plokštelės 24 ± 0,5 val. inkubuojamos 37°C temperatūroje, esant 5 % CO_2. Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad būtų išvengta lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų garavimo ir kryžminio užteršimo bandomosiomis cheminėmis medžiagomis tarp duobučių, pvz., sandariai uždengiant plokštelę, prieš ją inkubuojant su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (20).

Dažymas propidiumo jodidu (PI)

18. Po 24 ± 0,5 val. veikimo bandomąja chemine medžiaga ląstelės perkeliamos į mėgintuvėlius ir surenkamos centrifuguojant. Paviršinis skystis (supernatantas) pašalinamas, o likusios ląstelės resuspenduojamos 200 µl (jei naudojama 96 duobučių plokštelė) arba 600 µl (jei naudojama 24 duobučių plokštelė) fosfatinio buferinio druskų tirpalo, kuriame yra 0,1 % galvijų serumo albumino (dažymo buferinis tirpalas). 200 µl ląstelių suspensijos perkeliama į 96 duobučių gaubtadugnę mikrotitravimo plokštelę (jei naudojamos 96 duobutės) arba į mikromėgintuvėlį (jei naudojamos 24 duobutės) ir dukart perplaunama 200 µl (jei naudojamos 96 duobutės) ar 600 µl (jei naudojamos 24 duobutės) dažymo buferinio tirpalo. Galiausiai ląstelės resuspenduojamos dažymo buferiniame tirpale (pvz., 400 µl) ir pridedama PI tirpalo (pvz., 20 µl) (pavyzdžiui, galutinė PI koncentracija yra 0,625 µg/ml). Kitos citotoksiškumo žymėjimo medžiagos, tokios kaip 7-aminoaktinomicinas D (7-AAD), tripano mėlis ar kt., gali būti naudojamos, jei galima įrodyti, kad alternatyviais dažais gaunami panašūs rezultatai kaip ir PI, pavyzdžiui, atliekant 1.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus.

Citotoksiškumo matavimas tėkmės citometrijos būdu ir CV75 vertės nustatymas

19. PI sugertis analizuojama tėkmės citometrijos metodu, naudojant duomenų gavimo kanalą FL-3. Iš viso gaunama 10 000 gyvų ląstelių (PI neigiamas). Ląstelių gyvybingumą galima apskaičiuoti naudojant toliau pateiktą lygtį pagal citometrinės analizės programą. Kai ląstelių gyvybingumas yra mažas, turėtų būti gauta iki 30 000 ląstelių, įskaitant negyvas ląsteles. Kitu būdu duomenis galima gauti per vieną minutę po analizės pradžios.

$$Ląstelių\ gyvybingumas = \frac{gyvų\ ląstelių\ skaičius}{bendras\ gautų\ ląstelių\ skaičius} \times 100$$

CV75 vertė (žr. 13 punktą), t. y. koncentracija, kuriai esant išgyvena 75 % THP-1 ląstelių (25 % citotoksiškumas), apskaičiuojama logaritminiu tiesiniu interpoliavimu pagal šią lygtį:

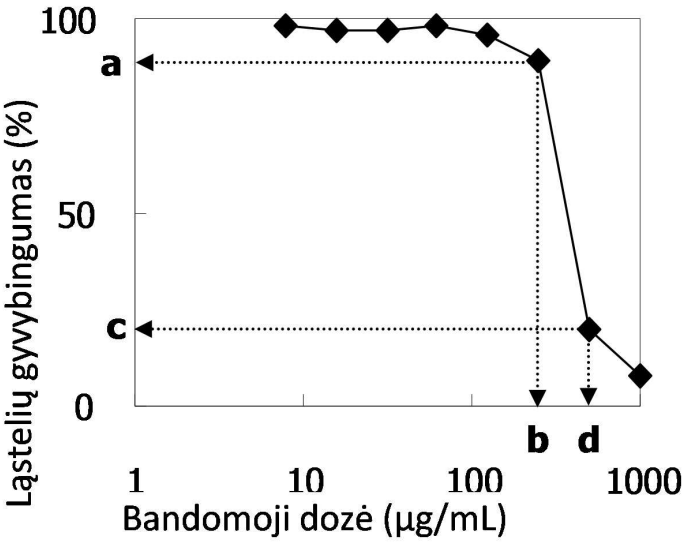
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

kurioje:

a – mažiausia ląstelių gyvybingumo vertė virš 75 %,

c – didžiausia ląstelių gyvybingumo vertė žemiau 75 %,

b ir d – atitinkamos koncentracijos, kurioms esant gautos ląstelių gyvybingumo vertės a ir c.



CV75 vertė gali būti gaunama ir kitais metodais, jei įrodoma, kad tai neturi poveikio rezultatams (pvz., atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus).

CD86/CD54 ekspresijos matavimas

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų paruošimas

20. Bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba stabiliai disperguojamos naudojant tinkamą tirpiklį ar nešiklį (fiziologinį tirpalą, terpę arba DMSO; žr. 14 punktą). Bandomosios cheminės medžiagos visų pirma praskiedžiamos iki tokios koncentracijos, kuri yra 100 kartų (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 500 kartų (jei naudojamas DMSO) didesnė nei 1,2 × CV75 vertė, nustatyta atliekant *dozės nustatymo tyrimą* (žr. 19 punktą). Jei CV75 nustatyti neįmanoma (t. y. jei per *dozės nustatymo tyrimą* nenustatoma pakankamo citotoksiškumo), kaip pradinę koncentraciją reikėtų naudoti didžiausią ištirpintos ar stabiliai disperguotos bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, paruoštą naudojant kiekvieną atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Įsidėmėtina, kad galutinė koncentracija plokštelėje neturėtų viršyti 5 000 μg/ml (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 1 000 μg/ml (jei naudojamas DMSO). Tada paruošiamos po 1,2 karto praskiestų tirpalų serijos naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį, taip gaunant pradinius tirpalus (aštuonių koncentracijų nuo 100×1,2 × CV75 iki 100×0,335 × CV75 (naudojant fiziologinį tirpalą ar terpę) arba nuo 500×1,2 × CV75 iki 500×0,335 × CV75 (naudojant DMSO)), kurie bus naudojami bandymui pagal h-CLAT metodą (žr. DB-ALM protokole Nr. 158 pateiktą dozavimo schemos pavyzdį). Tada pradiniai tirpalai praskiedžiami dar 50 kartų (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 250 kartų (jei naudojamas DMSO) auginimo terpe (darbiniai tirpalai). Šie darbiniai tirpalai galiausiai naudojami veikimui bandomąja chemine medžiaga tirti, dar kartą galutinai du kartus juos praskiedžiant plokštelėje. Jei rezultatai neatitinka 29 ir 30 punktuose apibūdintų priimtinumo kriterijų dėl ląstelių gyvybingumo, *dozės nustatymo tyrimas* gali būti pakartotas, nustatant tikslesnę CV75 vertę. Įsidėmėtina, kad CD86/CD54 ekspresijos matavimui galima naudoti tik 24 duobučių mikrotitravimo plokšteles.

21. Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys paruošiamas taip, kaip aprašyta 16 punkte. Pagal h-CLAT metodą naudojamas teigiamas kontrolinis bandinys su DNCB (žr. 11 punktą), kurio pradiniai tirpalai paruošiami naudojant DMSO ir praskiedžiami taip, kaip aprašyta 20 punkte dėl pradinių tirpalų. DNCB, kaip teigiamas kontrolinis bandinys atliekant *CD86/CD54 ekspresijos matavimą*, turėtų būti naudojamas vienos galutinės koncentracijos (paprastai 4,0 μg/ml) plokštelėje. Siekiant plokštelėje gauti DNCB 4,0 μg/ml koncentraciją, paruošiamas DNCB 2 mg/ml pradinis tirpalas naudojant DMSO ir dar 250 kartų praskiedžiamas auginimo terpe, gaunant 8 μg/ml darbinį tirpalą, arba kaip teigiamo kontrolinio bandinio koncentraciją galima rinktis DNCB CV75 vertę, nustatytą kiekvienoje bandymų laboratorijoje. Galima naudoti ir kitokius tinkamus teigiamus kontrolinius bandinius, jei yra ankstesnių duomenų, iš kurių būtų galima nustatyti panašius bandymo eigos priimtinumo kriterijus. Teigiamų kontrolinių bandinių vienintelė galutinė koncentracija plokštelėje neturėtų viršyti 5 000 μg/ml (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 1 000 μg/ml (jei naudojamas DMSO). Bandymo eigos priimtinumo kriterijai yra tokie patys kaip tie nurodyti kriterijai, kurie skirti bandomajai cheminei medžiagai (žr. 29 punktą), išskyrus paskutinį priimtinumo kriterijų, nes bandymui naudojamas tik vienos koncentracijos teigiamas kontrolinis bandinys.

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų įterpimas

22. Siekiant gauti prognozę dėl kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos, reikia atlikti vieną bandymą. Kiekvieną bandymą sudaro bent du atskiri *CD86/CD54 ekspresijos matavimo* ciklai (žr. 26–28 punktus). Kiekvienas atskiras ciklas atliekamas vis kitą dieną, arba tą pačią dieną su sąlyga, kad kiekvienam ciklui: a) paruošiami atskiri nauji bandomosios cheminės medžiagos pradiniai tirpalai ir darbiniai tirpalai bei antikūnų tirpalai ir b) naudojamos atskirai surinktos ląstelės (t. y. ląstelės surenkamos iš skirtingų auginimo kolbų), tačiau tai gali būti ir to paties sėjimo ląstelės. Paruošti bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų darbiniai tirpalai (500 μl) sumaišomi su 500 μl ląstelių suspensijos (1 x 10^6 ląstelių) santykiu 1:1, tada ląstelės inkubuojamos 24 ± 0,5 val., kaip aprašyta 20 ir 21 punktuose. Kiekvienam ciklui pakanka vieno kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir kontrolinės medžiagos kartotinio bandinio, nes prognozė daroma remiantis bent dviem atskirais bandymo ciklais.

Ląstelių dažymas ir analizė

23. Po 24 ± 0,5 val. veikimo bandomąja chemine medžiaga ląstelės perkeliamos iš 24 duobučių plokštelės į mėgintuvėlius, surenkamos centrifuguojant ir dukart perplaunamos 1 ml dažymo buferinio tirpalo (jei reikia, galima plauti papildomai). Po plovimo ląstelės blokuojamos 600 μl blokuojančiojo tirpalo (dažymo buferinio tirpalo, kuriame yra 0,01 % (m/V) globulino (Cohn'o frakcijos II, III, žmogaus; SIGMA, #G2388-10G ar analogiško)), ir 15 min. inkubuojamos 4°C temperatūroje. Po blokavimo ląstelės išskirstomos į tris alikvotines dalis po 180 μl 96 duobučių gaubtadugnėje mikrotitravimo plokštelėje ar mikromėgintuvėlyje.

24. Po centrifugavimo ląstelės nudažomos naudojant 50 μl FITC ženklintų anti-CD86, anti-CD54 ar pelės IgG1 (izotipo) antikūnų 30 min. 4° C temperatūroje. Turėtų būti naudojami antikūnai, aprašyti h-CLAT DB-ALM protokole Nr. 158 (18), praskiedžiant dažymo buferiniu tirpalu santykiu 3:25 (tūrio) (CD86 („BD-PharMingen", #555657; klonas Fun-1)) arba santykiu 3:50 (tūrio) (CD54 (DAKO, #F7143; klonas 6.5B5) ir IgG1 (DAKO, #X0927)). Šie antikūnų

skiedimo koeficientai šio bandymo kūrėjų nustatyti tokie, kad signalo ir triukšmo santykis būtų geriausias. Iš šio bandymo kūrėjų patirties žinoma, kad įvairių partijų antikūnų fluorescencijos intensyvumas paprastai yra pastovus, tačiau naudotojai gali rinktis titruoti antikūnus savo laboratorijos sąlygomis, kad nustatytų tinkamiausias naudoti koncentracijas. Kitus fluorochromu žymėtus anti-CD86 ir (arba) anti-CD54 antikūnus galima naudoti, jei galima įrodyti, kad gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC konjuguotus antikūnus, pavyzdžiui, atliekant 1.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Įsidėmėtina, kad jei pakeičiamas antikūnų klonas arba tiekėjas, nurodytas h-CLAT DB-ALM protokole Nr. 158 (18), tai gali turėti įtakos rezultatams. Ląstelės, du arba daugiau kartų perplautos 150 µl dažymo buferinio tirpalo, resuspenduojamos dažymo buferiniame tirpale (pvz., 400 µl) ir pridedama PI tirpalo (pvz., 20 µl, gaunant galutinę 0,625 µg/ml koncentraciją) ar kito citotoksiškumo žymens tirpalo (žr. 18 punktą). CD86 ir CD54 ekspresijos lygiai ir ląstelių gyvybingumas analizuojami naudojant tėkmės citometrijos metodą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų vertinimas

25. CD86 ir CD54 ekspresija analizuojama tėkmės citometrijos metodu, naudojant duomenų gavimo kanalą FL-1. Remiantis fluorescencijos intensyvumo geometriniu vidurkiu (vidutinis fluorescencijos intensyvumas, VFI), teigiamo kontrolinio bandinio (kontr.) ląstelių ir bandomosios cheminės medžiagos paveiktų ląstelių CD86 ir CD54 santykinis fluorescencijos intensyvumas (SFI) apskaičiuojamas pagal šią lygtį:

$$RFI = \frac{\textit{Chem. medž. paveiktų ląstelių VFI} - \textit{chem. medž. paveiktų izotipo kontrol. ląstelių VFI}}{\textit{Tirpiklio ar nešiklio kontrol. ląstelių VFI} - \textit{tirpiklio ar nešiklio izotipo kontrol. ląstelių VFI}} \times 100$$

Izotipo kontrolinio bandinio (kontr.) ląstelių (nudažytų pelės IgG1 (izotipo) antikūnais) gyvybingumas taip pat apskaičiuojamas pagal lygtį, pateiktą 19 punkte.

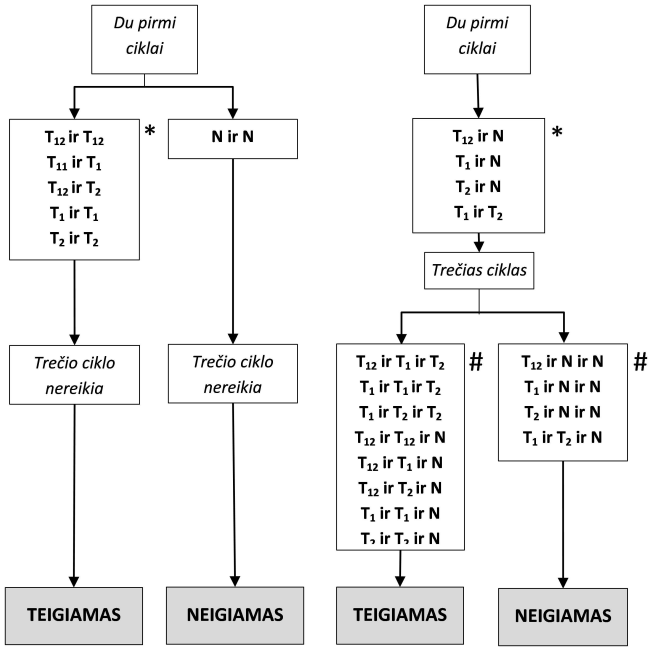
Prognozavimo modelis

26. Atliekant *CD86/CD54* ekspresijos matavimą, kiekviena bandomoji cheminė medžiaga bandoma bent per du atskirus bandymo ciklus, gaunant vieną prognozę (TEIGIAMA arba NEIGIAMA). Pagal h-CLAT metodą prognozė laikoma TEIGIAMA, jei per 2 iš 2 ar bent 2 iš 3 atskirų bandymo ciklų tenkinama bent viena iš toliau nurodytų sąlygų; kitu atveju h-CLAT prognozė laikoma NEIGIAMA (1 diagrama):

— CD86 SFI yra lygus 150 % arba didesnis esant bet kuriai bandomajai koncentracijai (ląstelių gyvybingumas ≥50 %);

— CD54 SFI yra lygus 200 % arba didesnis esant bet kuriai bandomajai koncentracijai (ląstelių gyvybingumas ≥50 %).

27. Remiantis tuo, kas išdėstyta, jei per abu pirmus bandymo ciklus gaunami teigiami rezultatai dėl CD86 ir (arba) per abu ciklus gaunami teigiami rezultatai dėl CD54, h-CLAT prognozė laikoma TEIGIAMA ir trečio ciklo atlikti nereikia. Panašiai ir tada, kai per pirmus du ciklus gaunami neigiami rezultatai dėl abiejų žymenų, h-CLAT prognozė laikoma NEIGIAMA (tinkamai atsižvelgiant į 30 punkto nuostatas) ir trečio ciklo nereikia. Tačiau jei per pirmus du ciklus gauti rezultatai nesutampa dėl bent vieno iš žymenų (CD54 arba CD86), reikia trečio bandymo ciklo, ir galutinė prognozė bus pagrįsta visų trijų atskirų ciklų rezultatų dauguma (t. y. 2 iš 3). Šiuo atžvilgiu reikėtų pažymėti, kad jei atliekami du atskiri bandymo ciklai ir per vieną iš jų gaunamas teigiamas rezultatas tik dėl CD86 (toliau – T_1), o per kitą – teigiamas rezultatas tik dėl CD54 (toliau – T_2), reikia trečio bandymo ciklo. Jei per šį trečią ciklą gaunami neigiami rezultatai dėl abiejų žymenų (toliau – N), h-CLAT prognozė laikoma NEIGIAMA. Kita vertus, jei per trečią ciklą gaunamas teigiamas rezultatas dėl bet kurio žymens (T_1 arba T_2) ar dėl abiejų žymenų (toliau – T_{12}), h-CLAT prognozė laikoma TEIGIAMA.



1 diagrama. Prognozavimo modelis, naudojamas pagal h-CLAT metodą. Gautą h-CLAT prognozę reikėtų vertinti remiantis IATA sistema ir laikantis bendrojo įvado 7 ir 8 punktų nuostatos.

T_1 – bandymo ciklas, kuriame gautas tik CD86 teigiamas rezultatas; T_2 – bandymo ciklas, kuriame gautas tik CD54 teigiamas rezultatas; T_{12} – bandymo ciklas, kuriame gauti ir CD86, ir CD54 teigiami rezultatai; N – bandymo ciklas, kuriame negauta nei CD86, nei CD54 teigiamo rezultato.

Ženklu * pažymėtuose langeliuose parodyti atitinkami abiejų pirmų ciklų rezultatų deriniai, nepriklausomai nuo to, kokia eilės tvarka gali būti gauti tie rezultatai.

Ženklu # pažymėtuose langeliuose parodyti atitinkami visų trijų ciklų rezultatų deriniai, remiantis per pirmus du ciklus gautais rezultatais, parodytais aukščiau esančiame langelyje, nepriklausomai nuo to, kokia eilės tvarka gali būti gauti tie rezultatai.

28. Kai per h-CLAT bandymą prognozės dėl bandomųjų cheminių medžiagų yra TEIGIAMOS, galima (nebūtinai) nustatyti dvi efektyviųjų koncentracijų (EC) vertes – CD86 žymens EC150 vertę ir CD54 žymens EC200 vertę, t. y. koncentraciją, kuriai esant bandomųjų cheminių medžiagų santykinis fluorescencijos intensyvumas (SFI) yra 150 arba 200. Šios EC vertės galėtų padėti įvertinti jautrinimo gebą (9), naudojant jas pagal integruotuosius metodus, tokius kaip IATA (4) (5) (6) (7) (8). Jas galima apskaičiuoti pagal šias lygtis:

$$EC150\ (CD86) = B_{konc.} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

$$>EC200\ (CD86) = B_{konc.} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

kuriose:

$A_{konc.}$ – mažiausia koncentracija µg/ml, kai SFI > 150 (CD86) ar 200 (CD54),

$B_{konc.}$ – didžiausia koncentracija µg/ml, kai SFI < 150 (CD86) ar 200 (CD54),

A_{SFI} – SFI esant mažiausiai koncentracijai, kai SFI > 150 (CD86) ar 200 (CD54),

B_{RFI} – SFI esant didžiausiai koncentracijai, kai SFI < 150 (CD86) ar 200 (CD54).

Siekiant gauti tikslesnes EC150 ir EC200 vertes gali reikėti trijų atskirų *CD86/CD54 ekspresijos matavimo* ciklų. Tada galutinės EC150 ir EC200 vertės nustatomos kaip efektyviųjų koncentracijų (EC), apskaičiuotų per tuos tris atskirus ciklus, medianinė vertė. Kai tik du iš trijų atskirų bandymo ciklų atitinka teigiamo rezultato kriterijus (žr. 26–27 punktus), pasirenkama didesnioji EC150 ar EC200 iš abiejų apskaičiuotų verčių.

Priimtinumo kriterijai

29. Taikant h-CLAT metodą turėtų būti tenkinami šie priimtinumo kriterijai (22) (27):

— terpės ir tirpiklio ar nešiklio kontrolinių bandinių ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis nei 90 %;

— tirpiklio ar nešiklio kontroliniame bandinyje ir CD86, ir CD54 SFI vertės neturėtų viršyti teigiamo rezultato kriterijų (CD86 SFI ≥ 150 % ir CD54 SFI ≥ 200 %). Tirpiklio ar nešiklio kontrolinio bandinio SFI vertės apskaičiuojamos pagal 25 punkte aprašytą formulę („cheminės medžiagos VFI“ reikėtų pakeisti „tirpiklio ar nešiklio VFI“, o „tirpiklio ar nešiklio VFI“ reikėtų pakeisti „(terpės) kontrolinio bandinio VFI“);

— ir terpės, ir tirpiklio ar nešiklio kontrolinių bandinių tiek CD86, tiek CD54 VFI santykis su izotipo kontrolinio bandinio VFI turėtų būti >105 %;

— teigiamame (DNCB) kontroliniame bandinyje ir CD86, ir CD54 SFI vertės turėtų atitikti teigiamo rezultato kriterijus (CD86 SFI ≥ 150 ir CD54 SFI ≥ 200), o ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis nei 50 %;

— bandomosios cheminės medžiagos paveiktų ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis nei 50 % bent keturiose iš bandomosios medžiagos koncentracijų per kiekvieną ciklą.

30. Neigiami rezultatai yra priimtini tik tada, kai bandomųjų cheminių medžiagų paveiktų ląstelių gyvybingumas yra mažesnis nei 90 % esant didžiausiai bandomajai koncentracijai (t. y. 1,2 × CV75 pagal 20 punkte apibūdintą tirpalų serijinio skiedimo schemą). Jei ląstelių gyvybingumas, esant 1,2 × CV75 koncentracijai, yra lygus 90 % ar dar didesnis, gautą neigiamą rezultatą reikėtų atmesti. Tokiu atveju rekomenduojama bandyti tiksliau parinkti dozę, pakartotinai nustatant CV75. Reikėtų pažymėti, kad kai naudojama didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija per bandymą yra 5 000 μg/ml koncentracija fiziologiniame tirpale (ar terpėje, arba kituose naudojamuose tirpikliuose ar nešikliuose), 1 000 μg/ml DMSO arba didžiausia tirpi koncentracija, gautas neigiamas rezultatas yra priimtinas, net jei ląstelių gyvybingumas yra didesnis nei 90 %.

Bandymo ataskaita

31. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė medžiaga:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— fizinė išvaizda, Log K_{ow}, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis apibūdinimas, pvz., cheminė tapatybė (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinė sudėtis ir svarbios fizikinės ir cheminės savybės (žr. pirmiau), būdingos sudedamosioms dalims (tiek, kiek žinoma);

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO ir svarbios papildomos fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

— molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai yra žinomos sudėties mišiniai ar polimerai, arba kita šiam tyrimui svarbi informacija;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Kontroliniai bandiniai

Teigiamas kontrolinis bandinys:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— fizinė išvaizda, Log K_{ow}, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma, ir kai tinka);

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— nuoroda į ankstesnius teigiamus kontrolinių bandinių rezultatus, iš kurių nustatyti tinkami bandymo eigos priimtinumo kriterijai (jei tinka).

Neigiamas ir tirpiklio ar nešiklio kontroliniai bandiniai:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma) tuo atveju, jei naudojamas ne vienas iš nurodytų bandymo gairėse, o kitas kontrolinio bandinio tirpiklis ar nešiklis;

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Bandymo sąlygos

— Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

— naudojamo bandymo aprašymas;

— naudojama ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įstaiga, iš kurios gautos ląstelės);

— naudojama tėkmės citometrijos įranga (pvz., modelis), įskaitant prietaisų nuostačius, globuliną, antikūnus ir naudojamą citotoksiškumo žymenį;

— pagal kokią procedūrą įrodyta laboratorijos kvalifikacija atlikti šį bandymą, atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus, ir pagal kokią procedūrą įrodytas šio bandymo atlikimo atkuriamumas laikui bėgant, pvz., remiantis ankstesniais kontroliniais duomenimis ir (arba) ankstesnių reaktyvumo patikrinimų duomenimis.

Bandymo priimtinumo kriterijai

— Ląstelių gyvybingumo, vidutinio fluorescencijos intensyvumo (VFI) ir santykinio fluorescencijos intensyvumo (SFI) vertės, gautos naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtinumo intervalais;

— ląstelių gyvybingumo ir SFI vertės, gautos naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtinumo intervalais;

— ląstelių gyvybingumas esant visoms cheminės medžiagos bandomosioms koncentracijoms.

Bandymo procedūra

— Bandymo ciklų skaičius;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, jos įterpimas ir pasirinktas veikimo laikas (jei skiriasi nuo rekomenduojamo);

— atliekant vertinimą ir priimant sprendimą taikytų kriterijų aprašymas;

— bet kokių bandymo procedūros keitimų aprašymas.

Rezultatai

— Duomenų lentelė, įskaitant CV75 vertę (jei tinka), atskirą geometrinį VFI, SFI, ląstelių gyvybingumo vertes, EC150/EC200 vertes (jei tinka), gautas iš bandomosios cheminės medžiagos bandinių ir teigiamo kontrolinio bandinio per kiekvieną ciklą, ir nurodytą bandomosios cheminės medžiagos vertinimą pagal prognozavimo modelį;

— bet kokių kitų svarbių stebėjimų aprašymas (jei tinka).

Rezultatų aptarimas

— Taikant h-CLAT metodą gautų rezultatų aptarimas;

— bandymo rezultatų apsvarstymas atsižvelgiant į IATA sistemą, jei turima ir kitos svarbios informacijos.

Išvados

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. Pateikta 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 S. N., 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 J. W., 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 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 Parmacol.* 71, 337-351.

(9) Jaworska J. S., 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 D. M., 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). Pateikta 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. Pateikta 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., Nishiyama N., 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 metabolizing 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. Pateikta 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. Paskelbta 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. Paskelbta 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. priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Tikslumas: bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tai yra bandymo atlikimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Šis terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (21).

Nepalankios baigties kelias: (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) – įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupės cheminės struktūros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (22).

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

CV75: nustatyta koncentracijos vertė, kuriai esant ląstelių gyvybingumas yra 75 %.

EC150: bandomosios medžiagos koncentracijos, kurioms esant CD86 ekspresijos santykinio fluorescencijos intensyvumo (SFI) vertės yra 150.

EC200: bandomosios medžiagos koncentracijos, kurioms esant CD54 ekspresijos SFI vertės yra 200.

Tėkmės citometrija: citometrinis metodas, pagal kurį ląstelės viena po kitos suspenduojamos skysčio tėkmėje ir leidžiamos per jaudrinančios šviesos židinį, kuriame šviesa išskaidoma toms ląstelėms ir jų sudedamosioms dalims būdingais raštais; ląstelės dažnai pažymimos fluorescenciniais žymenimis, todėl šviesa pirmiausia sugeriama, o tada išspinduliuojama pakitusiais dažniais.

Pavojus: būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

IATA: (**integruotasis bandymo ir vertinimo metodas**, angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*) – struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui nustatyti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (dėl galimo pavojaus ar veikimo gebos ir paveikimo ta medžiaga). Jį taikant strategiškai apibendrinami ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima ta informacija pagrįsti reglamentavimo sprendimą dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomus tikslinius, taigi minimalius bandymus.

Terpės kontrolinis bandinys: neapdorotas kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai. Šis bandinys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais bandiniais ir kitais kontroliniais bandiniais siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Mišinys: iš dviejų ar daugiau medžiagų sudarytas mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga: medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga: medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija yra ≥10 % (masės) ir <80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Daugiakomponentė medžiaga nuo mišinio skiriasi tuo, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi arba daugiau medžiagų, tarp kurių cheminė reakcija nevyksta. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

Teigiamas kontrolinis bandinys: kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, apdorotas tam tikra medžiaga, kuri, kaip žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti, kad būtų galima vertinti teigiamo kontrolinio bandinio atsako kintamumą laikui bėgant, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Prehaptenai: cheminės medžiagos, kurios tampa jautrinančios po abiotinio virsmo.

Prohaptenai: cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, kad pasireikštų jų odos jautrinimo geba.

Santykinis fluorescencijos intensyvumas (SFI): cheminės medžiagos paveiktų ląstelių fluorescencijos intensyvumo geometrinio vidurkio (VFI) santykinės vertės, palyginti su tirpikliu ar nešikliu apdorotų ląstelių VFI.

Tinkamumas: ryšio tarp bandymo ir tiriamo poveikio, taip pat bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas apima bandymo tikslumo (atitikties) aspektą (21).

Patikimumas: pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo atkuriamumo laboratorijose ir tarp laboratorijų, laikui bėgant, matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (21).

Bandymo ciklas: vienos ar daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas kartu naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį ir teigiamą kontrolinį bandinį.

Jautris: visų teigiamų (veikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (21).

Dažymo buferinis tirpalas: fosfatinis buferinis druskų tirpalas, kuriame yra 0,1 % galvijų serumo albumino.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys: neapdorotas bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, išskyrus bandomąją cheminę medžiagą, tačiau įskaitant naudojamą tirpiklį ar nešiklį. Jis naudojamas nustatant bazinį atsaką bandiniuose, apdorotuose bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta ar stabiliai disperguota tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai šis bandinys naudojamas bandymui kartu su terpės kontroliniu bandiniu, jis taip pat parodo, ar tirpiklis arba nešiklis veikia bandymo sistemą.

Specifiškumas: visų neigiamų (neveikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (21).

Medžiaga: gamtoje randamas ar bet kokio gamybos proceso metu gaunamas cheminis elementas ir jo junginiai, įskaitant bet kokius priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias dėl gamybos proceso, tačiau išskyrus tirpiklius, kuriuos galima atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ir nekeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga: taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS): sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir lygius, ir naudojami atitinkami informaciniai elementai, tokie kaip piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų perduota informacija apie jų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbdavius, darbuotojus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likviduotojus) ir aplinką (23).

UVCB: nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymas: bandymas, laikomas pakankamai tinkamu ir patikimu konkrečiam tikslui pasiekti ir pagrįstas moksliškai patikimais principais. Bandymas niekada nėra absoliučiai tinkamas – jis yra tinkamas tik tam tikram tikslui pasiekti (21).

1.2. priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Prieš pradėdamos įprastu būdu atlikti bandymą, aprašytą šiame priedėlyje, pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos teisingą numatytą h-CLAT prognozę dėl 10 medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje, ir gaudamos CV75, EC150 bei EC200 vertes, kurios patenka į atitinkamus etaloninius intervalus, dėl ne mažiau kaip 8 iš 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų. Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos buvo pasirinktos siekiant aprėpti odos jautrinimo pavojams būdingų atsakų spektrą. Kiti jų atrankos kriterijai buvo tokie, kad tų medžiagų būtų galima įsigyti iš komercinių tiekėjų ir kad būtų galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* duomenų, nustatytų taikant h-CLAT metodą. Taip pat yra paskelbti h-CLAT metodo taikymo etaloniniai duomenys (3) (14).

1 lentelė.

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti pagal h-CLAT metodą

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Fizinė būsena	Prognozė *in vivo* (1)	CV75 etaloninis intervalas µg/ml (2)	h-CLAT rezultatai dėl CD86 (EC150 etaloninis intervalas µg/ml) (2)	h-CLAT rezultatai dėl CD54 (EC200 etaloninis intervalas µg/ml) (2)
2,4-dinitrochlorbenzenas	97-00-7	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	2–12	Teigiama (0,5–10)	Teigiama (0,5–15)
4-fenilendiaminas	106-50-3	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	5–95	Teigiama (<40)	Neigiama (>1,5) (3)
Nikelio sulfatas	10101-97-0	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	30–500	Teigiama (<100)	Teigiama (10–100)
2-merkaptbenzotiazolas	149-30-4	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	30–400	Neigiama (>10) (3)	Teigiama (10–140)
R(+)-limonenas	5989-27-5	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	>20	Neigiama (>5) (3)	Teigiama (<250)
Imidazolidinilo šlapalas	39236-46-9	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	25–100	Teigiama (20–90)	Teigiama (20–75)
Izopropilo alkoholis	67-63-0	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	>5 000	Neigiama (>5 000)	Neigiama (>5 000)
Glicerolis	56-81-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	>5 000	Neigiama (>5 000)	Neigiama (>5 000)
Pieno rūgštis	50-21-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	1 500–5 000	Neigiama (>5 000)	Neigiama (>5 000)
4-aminobenzenkarboksirūgštis	150-13-0	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	>1 000	Neigiama (>1 000)	Neigiama (>1 000)

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

(1) Pavojaus (ir veikimo gebos) *in vivo* prognozė pagrįsta LLNA duomenimis (3) (14). Veikimo *in vivo* geba gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (24).

(2) Pagrįsta anksčiau nustatytomis vertėmis (13) (25).

(3) Praeityje dėl šio žymens buvo gauti daugiausia neigiami rezultatai, todėl labiausiai tikėtina, kad rezultatas bus neigiamas. Pateiktas intervalas buvo nustatytas remiantis keliais anksčiau gautais teigiamais rezultatais. Tuo atveju, jei būtų gautas teigiamas rezultatas, efektyviosios koncentracijos (EC) vertė turėtų būti pateiktame etaloniniame intervale.

2 priedėlis

ODOS JAUTRINIMAS *IN VITRO*. U937 LĄSTELIŲ LINIJOS AKTYVINIMO BANDYMAS (U-SENS™)

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

1. Atliekant U-SENS™ bandymą kiekybiškai nustatomas ląstelių paviršinio žymens, siejamo su monocitų ir dendritinių ląstelių aktyvinimo procesu (t. y. CD86), ekspresijos pokytis žmogaus histiocitinės limfomos ląstelių linijos U937 ląstelėse, jas paveikus jautrinančiomis medžiagomis (1). Išmatuoti ląstelių linijos U937 ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos lygiai naudojami padedant skirti odą jautrinančias ir jos nejautrinančias medžiagas.

2. Bandymas U-SENS™ buvo įvertintas atlikus „L'Oreal" koordinuojamą jo tinkamumo patvirtinimo tyrimą (2) ir paskesnę nepriklausomą ekspertizę, kurią atliko Europos Sąjungos bandymų su gyvūnais alternatyvų etaloninės laboratorijos (EURL ECVAM) mokslinis patariamasis komitetas (ESAC) (3). Atsižvelgus į visus turimus įrodymus ir į reguliavimo institucijų bei suinteresuotųjų subjektų įnašus, bandymas U-SENS™ buvo EURL ECVAM rekomenduotas (4) naudoti kaip IATA dalis, padedant skirti odą jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas, kad būtų galima jas klasifikuoti pagal pavojingumą ir atitinkamai ženklinti. EBPO rekomendaciniame dokumente dėl pranešimo apie struktūrinius metodus, pagal kuriuos susiejami duomenys ir atskiri informacijos šaltiniai, naudojami IATA sistemoje dėl odos jautrinimo, šiuo metu aptariami kelių atvejų tyrimai, apibūdinant įvairias bandymų strategijas ir prognozavimo modelius. Vienas iš šių įvairių nustatytų metodų yra pagrįstas U-SENS tyrimu (5). U-SENS™ duomenų naudojimo kartu su kita informacija, įskaitant ankstesnius duomenis ir esamus patvirtintus duomenis apie žmones (6), pavydžių pateikta ir kitoje literatūroje (4) (5) (7).

3. Įrodyta, kad U-SENS™ bandymą galima pritaikyti laboratorijose, turinčiose ląstelių kultūrų auginimo metodų naudojimo ir tėkmės citometrinės analizės atlikimo patirties. Tikėtinas prognozių laboratorinio ir tarplaboratorinio atkuriamumo lygis atliekant šį bandymą atitinkamai yra apie 90 % ir 84 % (8). Iš rezultatų, gautų atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (8) ir kitus paskelbtus tyrimus (1), apskritai matyti, kad, palyginti su LLNA rezultatais, odą jautrinančių (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančių medžiagų skyrimo tikslumas yra 86 % (N = 166), esant 91 % (118/129) jautriui ir 65 % (24/37) specifiškumui. Palyginti su žmonių tyrimų rezultatais, odą jautrinančių (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančių medžiagų skyrimo tikslumas yra 77 % (N = 101), esant 100 % (58/58) jautriui ir 47 % (20/43) specifiškumui. Klaidingai neigiamos prognozės atliekant bandymą U-SENS™, palyginti su LLNA, yra labiau tikėtinos dėl tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra maža arba vidutinė (t. y. JT GHS ar CLP 1B subkategorijos medžiagų), negu tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra didelė (t. y. JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (1) (8) (9). Iš visos šios informacijos yra aiškus U-SENS™ bandymo naudingumas padedant nustatyti odos jautrinimo pavojus. Vis dėlto čia pateiktos tikslumo vertės, kai U-SENS™ atliekamas kaip atskiras bandymas, yra tik orientacinės, nes šio bandymo duomenis reikėtų vertinti kartu su informacija iš kitų šaltinių, kaip IATA dalį, ir pagal bendrojo įvado 7 ir 8 punktuose pateiktas nuostatas. Be to, vertinant odos jautrinimo bandymų ne su gyvūnais metodus, reikėtų turėti omenyje, kad LLNA bandymas ir kiti bandymai su gyvūnais gali nevisiškai tiksliai parodyti su žmonėmis susijusią padėtį.

4. Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, įsitikinta, kad U-SENS™ bandymas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms (įskaitant kosmetikos ingredientus, pvz., konservantus, paviršinio aktyvumo medžiagas, veikliąsias medžiagas, dažiklius), apimančioms įvairias organines funkcines grupes, fizikines ir chemines savybes, odos jautrinimo gebą (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus) ir su odos jautrinimu siejamų reakcijos mechanizmų spektrą (t. y. Michael'o akceptorius, Schiff'o bazės susidarymas, acilo perdavimo agentas, nukleofilinis bimolekulinis pakeitimas (SN2) arba nukleofilinis aromatinis pakeitimas (SNAr)) (1) (8) (9) (10). U-SENS™ bandymas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra tirpios arba sudaro stabilią dispersiją (t. y. koloidus ar suspensijas, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga neiškrenta į nuosėdas ir nesudaro su tirpikliu ar nešikliu skirtingų fazių) tinkamame tirpiklyje ar nešiklyje (žr. 13 punktą). Pagal U-SENS™ metodą buvo gautos teisingos prognozės dėl cheminių medžiagų, įtrauktų į duomenų rinkinį, apie kurias pranešta kaip apie prehaptenus (t. y. medžiagas, kurios aktyvinamos oksidacija) arba prohaptenus (t. y. medžiagas, kurias būtina aktyvinti fermentais, pvz., P450 fermentais) (1) (10). Tiriant ląstelių membraną ardančias medžiagas, gali būti gauta klaidingai teigiamų rezultatų dėl nespecifinio

CD86 ekspresijos padidėjimo, nes 3 iš 7 atvejų gauti klaidingai teigiami rezultatai, palyginti su *in vivo* etalonine klasifikacija, buvo dėl paviršinio aktyvumo medžiagų (1). Taigi, paviršinio aktyvumo medžiagų bandymų teigiamus rezultatus reikėtų vertinti atsargiai, tačiau neigiamais rezultatais dėl šių medžiagų gali būti tinkama remtis nustatant, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra jautrinanti. Fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos gali būti vertinamos pagal U-SENS™ (1), tačiau stipriai fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos, kurių skleidžiamų bangų ilgis toks pat kaip fluoresceino izotiocianato (FITC) ar propidiumo jodido (PI), kliudo tėkmės citometriniam nustatymui, todėl neįmanoma jų tiksliai įvertinti naudojant FITC konjuguotus antikūnus (galimas klaidingai neigiamas rezultatas) ar PI (neįmanoma išmatuoti gyvybingumo). Tokiu atveju gali būti atitinkamai naudojami kiti fluorochromu žymėti antikūnai arba kiti citotoksiškumo žymenys, jei galima įrodyti, kad juos naudojant gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC žymėtus antikūnus arba PI (žr. 18 punktą), pvz., atliekant 2.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Atsižvelgiant į tai, kas išdėstyta, paviršinio aktyvumo medžiagų teigiami rezultatai ir stipriai fluorescuojančių bandomųjų cheminių medžiagų neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į nustatytus apribojimus ir kartu remiantis kitais informacijos šaltiniais IATA sistemoje. Tais atvejais, kai yra įrodymų, kad U-SENS™ bandymas netinka kitų konkrečių kategorijų bandomosioms cheminėms medžiagoms, jo nereikėtų atlikti dėl tų konkrečių kategorijų medžiagų.

5. Kaip aprašyta pirmiau, U-SENS™ bandymu padedama skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų; tačiau jis taip pat gali padėti vertinti jautrinimo gebą, kai taikomas pagal integruotuosius metodus, tokius kaip IATA. Vis dėlto būtina toliau dirbti (geriausia remiantis duomenimis apie žmones) siekiant nustatyti, kaip U-SENS™ rezultatais būtų galima pagrįsti jautrinimo gebos vertinimą.

6. Terminų apibrėžtys pateiktos 2.1. priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Bandymas U-SENS™ – tai tyrimas *in vitro*, kurį atliekant kiekybiškai nustatomi ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos pokyčiai žmogaus histiocitinės limfomos ląstelių linijos U937 ląstelėse po 45 ± 3 valandų veikimo bandomąja chemine medžiaga. CD86 paviršinis žymuo yra tipinis U937 ląstelių aktyvinimo žymuo. Yra žinoma, kad CD86 yra kostimuliacinė molekulė, galinti atkartoti monocitinį aktyvinimą, kuris yra ypač svarbus T ląstelių aktyvinimui. Ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos pokyčiai matuojami tėkmės citometrijos būdu, prieš tai nudažius ląsteles, paprastai fluoresceino izotiocianatu (FITC) žymėtais antikūnais. Kartu atliekamas ir citotoksiškumo matavimas (pvz., naudojant PI), vertinant, ar ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos didinimas vyksta esant mažesnėms nei citotoksiškos koncentracijoms. Ląstelių paviršinio žymens CD86 stimuliavimo indeksas (SI), palyginti su tirpiklio ar nešiklio kontroliniu bandiniu, apskaičiuojamas ir naudojamas pagal prognozavimo modelį (žr. 19 punktą), taip padedant skirti jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

8. Prieš pradėdamos įprastai atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją naudodamos 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, kurių sąrašas pateiktas 2.2. priedėlyje, pagal gerąją *in vitro* metodų taikymo praktiką (11). Be to, šio bandymo naudotojai turėtų turėti ankstesnių duomenų bazę, kurioje būtų kaupiami duomenys, gauti atliekant reaktyvumo patikrinimus (žr. 11 punktą) ir naudojant teigiamus bei tirpiklio ar nešiklio kontrolinius bandinius (žr. 15–16 punktus), ir šiais duomenimis reikėtų naudotis patvirtinant tolesnį šio bandymo atkuriamumą savo laboratorijoje laikui bėgant.

PROCEDŪRA

9. Šis bandymas pagrįstas U-SENS™ DB-ALM (angl. *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation* – bandymams su gyvūnais alternatyvių metodų duomenų bazės paslauga) protokolu Nr. 183 (12). Įdiegiant ir atliekant U-SENS™ bandymą laboratorijoje turėtų būti taikomos standartinės veiklos procedūros (SVP). U-SENS™ bandymą galima atlikti naudojant automatizuotą sistemą, jei galima įrodyti, kad taip gaunami panašūs rezultatai, pavyzdžiui, atliekant 2.2. priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Toliau aprašyti pagrindiniai U-SENS™ bandymo komponentai ir procedūros.

Ląstelių paruošimas

10. Atliekant U-SENS™ bandymą turėtų būti naudojama žmogaus histiocitinės limfomos ląstelių linija U937 (13). Ląsteles (klonas CRL1593.2) reikėtų gauti iš kvalifikuoto ląstelių banko, tokio kaip „American Type Culture Collection“.

11. U937 ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2 ir drėgnai atmosferai, terpėje RPMI-1 640, papildytoje 10 % veršelio embriono serumo (FCS), 2 mM L-glutamino, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino (visos sudėties terpė). U937 ląstelės reguliariai sėjamos kas 2–3 dienas atitinkamai 1,5 ar 3×10^5 ląstelių/ml tankiu. Ląstelių tankis turėtų būti ne didesnis kaip 2×10^6 ląstelių/ml, o ląstelių gyvybingumas, matuojamas atmetimo principu, naudojant tripano mėlį, turėtų būti ≥ 90 % (tai netaikoma per pirmąjį sėjimą po atitirpinimo). Reikėtų patikrinti kiekvienos ląstelių, FCS ar antikūnų partijos tinkamumą, atliekant reaktyvumo patikrinimą, prieš naudojant jas bandymui. Ląstelių reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas praėjus bent vienai savaitei po atitirpinimo, naudojant teigiamą kontrolinį bandinį su pikrilsulfonrūgštimi (2,4,6-trinitrobenzensulfoninė rūgštis, TNBS) (CAS Nr. 2 508-19-2, ≥99 % grynumo) ir neigiamą kontrolinį bandinį su pieno rūgštimi (CAS Nr. 50-21-5, ≥85 % grynumo). Atliekant reaktyvumo patikrinimą, turėtų būti bandomos kiekvieno iš dviejų kontrolinių bandinių šešios galutinės koncentracijos (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml, pieno rūgšties: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS, soliubilizuota visos sudėties terpėje, turėtų sukelti teigiamą ir su koncentracija susijusį CD86 atsaką (pvz., kai po teigiamo atsako koncentracijos, kuriai esant CD86 stimuliavimo indeksas (SI) ≥ 150, tolesnės koncentracijos CD86 SI yra didesnis), o naudojant pieno rūgštį, soliubilizuotą visos sudėties terpėje, CD86 atsakas turėtų būti neigiamas (žr. 21 punktą). Tyrimui turėtų būti naudojama tik tokia ląstelių partija, kurios reaktyvumo patikrinimas atliktas 2 kartus. Ląsteles galima dauginti ne ilgiau kaip septynias savaites po atitirpinimo. Sėjimų skaičius neturėtų viršyti 21. Reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas pagal 18–22 punktuose aprašytas procedūras.

12. Bandymui U937 ląstelės sėjamos 3×10^5 ląstelių/ml arba 6×10^5 ląstelių/ml tankiu ir jų kultūra iš anksto ruošiama auginimo kolbose atitinkamai 2 dienas arba 1 dieną. Kultūros paruošimo sąlygos gali būti ir kitokios, negu aprašyta pirmiau, jei pateikiamas pakankamas mokslinis to pagrindimas ir galima įrodyti, kad taip gaunami panašūs rezultatai, pavyzdžiui, atliekant 2.2. priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Bandymo dieną iš auginimo kolbos surinktos ląstelės resuspenduojamos naujoje auginimo terpėje 5×10^5 ląstelių/ml tankiu. Tada ląstelės paskirstomos 96 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje, kurios duobučių tūris 100 µl (galutinis ląstelių tankis $0,5 \times 10^5$ ląstelių kiekvienoje duobutėje).

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų paruošimas

13. Prieš bandymą atliekamas tirpumo vertinimas. Šiuo tikslu bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba stabiliai disperguojamos visos sudėties terpėje, gaunant 50 mg/ml koncentraciją (šiam tirpikliui teikiama pirmenybė), arba dimetilsulfokside (DMSO, ≥99 % grynumo), kuris yra antras galimas tirpiklis arba nešiklis, jei bandomoji cheminė medžiaga nėra tirpi naudojant visos sudėties terpę kaip tirpiklį ar nešiklį. Bandymui skirta bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama visos sudėties terpėje, kurioje jos galutinė koncentracija 0,4 mg/ml, jei ta cheminė medžiaga yra tirpi šiame tirpiklyje ar nešiklyje. Jei cheminė medžiaga yra tirpi tik DMSO, cheminė medžiaga jame ištirpinama iki 50 mg/ml koncentracijos. Kiti čia neminėti tirpikliai ar nešikliai gali būti naudojami, jei pateikiamas pakankamas mokslinis to pagrindimas. Reikėtų atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos stabilumą galutiniame tirpiklyje ar nešiklyje.

14. Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Kadangi neatliekama dozės nustatymo tyrimo, per pirmą bandymo ciklą turėtų būti bandomos 6 galutinės koncentracijos (1, 10, 20, 50, 100 ir 200 µg/ml) atitinkamame tirpiklyje ar nešiklyje – visos sudėties terpėje arba terpėje su 0,4 % DMSO. Per paskesnius bandymo ciklus, pradedant nuo 0,4 mg/ml koncentracijos visos sudėties terpėje ar 50 mg/ml DMSO, bandomųjų cheminių medžiagų tirpalai – bent 4 darbiniai (t. y. bent 4 koncentracijų) tirpalai – ruošiami naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Šie darbiniai tirpalai galiausiai naudojami bandymui, į mikrotitravimo plokštelės duobutes įpilant po vienodą tūrį U937 ląstelių suspensijos (žr. pirmiau, 11 punktą) ir darbinio tirpalo, taip dar du kartus jį praskiedžiant (12). Atitinkamos koncentracijos (bent 4 koncentracijos) per bet kokį paskesnį bandymo ciklą parenkamos remiantis atskirais visų ankstesnių ciklų rezultatais (8). Tinkamos naudoti galutinės koncentracijos yra 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 ir 200 µg/ml. Didžiausia galutinė koncentracija yra 200 µg/ml. Tuo atveju, jei nustatoma CD86 teigiama vertė esant 1 µg/ml, vertinama 0,1 µg/ml koncentracija, siekiant nustatyti tokią bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuri nesukelia CD86 atsako, viršijančio teigiamo rezultato ribą. Per kiekvieną bandymo ciklą, jei nustatomas CD86 teigiamas atsakas į

koncentraciją, apskaičiuojama EC150 (cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pasiekiama CD86 teigiamo atsako 150 % riba; žr. 19 punktą). Kai bandomoji cheminė medžiaga sukelia teigiamą CD86 atsaką, nesusijusį su koncentracija, gali nereikėti apskaičiuoti EC150, kaip aprašyta U-SENS™ DB-ALM protokole Nr. 183 (12). Per kiekvieną bandymo ciklą, kai tik įmanoma, apskaičiuojama CV70 (cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pasiekiama 70 % citotoksiškumo riba; žr. 19 punktą) (12). Siekiant tirti CD86 atsako didėjimo su koncentracija susijusį poveikį, bet kokios koncentracijos iš tinkamų naudoti koncentracijos verčių turėtų būti pasirinktos tolygiais intervalais tarp EC150 (arba didžiausios CD86 neigiamos necitotoksiškos koncentracijos) ir CV70 (arba didžiausios leidžiamos koncentracijos, t. y. 200 μg/ml). Palyginimo tikslais per kiekvieną bandymo ciklą turėtų būti bandomos mažiausiai 4 koncentracijos, iš kurių bent 2 turėtų būti tokios pačios kaip per pirmesnį ciklą arba ciklus.

15. Per U-SENS™ bandymą tirpiklio ar nešiklio kontroliniam bandiniui naudojama visos sudėties terpė (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra soliubilizuojamos ar stabiliai disperguojamos visos sudėties terpėje) (žr. 4 punktą), arba 0,4 % DMSO visos sudėties terpėje (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios soliubilizuojamos arba stabiliai disperguojamos DMSO).

16. Atliekant U-SENS™ bandymą naudojamas teigiamas kontrolinis bandinys su TNBS (žr. 11 punktą), paruoštas visos sudėties terpėje. TNBS, kaip teigiamas kontrolinis bandinys atliekant CD86 ekspresijos matavimą, turėtų būti naudojama vienos galutinės koncentracijos plokštelėje (50 μg/ml), ląstelių gyvybingumui esant >70 %. Siekiant plokštelėje gauti 50 μg/ml TNBS koncentraciją, paruošiamas TNBS 1 M (t. y. 293 mg/ml) pradinis tirpalas visos sudėties terpėje ir dar 2 930 kartų praskiedžiamas visos sudėties terpe, gaunant 100 μg/ml darbinį tirpalą. Kaip neigiamas kontrolinis bandinys turėtų būti naudojama pieno rūgštis (CAS 50-21-5), 200 μg/ml koncentracijos, soliubilizuota visos sudėties terpėje (iš 0,4 mg/ml pradinio tirpalo). Kiekvienoje mikrotitravimo plokštelėje per kiekvieną bandymo ciklą paruošiami trys visos sudėties terpės neapdoroto kontrolinio bandinio, tirpiklio ar nešiklio kontrolinio bandinio, neigiamo ir teigiamo kontrolinių bandinių kartotiniai bandiniai (12). Galima naudoti ir kitokius tinkamus teigiamus kontrolinius bandinius, jei yra ankstesnių duomenų, iš kurių būtų galima nustatyti panašius bandymo eigos priimtinumo kriterijus. Bandymo eigos priimtinumo kriterijai yra tie patys, kurie apibūdinti dėl bandomosios cheminės medžiagos (žr. 12 punktą).

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų įterpimas

17. Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys arba darbiniai tirpalai, aprašyti 14–16 punktuose, sumaišomi santykiu 1:1 (tūrio) su ląstelių suspensijomis, paruoštomis 96 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (žr. 12 punktą). Paruoštos plokštelės 45 ± 3 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2. Prieš inkubavimą plokštelės sandariai uždengiamos pusiau pralaidžia plėvele, kad būtų išvengta lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų garavimo ir kryžminio užteršimo tarp bandomosiomis cheminėmis medžiagomis veikiamų ląstelių (12).

Ląstelių dažymas

18. Po 45 ± 3 val. veikimo bandomąja chemine medžiaga ląstelės perkeliamos į V formos duobučių mikrotitravimo plokštelę ir surenkamos centrifuguojant. Tirpumo trukdis apibrėžiamas kaip kristalų arba lašelių susidarymas, matomas per mikroskopą praėjus 45 ± 3 val. po apdorojimo (prieš ląstelių dažymą). Supernatantas pašalinamas, o likusios ląstelės vieną kartą perplaunamos 100 μl ledo temperatūros fosfatinio buferinio druskų tirpalo (PBS), kuriame yra 5 % veršelio embriono serumo (dažymo buferinis tirpalas). Po centrifugavimo ląstelės resuspenduojamos 100 μl dažymo buferinio tirpalo ir nudažomos naudojant 5 μl (pvz., 0,25 μg) FITC ženklintų anti-CD86 ar pelės IgG1 (izotipo) antikūnų 30 min. 4° C temperatūroje, saugant nuo šviesos. Turėtų būti naudojami antikūnai, aprašyti U-SENS™ DB-ALM protokole Nr. 183 (12) (CD86: BD-PharMingen #5556 57 klonas Fun-1 arba Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klonas BU63; IgG1: BD-PharMingen #5557 48 arba Caltag/Invitrogen # GM4992). Iš šio bandymo kūrėjų patirties žinoma, kad įvairių partijų antikūnų fluorescencijos intensyvumas paprastai yra pastovus. Tyrimui gali būti naudojami ir kiti antikūnų klonai arba kito tiekėjo antikūnai, kurių reaktyvumas patikrintas (žr. 11 punktą). Tačiau naudotojai gali apsvarstyti poreikį titruoti antikūnus savo laboratorijos sąlygomis, kad nustatytų tinkamiausią naudoti koncentraciją. Kitokią aptikimo sistemą, pvz., fluorochromu žymėtus anti-CD86 antikūnus galima naudoti,

jei galima įrodyti, kad gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC konjuguotus antikūnus, pavyzdžiui, atliekant 2.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Du kartus perplautos 100 µl dažymo buferinio tirpalo ir vieną kartą – 100 µ ledo temperatūros fosfatinio buferinio druskų tirpalo (PBS), ląstelės resuspenduojamos ledo temperatūros PBS (pvz., 125 µl, kai bandiniai analizuojami rankiniu būdu imant mėgintuvėlius vieną po kito, arba 50 µl, kai naudojama automatinio ėminių ėmiklio plokštelė), ir įpilama PI tirpalo (galutinė koncentracija 3 µg/ml). Kiti citotoksiškumo žymenys, tokie kaip 7-aminoaktinomicinas D (7-AAD) arba tripano mėlis, gali būti naudojami, jei galima įrodyti, kad alternatyviais dažais gaunami panašūs rezultatai kaip ir PI, pavyzdžiui, atliekant 2.2 priedėlyje nurodytų kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus.

Tėkmės citometrinė analizė

19. CD86 ekspresijos lygis ir ląstelių gyvybingumas analizuojami naudojant tėkmės citometrijos metodą. Ląstelės parodomos tam tikro dydžio (FSC) ir grūdėtumo (SSC) taškinėje diagramoje, perkeltoje į logaritminę skalę, kad būtų galima aiškiai nustatyti populiaciją pirmajame regione R1 ir pašalinti liekanas. Iš kiekvienos duobutės gaunamas tikslinis bendras 10 000 ląstelių skaičius R1 regione. To paties R1 regiono ląstelės pavaizduojamos FL3 ar FL4 / SSC taškinėje diagramoje. Gyvybingos ląstelės išskiriamos nustatant antrą R2 regioną, kuriam pasirenkama propidiumo jodidu žymėtų neigiamų ląstelių populiacija (FL3 ar FL4 kanalas). Ląstelių gyvybingumą galima apskaičiuoti naudojant toliau pateiktą lygtį pagal citometrinės analizės programą. Kai ląstelių gyvybingumas yra mažas, galima gauti iki 20 000 ląstelių, įskaitant negyvas ląsteles. Kitu būdu duomenis galima gauti per vieną minutę po analizės pradžios.

$$Ląstelių\ gyvybingumas = \frac{gyvų\ ląstelių\ skaičius}{bendras\ gautų\ ląstelių\ skaičius} \times 100$$

Tada nustatoma FL1 teigiamų ląstelių procentinė dalis iš tų gyvybingų ląstelių, kurios surinktos pasirinkus R2 regioną (R1 regione). Ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresija analizuojama FL1 / SSC taškinėje diagramoje, sudarytoje parinkus gyvybingų ląstelių regioną (R2).

Visos sudėties terpės / IgG1 bandinių duobutėms analizės žymuo nustatomas artimas pagrindinei populiacijai, kad visos sudėties terpės kontrolinių bandinių IgG1 būtų tiksliniame 0,6–0,9 % intervale.

Spalvinis trukdis apibrėžiamas kaip poslinkis FITC ženklintų IgG1 antikūnų taškinėje diagramoje (IgG1 FL1 SI geometrinis vidurkis ≥150 %).

Kontrolinių bandinių ląstelių (neapdorotų arba 0,4 % DMSO tirpale) ir bandomosios cheminės medžiagos paveiktų ląstelių CD86 stimuliavimo indeksas (SI) apskaičiuojamas pagal šią lygtį:.

$$SI = \frac{CD86^{+}paveiktų\ ląstelių\ proc. - IgG1^{+}paveiktų\ ląstelių\ proc.}{CD86^{+}kontrolinių\ ląstelių\ proc. - IgG1^{+}kontrolinių\ ląstelių\ proc.} \times 100$$

„$IgG1^{+}$ neapdorotų kontrolinių ląstelių proc.“ – FL1 teigiamų IgG1 ląstelių procentinė dalis, nustatyta analizės žymeniu (priimtinas intervalas yra ≥0,6 % ir <1,5 %, žr. 22 punktą), iš visų gyvybingų neapdorotų ląstelių.

„$IgG1^{+}$/$CD86^{+}$ kontrolinių / apdorotų ląstelių proc.“ – FL1 teigiamų IgG1/CD86 ląstelių procentinė dalis, nustatyta nekeičiant analizės žymens pozicijos, iš visų gyvybingų kontrolinių ar apdorotų ląstelių.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų vertinimas

20. Atliekant U-SENS™ bandymą apskaičiuojami šie parametrai: CV70 vertė, t. y. koncentracija, kuriai esant U937 ląstelių išgyvenimas 70 % (30 % citotoksiškumas), ir EC150 vertė, t. y. koncentracija, kuriai esant bandomųjų cheminių medžiagų sukelto CD86 stimuliavimo indeksas (SI) yra 150 %.

CV70 apskaičiuojama logaritminiu tiesiniu interpoliavimu pagal šią lygtį:

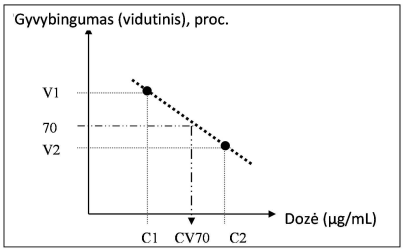
CV70 = C1 + [(V1 – 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

kurioje:

V1 – mažiausia ląstelių gyvybingumo vertė virš 70 %,

V2 – didžiausia ląstelių gyvybingumo vertė žemiau 70 %.

C1 ir C2 – atitinkamos koncentracijos, kurioms esant gautos ląstelių gyvybingumo vertės V1 ir V2.



CV70 vertė gali būti gaunama ir kitais metodais, jei įrodoma, kad tai neturi poveikio rezultatams (pvz., atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus).

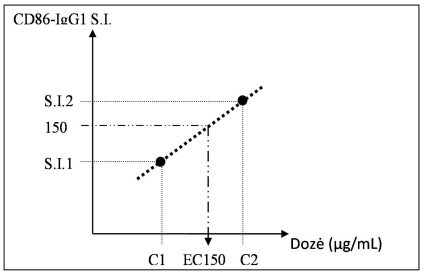
EC150 apskaičiuojama logaritminiu tiesiniu interpoliavimu pagal šią lygtį:

EC150 = C1 + [(150 – SI 1) / (SI 2 – SI 1) * (C2 – C1)]

kurioje:

C1 – didžiausia koncentracija µg/ml, kai CD86 SI < 150 % (SI 1),

C2 – mažiausia koncentracija µg/ml, kai CD86 SI ≥ 150 % (SI 2).



EC150 ir CV70 vertės apskaičiuojamos:

— per kiekvieną bandymo ciklą: atskiros EC150 ir CV70 vertės naudojamos kaip priemonės tiriant CD86 atsako didėjimo su koncentracija susijusį poveikį (žr. 14 punktą),

— remiantis vidutinėmis gyvybingumo vertėmis, nustatoma bendra CV70 (12),

— remiantis vidutiniu CD86 verčių SI, nustatomas bandomosios cheminės medžiagos, dėl kurios pagal U-SENS™ metodą gauta TEIGIAMA prognozė, bendras EC150 (žr. 21 punktą) (12).

Prognozavimo modelis

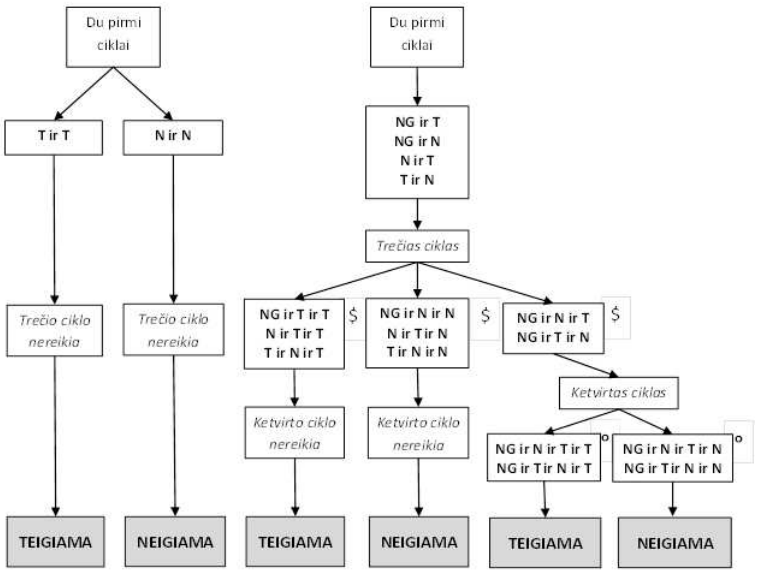
21. Atliekant CD86 ekspresijos matavimą, kiekviena bandomoji cheminė medžiaga bandoma bent keturių koncentracijų ir bent per du atskirus bandymo ciklus (atliekamus skirtingomis dienomis), gaunant vieną prognozę (NEIGIAMA arba TEIGIAMA).

— Atskira kurio nors U-SENS™ bandymo ciklo išvada laikoma neigiama (toliau – N), jei CD86 SI yra mažesnis nei 150 % esant visoms necitotoksiškoms koncentracijoms (ląstelių gyvybingumas ≥70 %) ir nepastebima trukdžių (citotoksiškumo, tirpumo (žr. 18 punktą) ar spalvinių trukdžių (žr. 19 punktą), nepriklausomai nuo to, kokioms necitotoksiškoms koncentracijoms esant pastebimas toks trukdis). Visais kitais atvejais, kai CD86 SI yra 150 % ar didesnis ir (arba) pastebima trukdžių, atskira to U-SENS™ bandymo ciklo išvada laikoma teigiama (toliau – T).

— U-SENS™ prognozė laikoma NEIGIAMA, jei bent dviejų atskirų bandymo ciklų rezultatai yra neigiami (N) (1 diagrama). Jei abiejų pirmų bandymo ciklų rezultatai yra neigiami (N), U-SENS™ prognozė laikoma NEIGIAMA ir trečio ciklo atlikti nereikia.

— U-SENS™ prognozė laikoma TEIGIAMA, jei bent dviejų atskirų bandymo ciklų rezultatai yra teigiami (T) (1 diagrama). Jei abiejų pirmų bandymo ciklų rezultatai yra teigiami (T), U-SENS™ prognozė laikoma TEIGIAMA ir trečio ciklo atlikti nereikia.

— Kadangi neatliekama dozės nustatymo tyrimo, daroma išimtis, jei per pirmąjį bandymo ciklą CD86 SI yra lygus 150 % arba didesnis tik esant didžiausiai necitotoksiškai koncentracijai. Tas ciklas tada laikomas NEGALUTINIU (NG) ir reikėtų per papildomus ciklus ištirti papildomas koncentracijas (tarp didžiausios necitotoksiškos koncentracijos ir mažiausios citotoksiškos koncentracijos – žr. 20 punktą). Tuo atveju, jei nustatoma, kad tam tikras ciklas yra negalutinis (NG), reikėtų dar bent 2 papildomų ciklų, ir ketvirto ciklo tuo atveju, jei 2 ir 3 ciklų rezultatai nesutampa (skirtingai N ir (arba) T) (1 diagrama). Paskesnių ciklų rezultatai bus laikomi teigiamais, net jei tik vienos necitotoksiškos koncentracijos CD86 vertė bus lygi 150 % ar didesnė, nes koncentracijos vertės yra atitinkamai nustatytos tai konkrečiai bandomajai cheminei medžiagai. Galutinė prognozė bus pagrįsta per tris arba keturis atskirus bandymo ciklus gautų rezultatų dauguma (t. y. 2 iš 3 arba 2 iš 4) (1 diagrama).



1 diagrama. Prognozavimo modelis, naudojamas atliekant U-SENS™ bandymą. U-SENS™ prognozę reikėtų vertinti remiantis IATA sistema ir laikantis 4 punkto ir bendrojo įvado 7, 8 bei 9 punktų nuostatų.

N – ciklas, kurio metu nenustatyta CD86 teigiamo atsako ar trukdžių;

T – ciklas, kurio metu nustatytas CD86 teigiamas atsakas ir (arba) trukdžiai;

NG – negalutinis. Pirmas bandymo ciklas yra negalutinis, kai CD86 yra teigiamas tik esant didžiausiai necitotoksiškai koncentracijai.

#: negalutinė (NG) atskira išvada, padaryta tik dėl pirmojo bandymo ciklo, visada reiškia, kad reikia atlikti trečią ciklą, kad būtų gauta teigiamų (T) arba neigiamų (N) išvadų dauguma bent per 2 iš 3 atskirų ciklų.

$: šiuose langeliuose parodyti atitinkami visų trijų ciklų rezultatų deriniai, remiantis per pirmus du ciklus gautais rezultatais, parodytais aukščiau esančiame langelyje.

°: šiuose langeliuose parodyti atitinkami visų keturių ciklų rezultatų deriniai, remiantis per pirmus tris ciklus gautais rezultatais, parodytais aukščiau esančiame langelyje.

Priimtinumo kriterijai

22. Atliekant U-SENS™ bandymą turėtų būti tenkinami šie priimtinumo kriterijai (12):

— 45 ± 3 val. veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pabaigoje vidutinis trijų kartotinių bandinių neapdorotų U937 ląstelių gyvybingumas turi būti >90 % ir neturi būti nustatyta CD86 ekspresijos poslinkio. Neapdorotų U937 ląstelių CD86 bazinė ekspresija turi būti intervale nuo ≥2 % iki ≤25 %;

— kai DMSO naudojamas kaip tirpiklis, DMSO nešiklio kontrolinio bandinio tinkamumas įvertinamas apskaičiuojant DMSO stimuliavimo indeksą (SI), palyginant jį su neapdorotomis ląstelėmis, ir vidutinis trijų kartotinių bandinių ląstelių gyvybingumas turi būti >90 %. DMSO nešiklio kontrolinis bandinys yra tinkamas, jei jo trijų kartotinių bandinių CD86 SI vidutinė vertė yra mažesnė nei neapdorotų U937 ląstelių trijų kartotinių bandinių CD86 SI vidurkio 250 %;

— bandymo ciklai laikomi tinkamais, jei bent dvi iš trijų neapdorotų U937 ląstelių IgG1 verčių yra intervale nuo ≥0,6 % iki <1,5 %;

— kartu bandytas neigiamas kontrolinis (pieno rūgšties) bandinys laikomas tinkamu, jei bent dviejų iš trijų kartotinių bandinių rezultatai yra neigiami (CD86 SI < 150 %) ir necitotoksiški (ląstelių gyvybingumas ≥70 %);

— teigiamas kontrolinis (TNBS) bandinys laikomas tinkamu, jei bent dviejų iš trijų kartotinių bandinių rezultatai yra teigiami (CD86 SI ≥ 150 %) ir necitotoksiški (ląstelių gyvybingumas ≥70 %).

Bandymo ataskaita

23. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė medžiaga:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— fizinė išvaizda, tirpumas visos sudėties terpėje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis apibūdinimas, pvz., cheminė tapatybė (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinė sudėtis ir svarbios fizikinės ir cheminės savybės (žr. pirmiau), būdingos sudedamosioms dalims (tiek, kiek žinoma);

— fizinė išvaizda, tirpumas visos sudėties terpėje, tirpumas DMSO ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

— molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai yra žinomos sudėties mišiniai ar polimerai, arba kita šiam tyrimui svarbi informacija;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Kontroliniai bandiniai

Teigiamas kontrolinis bandinys:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— fizinė išvaizda, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma, ir kai tinka);

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— nuoroda į ankstesnius teigiamus kontrolinių bandinių rezultatus, iš kurių nustatyti tinkami bandymo eigos priimtinumo kriterijai (jei tinka).

Neigiamas ir tirpiklio ar nešiklio kontroliniai bandiniai:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma) tuo atveju, jei naudojamas ne vienas iš nurodytų bandymo gairėse, o kitas kontrolinio bandinio tirpiklis ar nešiklis;

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Bandymo sąlygos

— Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

— naudoto bandymo aprašymas;

— naudojama ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įstaiga, iš kurios gautos ląstelės);

— naudojama tėkmės citometrijos įranga (pvz., modelis), įskaitant prietaisų nuostačius, antikūnus ir naudojamą citotoksiškumo žymenį;

— pagal kokią procedūrą įrodyta laboratorijos kvalifikacija atlikti šį bandymą, atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus, ir pagal kokią procedūrą įrodytas šio bandymo atlikimo atkuriamumas laikui bėgant, pvz., remiantis ankstesniais kontroliniais duomenimis ir (arba) ankstesnių reaktyvumo patikrinimų duomenimis.

Bandymo priimtinumo kriterijai

— Ląstelių gyvybingumo ir CD86 stimuliavimo indekso (SI) vertės, gautos naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtinumo intervalais;

— ląstelių gyvybingumo ir SI vertės, gautos naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtinumo intervalais;

— ląstelių gyvybingumas esant visoms bandymui naudojamoms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms.

Bandymo procedūra

— Bandymo ciklų skaičius;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, jos įterpimas ir pasirinktas veikimo laikas (jei skiriasi nuo rekomenduojamo);

— veikimo bandomąja medžiaga trukmė;

— atliekant vertinimą ir priimant sprendimą taikytų kriterijų aprašymas;

— bet kokių bandymo procedūros keitimų aprašymas.

Rezultatai

— Duomenų lentelė, įskaitant CV70 vertę (jei tinka), stimuliavimo indeksą (SI), ląstelių gyvybingumo vertes, EC150 vertes (jei tinka), gautas iš bandomosios cheminės medžiagos bandinių ir teigiamo kontrolinio bandinio per kiekvieną ciklą, ir nurodytą bandomosios cheminės medžiagos vertinimą pagal prognozavimo modelį;

— bet kokių kitų svarbių stebėjimų aprašymas (jei tinka).

Rezultatų aptarimas

— Atliekant U-SENS™ bandymą gautų rezultatų aptarimas;

— bandymo rezultatų apsvarstymas atsižvelgiant į IATA sistemą, jei turima ir kitos svarbios informacijos.

Išvados

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*. Pateikta http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.

(3) EC EURL ECVAM (2016). *ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing*. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Paskelbta [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). *EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing*. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Paskelbta 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. Paskelbta [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. Paskelbta 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. Pateikta [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. Paskelbta http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Jungtinės Tautos (JT) (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. Paskelbta 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. Paskelbta 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. Paskelbta https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

2.1. priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Tikslumas– bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tai yra bandymo atlikimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Šis terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (14).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP)– įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupės cheminės struktūros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (15).

CD86 atsakas į koncentraciją– priklausomumas nuo koncentracijos (arba atsakas į koncentraciją), kai po teigiamos koncentracijos (kuriai esant CD86 stimuliavimo indeksas (SI) ≥ 150) tolesnės koncentracijos CD86 SI yra didesnis.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

CV70– nustatyta koncentracijos vertė, kuriai esant ląstelių gyvybingumas yra 70 %.

Poslinkis yra, kai– i) neapdoroto kontrolinio kartotinio 3 bandinio pakoreguota %$CD86^+$ vertė yra mažesnė nei neapdorotų kontrolinių kartotinių 1 ir 2 bandinių pakoreguotos %$CD86^+$ vertės vidurkio 50 %; ir ii) neigiamo kontrolinio kartotinio 3 bandinio pakoreguota %$CD86^+$ vertė yra mažesnė nei neigiamų kontrolinių kartotinių 1 ir 2 bandinių pakoreguotos %$CD86^+$ vertės vidurkio 50 %.

EC150– nustatytos koncentracijos vertės, kurioms esant CD86 ekspresijos SI yra 150 %.

Tėkmės citometrija– citometrinis metodas, pagal kurį ląstelės viena po kitos suspenduojamos skysčio tėkmėje ir leidžiamos per jaudrinančios šviesos židinį, kuriame šviesa išskaidoma toms ląstelėms ir jų sudedamosioms dalims būdingais raštais; ląstelės dažnai pažymimos fluorescenciniais žymenimis, todėl šviesa pirmiausia sugeriama, o tada išspinduliuojama pakitusiais dažniais.

Pavojus– būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

IATA (integruotasis bandymo ir vertinimo metodas, angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*)– struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui nustatyti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (dėl galimo pavojaus ar veikimo gebos ir paveikimo ta medžiaga). Jį taikant strategiškai apibendrinami ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima ta informacija pagrįsti reglamentavimo sprendimą dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomus tikslinius, taigi minimalius bandymus.

Mišinys– iš dviejų ar daugiau medžiagų sudarytas mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga– medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga– medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija yra ≥10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Daugiakomponentė medžiaga nuo mišinio skiriasi tuo, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi arba daugiau medžiagų, tarp kurių cheminė reakcija nevyksta. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

Teigiamas kontrolinis bandinys– kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, apdorotas tam tikra medžiaga, kuri, kaip žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti, kad būtų galima vertinti teigiamo kontrolinio bandinio atsako kintamumą laikui bėgant, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Prehaptenai– cheminės medžiagos, kurios tampa jautrinančios po abiotinio virsmo, pvz., dėl oksidacijos.

Prohaptenai– cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, kad pasireikštų jų odos jautrinimo geba.

Tinkamumas– ryšio tarp bandymo ir tiriamo poveikio, taip pat bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas apima bandymo tikslumo (atitikties) aspektą (14).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo atkuriamumo laboratorijose ir tarp laboratorijų, laikui bėgant, matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (14).

Bandymo ciklas– vienos ar daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas kartu naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį ir teigiamą kontrolinį bandinį.

Jautris– visų teigiamų (veikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (14).

SI– stimuliavimo indeksas. Cheminės medžiagos paveiktų ląstelių fluorescencijos intensyvumo geometrinio vidurkio santykinės vertės, palyginti su tirpikliu apdorotomis ląstelėmis.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys– neapdorotas bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, išskyrus bandomąją cheminę medžiagą, tačiau įskaitant naudojamą tirpiklį ar nešiklį. Jis naudojamas nustatant bazinį atsaką bandiniuose, apdorotuose bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta ar stabiliai disperguota tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai šis bandinys naudojamas bandymui kartu su terpės kontroliniu bandiniu, jis taip pat parodo, ar tirpiklis arba nešiklis veikia bandymo sistemą.

Specifiškumas– visų neigiamų (neveikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (14).

Dažymo buferinis tirpalas– fosfatinis buferinis druskų tirpalas, kuriame yra 5 % veršelio embriono serumo.

Medžiaga– gamtoje randamas ar bet kokio gamybos proceso metu gaunamas cheminis elementas ir jo junginiai, įskaitant bet kokius priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias dėl gamybos proceso, tačiau išskyrus tirpiklius, kuriuos galima atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ir nekeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga– naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS)– sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir lygius, ir naudojami atitinkami informaciniai elementai, tokie kaip piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų perduota informacija apie jų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbdavius, darbuotojus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likviduotojus) ir aplinką (16).

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymas– bandymas, laikomas pakankamai tinkamu ir patikimu konkrečiam tikslui pasiekti ir pagrįstas moksliškai patikimais principais. Bandymas niekada nėra absoliučiai tinkamas – jis yra tinkamas tik tam tikram tikslui pasiekti (14).

2.2. priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Prieš pradėdamos įprastu būdu atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos teisingą numatytą U-SENS™ prognozę dėl 10 medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje, ir gaudamos CV70 bei EC150 vertes, kurios patenka į atitinkamus etaloninius intervalus, dėl ne mažiau kaip 8 iš 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų. Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos buvo pasirinktos siekiant aprėpti odos jautrinimo pavojams būdingų atsakų spektrą. Kiti jų atrankos kriterijai buvo tokie, kad tų medžiagų būtų galima įsigyti iš komercinių tiekėjų ir kad būtų galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* duomenų, nustatytų atliekant U-SENS™ bandymą. Taip pat yra paskelbti U-SENS™ bandymo atlikimo etaloniniai duomenys (1) (8).

1 lentelė. 1

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti dėl U-SENS™ bandymo

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Fizinė būsena	Prognozė *in vivo* [1]	U-SENS tirpiklis /nešiklis	U-SENS CV70 etaloninis intervalas µg/ml [2]	U-SENS EC150 etaloninis intervalas µg/ml [2]
4-fenilendiaminas	106-50-3	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	Visos sudėties terpė [3]	<30	Teigiama (≤10)
Pikrilsulfonrūgštis	2508-19-2	Skystis	Jautrinanti (stipriai)	Visos sudėties terpė	>50	Teigiama (≤50)
Dietilmaleatas	141-05-9	Skystis	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	DMSO	10–100	Teigiama (≤20)
Rezorcinolis	108-46-3	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Visos sudėties terpė	>100	Teigiama (≤50)
Cinamilo alkoholis (stirolis)	104-54-1	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	DMSO	>100	Teigiama (10–100)
4-alilanizolas	140-67-0	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	DMSO	>100	Teigiama (<200)
Sacharinas	81-07-2	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	DMSO	>200	Neigiama (>200)
Glicerolis	56-81-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Visos sudėties terpė	>200	Neigiama (>200)
Pieno rūgštis	50-21-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Visos sudėties terpė	>200	Neigiama (>200)
Salicilo rūgštis	69-72-7	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	DMSO	>200	Neigiama (>200)

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.
([1]) Pavojaus (ir veikimo gebos) *in vivo* prognozė pagrįsta LLNA duomenimis (1) (8). Veikimo *in vivo* geba gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (17).
([2]) Pagrįsta anksčiau nustatytomis vertėmis (1) (8).
([3]) Visos sudėties terpė – RPMI-1640 terpė, papildyta 10 % veršelio embriono serumo, 2 mM L-glutamino, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino (8).

3 priedėlis

ODOS JAUTRINIMAS *IN VITRO*. IL-8 LUC TYRIMAS

PIRMINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

1. Priešingai nei tyrimai, kuriuos atliekant analizuojama ląstelių paviršinių žymenų ekspresija, atliekant IL-8 Luc tyrimą kiekybiškai nustatomi IL-8 (citokino, siejamo su dendritinių ląstelių aktyvinimu) ekspresijos pokyčiai. Iš THP-1 gautoje IL-8 reporterinių ląstelių linijoje (THP-G8, gauta iš žmogaus ūminės monocitinės leukemijos ląstelių linijos THP-1) matuojama IL-8 ekspresija paveikus jautrinančiomis medžiagomis (1). Nustatyta liuciferazės ekspresija naudojama padedant skirti odą jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas.

2. IL-8 Luc tyrimas įvertintas atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (2), kurį atliko Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centras (JaCVAM), **Ekonomikos, prekybos ir pramonės ministerija** (METI) ir Japonijos **Alternatyvų bandymams su gyvūnais draugija (JSAAE)**, o vėliau atlikta jo nepriklausoma ekspertizė (3) vadovaujant JaCVAM ir Sveikatos, darbo ir gerovės ministerijai (MHLW) ir padedant **Tarptautinio bendradarbiavimo rengiant alternatyvius bandymų metodus** organizacijai (ICATM). Atsižvelgiant į visus turimus įrodymus ir į reguliavimo institucijų bei suinteresuotųjų subjektų įnašus, IL-8 Luc tyrimas laikomas naudingu kaip IATA dalis, padedant skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų, kad būtų galima jas klasifikuoti pagal pavojingumą ir atitinkamai ženklinti. IL-8 Luc tyrimo duomenų naudojimo kartu su kita informacija pavyzdžių pateikta literatūroje (4) (5) (6).

3. Įrodyta, kad IL-8 Luc tyrimą galima pritaikyti laboratorijose, turinčiose ląstelių kultūrų auginimo ir liuciferazės matavimo patirties. Nustatytas jo laboratorinis ir tarplaboratorinis atkuriamumas atitinkamai yra 87,7 % ir 87,5 % (2). Duomenys, gauti atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (2) ir iš kitų paskelbtų mokslo darbų (1) (6), rodo, kad, palyginti su LLNA, atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 118 iš 143 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 25 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir IL-8 Luc tyrimo tikslumas skiriant odą jautrinančias (JT GHS ar CLP 1 kategorijos) medžiagas nuo nejautrinančių (jokios JT GHS ar CLP kategorijos) medžiagų yra 86 % (101/118), esant 96 % (92/96) jautriui ir 41 % (9/22) specifiškumui. Išskyrus medžiagas, neįtrauktas į šio tyrimo taikymo sritį, kaip apibūdinta toliau (5 punktas), atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 113 iš 136 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 23 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir IL-8 Luc tyrimo tikslumas yra 89 % (101/113), esant 96 % (92/96) jautriui ir 53 % (9/17) specifiškumui. Naudojant duomenis apie žmones, nurodytus Urbisch *et al.* (7), atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 76 iš 90 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 14 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir šio tyrimo tikslumas yra 80 % (61/76), jautris 93 % (54/58) ir specifiškumas 39 % (7/18). Išskyrus medžiagas, neįtrauktas į šio tyrimo taikymo sritį, atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 71 iš 84 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 13 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir šio tyrimo tikslumas yra 86 % (61/71), esant 93 % (54/58) jautriui ir 54 % (7/13) specifiškumui. Klaidingai neigiamos prognozės atliekant IL-8 Luc tyrimą yra labiau tikėtinos dėl tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra maža arba vidutinė (JT GHS ar CLP 1B subkategorijos medžiagos), negu tų, kurių jautrinimo geba yra didelė (JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (6). Visa ši informacija patvirtina IL-8 Luc tyrimo naudingumą nustatant odos jautrinimo pavojus. Nurodytos IL-8 Luc tyrimo, atliekamo kaip atskiras bandymas, tikslumo vertės yra tik orientacinės, nes šio bandymo duomenis reikėtų vertinti kartu su informacija iš kitų šaltinių, kaip IATA dalį, ir pagal bendrojo įvado 7 ir 8 punktuose pateiktas nuostatas. Be to, vertinant odos jautrinimo bandymus ne su gyvūnais, reikėtų atminti, kad LLNA bandymas ir kiti bandymai su gyvūnais gali nevisiškai tiksliai parodyti su žmonėmis susijusią padėtį.

4. Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, įsitikinta, kad IL-8 Luc tyrimas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, apimančioms įvairias organines funkcines grupes, reakcijos mechanizmus, odos jautrinimo gebą (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus), fizikines ir chemines savybes (2) (6).

5. Nors atliekant IL-8 Luc tyrimą kaip tirpiklis naudojamas X-VIVO™ 15, jį atliekant tiksliai įvertintos tos cheminės medžiagos, kurių Log K_{ow} >3,5, ir tos, kurių tirpumas vandenyje apie 100 μg/ml (apskaičiuotas naudojant *EPI Suite*™), o šio metodo veiksmingumas nustatant mažai vandenyje tirpias jautrinančias medžiagas yra didesnis negu tada, kai atliekant IL-8 Luc tyrimą kaip tirpiklis naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO) (2). Tačiau neigiami rezultatai, gauti dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurios netirpsta esant 20 mg/ml koncentracijai, gali būti klaidingai neigiami rezultatai dėl jų netirpumo X-VIVO™ 15. Todėl į šių cheminių medžiagų neigiamus rezultatus neturėtų būti atsižvelgiama. Atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą buvo gauta didelė klaidingai neigiamų anhidridų rezultatų dalis. Be to, dėl ribotos šios ląstelių linijos metabolinės gebos (8) ir bandymo sąlygų atliekant šį tyrimą gali būti gauti neigiami rezultatai dėl prohaptenų (medžiagų, kurias būtina aktyvinti fermentais), ir prehaptenų (medžiagų, kurios aktyvinamos oksidacija ore). Tačiau nors medžiagų, kurios, kaip įtariama, gali būti prehaptenai ar prohaptenai, neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami atsargiai, atliekant IL-8 Luc tyrimą teisingai įvertinta 11 iš 11 prehaptenų, 6 iš 6 prohaptenų ir 6 iš 8 prehaptenų ar prohaptenų – šie rezultatai pateikti IL-8 Luc tyrimo duomenų rinkinyje (2). Remiantis neseniai atlikta išsamia trijų bandymų ne su gyvūnais (DPRA, *KeratinoSens*™ ir h-CLAT) peržiūra vertinant, kaip jais nustatomi prehaptenai ir prohaptenai (9), ir remiantis tuo, kad IL-8 Luc tyrimui naudojamos THP-G8 ląstelės yra ląstelių linija, gauta iš THP-1 linijos, naudojamos h-CLAT tyrimui, IL-8 Luc tyrimas taip pat gali padėti padidinti bandymų, atliekamų ne su gyvūnais, jautrį nustatyti prehaptenus ir prohaptenus, kartu atliekant kitus bandymus. Iki šiol atliekant paviršinio aktyvumo medžiagų bandymus gauti (klaidingai) teigiami rezultatai nepriklausomai nuo jų tipo (pvz., katijoninės, anijoninės ar nejoninės medžiagos). Galiausiai cheminės medžiagos, kurios veikia liuciferazę, gali iškreipti jos veikimą ar matavimą, sukeldamos akivaizdų slopinimą arba padidindamos liuminescenciją (10). Pavyzdžiui, pranešta, kad didesnės kaip 1 μM fitoestrogenų koncentracijos trikdo liuminescencijos signalus atliekant kitus liuciferazės reporterinio geno tyrimus dėl per didelio liuciferazės reporterinio geno aktyvinimo. Dėl to liuciferazės ekspresiją, gautą esant didelėms fitoestrogenų ar junginių, laikomų galinčiais sukelti fitoestrogenams būdingą liuciferazės reporterinio geno aktyvinimą, koncentracijoms, reikia vertinti atsargiai (11). Remiantis tuo, kas išdėstyta, į šio tyrimo taikymo sritį neįtrauktos paviršinio aktyvumo medžiagos, anhidridai ir liuciferazę veikiančios cheminės medžiagos. Tais atvejais, kai yra įrodymų, kad IL-8 Luc tyrimas netinka kitų konkrečių kategorijų bandomosioms cheminėms medžiagoms, šio bandymo nereikėtų atlikti dėl tų konkrečių kategorijų medžiagų.

6. Kaip aprašyta pirmiau, IL-8 Luc tyrimu padedama skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų. Reikia atlikti tolesnį darbą, geriausia remiantis duomenimis apie žmones, siekiant nustatyti, ar IL-8 Luc bandymo rezultatai, kartu remiantis kitais informacijos šaltiniais, gali padėti vertinti jautrinimo gebą.

7. Terminų apibrėžtys pateiktos 3.1. priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

8. IL-8 Luc tyrimui naudojama žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linija THP-1, gauta iš „American Type Culture Collection“ (Manasasas, Virdžinija, JAV). Naudojant šią ląstelių liniją, Tohoku universiteto Medicinos mokyklos Dermatologijos fakultete sukurta iš THP-1 gauta IL-8 reporterinių ląstelių linija THP-G8, kurioje yra stabiliosios oranžinės liuciferazės (SLO) ir stabiliosios raudonos liuciferazės (SLR) genai, atitinkamai kontroliuojami IL-8 ir **gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės** (GAPDH) promotorių (1). Taip galima kiekybiškai matuoti liuciferazės geno indukciją, nustatant liuminescenciją iš aiškiai nustatytų šviesą išskiriančių liuciferazės substratų, kaip IL-8 ir GAPDH aktyvumo ląstelėse, paveiktose jautrinančiomis cheminėmis medžiagomis, rodiklį.

9. Dvispalvė tyrimo sistema susideda iš oranžinę šviesą skleidžiančios liuciferazės (SLO; λ*max* = 580 nm) (12), skirtos IL-8 promotoriaus geno ekspresijai, ir raudoną šviesą skleidžiančios liuciferazės (SLR; λ*max* = 630 nm) (13), skirtos vidaus kontrolės promotoriaus GAPDH geno ekspresijai matuoti. Abi liuciferazės skleidžia skirtingų spalvų šviesą reaguodamos su jonvabalių d-liuciferinu, o jų liuminescencija matuojama vienu metu per vieno etapo reakciją, tiriamo mišinio skleidžiamą spinduliuotę išskaidant naudojamu optiniu filtru (14) (3.2. priedėlis).

10. THP-G8 ląstelės yra 16 valandų veikiamos bandomąja chemine medžiaga, po to matuojamas SLO liuciferazės aktyvumas (SLO-LA), atitinkantis IL-8 promotoriaus veikimą, ir SLR liuciferazės aktyvumas (SLR-LA), atitinkantis GAPDH promotoriaus veikimą. Kad būtų lengviau suprasti santrumpas, SLO-LA ir SLR-LA atitinkamai žymimi kaip IL8LA ir GAPLA. 1 lentelėje apibrėžti terminai, susiję su liuciferazės aktyvumu per IL-8 Luc tyrimą. Išmatuotos vertės naudojamos apskaičiuojant normalizuotą IL8LA (nIL8LA), kuris yra IL8LA ir GAPLA santykis; nIL8LA indukciją (Ind-IL8LA), kuri yra THP-G8 ląstelių, paveiktų bandomąja chemine medžiaga, keturis kartus išmatuotų nIL8LA verčių ir nepaveiktų THP-G8 ląstelių nIL8LA verčių aritmetinių vidurkių santykis; ir GAPLA slopinimą (Inh-GAPLA), kuris yra THP-G8 ląstelių, paveiktų bandomąja chemine medžiaga, keturis kartus išmatuotų GAPLA verčių ir nepaveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA verčių aritmetinių vidurkių santykis, naudojamas kaip citotoksiškumo rodiklis.

1 lentelė. 1

Su liuciferazės aktyvumu atliekant IL-8 Luc tyrimą susijusių terminų apibrėžtys

Santrumpos	Apibrėžtis
GAPLA	SLR liuciferazės aktyvumas, atitinkantis GAPDH promotoriaus veikimą
IL8LA	SLO liuciferazės aktyvumas, atitinkantis IL-8 promotoriaus veikimą
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių nIL8LA / nepaveiktų ląstelių nIL8LA
Inh-GAPLA	cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA / nepaveiktų ląstelių GAPLA
CV05	Mažiausia cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant Inh-GAPLA tampa < 0,05.

11. Paskelbti procedūros atlikimo standartai (angl. *Performance standards*, PS) (15), kad būtų galima lengviau patvirtinti iš dalies pakeistų *in vitro* IL-8 liuciferazės bandymų, panašių į IL-8 Luc tyrimą, tinkamumą ir tinkamu laiku pakeisti EBPO bandymų gaires 442E, įtraukiant tuos bandymus. EBPO savitarpis duomenų pripažinimas (angl. *Mutual Acceptance of Data*, MAD) bus užtikrintas tik dėl tų bandymų, kurių tinkamumas patvirtintas pagal PS standartus, jei tie bandymai įvertinti ir įtraukti į EBPO bandymų gaires 442E (16).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

12. Prieš pradėdamos įprastai atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją naudodamos 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, kurių sąrašas pateiktas 3.3 priedėlyje, pagal gerąją *in vitro* metodų taikymo praktiką (17). Be to, šio bandymo naudotojai turėtų turėti ankstesnių duomenų bazę, kurioje būtų kaupiami duomenys, gauti atliekant reaktyvumo patikrinimus (žr. 15 punktą) ir naudojant teigiamus bei tirpiklio ar nešiklio kontrolinius bandinius (žr. 21–24 punktus), ir šiais duomenimis reikėtų naudotis patvirtinant tolesnį šio bandymo atkuriamumą savo laboratorijoje laikui bėgant.

PROCEDŪRA

13. Yra paskelbta IL-8 Luc tyrimo standartinė veiklos procedūra (SVP), kurios reikėtų laikytis atliekant šį bandymą (18). Laboratorijos, norinčios atlikti šį bandymą, gali gauti rekombinantinių THP-G8 ląstelių liniją iš Totoryje (Japonija) esančios laboratorijos

„GPC Lab. Co. Ltd.“, jei pasirašo medžiagų perdavimo susitarimą (angl. *Material Transfer Agreement*, MTA) pagal EBPO šablone nustatytas sąlygas. Tolesniuose punktuose aprašyti pagrindiniai šio tyrimo komponentai ir procedūros.

Ląstelių paruošimas

14. Atliekant IL-8 Luc tyrimą turėtų būti naudojama iš Totoryje (Japonija) esančios laboratorijos „GPC Lab. Co. Ltd.“ gauta THP-G8 ląstelių linija (žr. 8 ir 13 punktus). Gautos ląstelės padauginamos (2–4 sėjimai) ir laikomos užšaldytos kaip vienalytė pradinė kultūra. Šios pradinės kultūros ląsteles galima dauginti iki ne daugiau kaip 12 sėjimų ar ne ilgiau kaip 6 savaites. Dauginimui naudojama terpė yra auginimo terpė RPMI-1640, kurioje yra 10 % galvijų vaisiaus serumo (FBS), antibiotiko / priešgrybelinio tirpalo (100 U/ml penicilino G, 100 µg/ml streptomicino ir 0,25 µg/ml amfotericino B 0,85 % fiziologiniame tirpale) (pvz., GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml puromicino (pvz., CAS:58-58-2) ir 300 µg/ml G418 (pvz., CAS:108321-42-2).

15. Prieš naudojant ląsteles bandymui, reikėtų patikrinti jų tinkamumą, atliekant reaktyvumo patikrinimą. Šį patikrinimą reikėtų atlikti po 1–2 savaičių ar 2–4 sėjimų nuo atitirpinimo, naudojant teigiamą kontrolinį bandinį su 4-nitrobenzilbromidu (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥99 % grynumo) ir neigiamą kontrolinį bandinį su pieno rūgštimi (CAS:50-21-5, ≥85 % grynumo). Naudojant 4-NBB turėtų būti gautas teigiamas atsakas į Ind-IL8LA (≥1,4), o naudojant pieno rūgštį turėtų būti gautas neigiamas atsakas į Ind-IL8LA (<1,4). Tyrimui naudojamos tik tokios ląstelės, kurių reaktyvumo patikrinimas atliktas. Šis patikrinimas turėtų būti atliekamas pagal 22–24 punktuose aprašytas procedūras.

16. Bandymui THP-G8 ląstelės sėjamos nuo 2 iki 5×10^5 ląstelių/ml tankiu ir jų kultūra iš anksto ruošiama auginimo kolbose 48–96 valandas. Bandymo dieną iš auginimo kolbos surinktos ląstelės perplaunamos terpe RPMI-1640 su 10 % FBS be antibiotikų, o tada resuspenduojamos RPMI-1640 su 10 % FBS be antibiotikų, 1×10^6 ląstelių/ml tankiu. Tada ląstelės paskirstomos 96 duobučių juodoje plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (pvz., Costar Cat#3603) su 50 µl tūrio duobutėmis (5×10^4 ląstelių į kiekvieną duobutę).

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių medžiagų paruošimas

17. Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Atliekant IL-8 Luc tyrimą, bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos beserumėje terpėje X-VIVO™ 15 (jos galima įsigyti iš komercinių tiekėjų: gamintojas „Lonza“, 04-418Q) iki galutinės 20 mg/ml koncentracijos. X-VIVO™ 15 įpilama į mikrocentrifugos mėgintuvėlį, į kurį dėta 20 mg bandomosios cheminės medžiagos (nepriklausomai nuo tos cheminės medžiagos tirpumo), kad susidarytų 1 ml tūris, o tada 30 minučių intensyviai plakama ir purtoma rotoriumi ne didesniu kaip 8 sūkių/min. greičiu, maždaug 20 °C aplinkos temperatūroje. Be to, jei kietosios cheminės medžiagos tebėra neištirpusios, mėgintuvėlis veikiamas ultragarsu, iki cheminė medžiaga visiškai ištirpsta arba stabiliai disperguojama. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra tirpios X-VIVO™ 15, skirtas tirpalas 5 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15 ir naudojamas kaip X-VIVO™ 15 pradinis tos bandomosios cheminės medžiagos tirpalas (4 mg/ml). Kai bandomosios cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15, mišinys vėl plakamas sukant bent 30 min., tada centrifuguojamas 15000 sūkių/min. (≈20000 *g*) 5 min.; gautas supernatantas naudojamas kaip tos bandomosios cheminės medžiagos X-VIVO™ 15 pradinis tirpalas. Kitų tirpiklių, tokių kaip DMSO, vandens ar auginimo terpės, naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas. Cheminių medžiagų tirpinimo procedūra išsamiai parodyta 3.5 priedėlyje. X-VIVO™ 15 tirpalai, aprašyti 18–23 punktuose, sumaišomi santykiu 1:1 (tūrio) su ląstelių suspensijomis, paruoštomis 96 duobučių juodoje plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (žr. 16 punktą).

18. Pirmuoju bandymo ciklu siekiama nustatyti citotoksišką cheminių medžiagų koncentraciją ir ištirti jų odos jautrinimo gebą. Naudojant terpę X-VIVO™ 15, bandomųjų cheminių medžiagų X-VIVO™ 15 pradiniai tirpalai paruošiami skiedžiant serijiniu būdu po 2 kartus (žr. 3.5 priedėlį), naudojant 96 duobučių mikrotitravimo plokštelę (pvz., Costar Cat#EW-01729-03). Tada 96 duobučių plokščiadugnėje juodoje plokštelėje įpilama po 50 µl praskiesto tirpalo į kiekvieną duobutę, į kurią dėta 50 µl ląstelių suspensijos. Taigi bandomųjų cheminių medžiagų, kurios yra tirpios X-VIVO ™ 15, galutinės koncentracijos yra nuo 0,002 iki 2 mg/ml (3.5 priedėlis). Kai bandomosios cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO ™ 15 esant 20 mg/ml koncentracijai, nustatomi skiedimo koeficientai tik intervale nuo 2 iki 2^{10}, nors faktinės galutinės tų bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos tebėra nežinomos ir priklauso nuo tų bandomųjų cheminių medžiagų soties koncentracijos X-VIVO ™ 15 pradiniame tirpale.

19. Per paskesnius bandymo ciklus (t. y. antrame, trečiame ir ketvirtame kartotiniuose bandiniuose) X-VIVO™ 15 pradinis tirpalas paruošiamas 4 kartus didesnės koncentracijos nei ta, kuriai esant ląstelių gyvybingumo lygis yra 05 (CV05; mažiausia koncentracija, kuriai esant Inh-GAPLA tampa < 0,05), per pirmąjį bandymą. Jei Inh-GAPLA nesumažėja iki mažesnės nei 0,05 vertės esant didžiausiai koncentracijai per pirmąjį ciklą, X-VIVO™ 15 pradinis tirpalas ruošiamas didžiausios koncentracijos, kuri naudota per pirmąjį ciklą. CV05 koncentracijos vertė apskaičiuojama dalijant per pirmąjį ciklą naudoto pradinio tirpalo koncentracijos vertę iš skiedimo koeficiento, skirto CV05 (X) (skiedimo koeficientas CV05 (X); tai toks skiedimo koeficientas, kuris reikalingas pradiniam tirpalui praskiesti iki CV05 lygio) (žr. 3.5 priedėlį). Bandomųjų cheminių medžiagų, netirpių X-VIVO esant 20 mg/ml koncentracijai, CV05 koncentracijos vertė nustatoma kaip pradinio tirpalo koncentracija × 1/X. Bandymo 2–4 ciklams antras pradinis tirpalas ruošiamas kaip 4 × CV05 (3.5 priedėlis).

20. X-VIVO™ 15 antrųjų pradinių tirpalų serijinis skiedimas atliekamas taikant skiedimo koeficientą 1,5, naudojant 96 duobučių mikrotitravimo plokštelę. Tada į 96 duobučių plokščiadugnės juodos plokštelės duobutes, kuriose yra po 50 µl ląstelių suspensijos, įpilama praskiesto tirpalo 50 µl į kiekvieną duobutę. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos bandymui turėtų būti skirtos 4 duobutės. Tada tie bandiniai sumaišomi ant plokštelių purtyklės ir 16 valandų inkubuojami 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2, po to matuojamas liuciferazės aktyvumas, kaip aprašyta toliau.

21. Tirpiklio kontrolinis bandinys – tai mišinys, ruošiamas į kiekvieną plokštelės duobutę dedant po 50 µl X-VIVO™ 15 ir 50 µl ląstelių suspensijos RPMI-1640 terpėje su 10 % FBS.

22. Teigiamam kontroliniam bandiniui rekomenduojama naudoti 4-NBB. 20 mg 4-NBB paruošiama 1,5 ml tūrio mikrocentrifugos mėgintuvėlyje, į kurį įpilama X-VIVO™ 15, kad susidarytų 1 ml tūris, tada tas mėgintuvėlis intensyviai sukamas ir purtomas rotoriumi maksimaliu 8 sūkių/min. greičiu bent 30 min. Po centrifugavimo 20000 *g* 5 minutes supernatantas 4 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15, ir 500 µl praskiesto supernatanto perkeliama į duobutę 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėje. Praskiestas supernatantas papildomai praskiedžiamas X-VIVO™ 152 ir 4 kartus, ir 50 µl šio tirpalo įpilama kartu su 50 µl THP-G8 ląstelių suspensijos į duobutes 96 duobučių plokščiadugnėje juodoje plokštelėje (3.6 priedėlis). Kiekvienos koncentracijos teigiamam kontroliniam bandiniui turėtų būti skirtos 4 duobutės. Plokštelė supurtoma ant plokštelių purtyklės, tada inkubuojama CO_2 inkubatoriuje 16 valandų (37 °C, 5 % CO_2) ir po to matuojamas liuciferazės aktyvumas, kaip aprašyta 29 punkte.

23. Neigiamam kontroliniam bandiniui rekomenduojama naudoti pieno rūgštį. 20 mg pieno rūgšties paruošiama 1,5 ml tūrio mikrocentrifugos mėgintuvėlyje, į kurį įpilama X-VIVO™ 15, kad susidarytų 1 ml tūris (20 mg/ml). 20 mg/ml pieno rūgšties tirpalas 5 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15 (iki 4 mg/ml); 500 µl šio 4 mg/ml pieno rūgšties tirpalo perkeliama į duobutę 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėje. Šis tirpalas 2 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15, tada vėl 2 kartus praskiedžiamas, gaunant 2 mg/ml ir 1 mg/ml tirpalus. 50 µl šių 3 tirpalų ir nešiklio kontrolinio bandinio (X-VIVO™ 15) dedama kartu su 50 µl THP-G8 ląstelių suspensijos į duobutes 96 duobučių plokščiadugnėje juodoje plokštelėje. Kiekvienos koncentracijos neigiamam kontroliniam bandiniui skiriamos 4 duobutės. Plokštelė supurtoma ant plokštelių purtyklės, tada inkubuojama CO_2 inkubatoriuje 16 valandų (37 °C, 5 % CO_2) ir po to matuojamas liuciferazės aktyvumas, kaip aprašyta 29 punkte.

24. Galima naudoti ir kitokius tinkamus teigiamus arba neigiamus kontrolinius bandinius, jei yra ankstesnių duomenų, iš kurių būtų galima nustatyti panašius bandymo eigos priimtinumo kriterijus.

25. Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad būtų išvengta lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų garavimo ir kryžminio užteršimo bandomosiomis cheminėmis medžiagomis tarp duobučių, pvz., sandariai uždengiant plokštelę, prieš ją inkubuojant su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis.

26. Siekiant gauti teigiamą arba neigiamą prognozę reikia atlikti 2–4 bandymo ciklus naudojant bandomąsias chemines medžiagas ir tirpiklio kontrolinį bandinį (žr. 2 lentelę). Kiekvienas ciklas atliekamas vis kitą dieną, naudojant naują bandomųjų cheminių medžiagų pradinį tirpalą X-VIVO™ 15 terpėje ir atskirai surinktas ląsteles. Ląstelės gali būti to paties sėjimo.

Liuciferazės aktyvumo matavimai

27. Liuminescencija matuojama naudojant 96 duobučių mikrotitravimo plokštelės liuminometrą su optiniais filtrais, pvz., „Phelios“ (gamintojas ATTO, Tokijas, Japonija), „Tristan 941“ („Berthold“, Bad Vildbadas, Vokietija) ir ARVO serijos instrumentus („PerkinElmer“, Voltamas, Masačusetsas, JAV). Liuminometras turi būti kalibruojamas kiekvienam bandymui, kad būtų užtikrintas atkuriamumas (19). Šiam kalibravimui galima gauti rekombinantinių oranžinės ir raudonos spalvos šviesą skleidžiančių liuciferazių.

28. 100 µl pašildyto *Tripluc*® liuciferazės tyrimo reagento („Tripluc“) dedama į kiekvieną plokštelės duobutę, kurioje yra ląstelių suspensijos, apdorotos arba neapdorotos bandomąja chemine medžiaga. Plokštelė 10 min. purtoma aplinkos temperatūroje (apie 20 °C). Plokštelė dedama į liuminometrą ir matuojamas liuciferazės aktyvumas. Bioliuminescencija matuojama po 3 sekundes be optinio filtro (F0) ir su optiniu filtru (F1). Jei pasirenkami kitokie nuostačiai (pvz., priklausomai nuo naudojamo liuminometro modelio), reikėtų pateikti to pagrindimą.

29. Pagal išmatuotas vertes apskaičiuojami kiekvienos koncentracijos parametrai, pvz., IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA vidutinis ±SN (standartinis nuokrypis), GAPLA vidutinis ±SN, nIL8LA vidutinis ±SN, Ind-IL8LA vidutinis ±SN, Inh-GAPLA vidutinis ±SN ir Ind-IL8LA 95 % pasikliautinasis intervalas. Šiame punkte nurodytų parametrų apibrėžtys atitinkamai pateiktos 3.1 ir 3.4 priedėliuose.

30. Daugiaspalvių reporterinių genų tyrimų metu spalvų skyrimas prieš matavimą paprastai pasiekiamas naudojant detektorius (liuminometrą ir plokštelių skaitytuvą) su optiniais filtrais, tokiais kaip riboto pralaidumo filtrai, t. y. praleidžiantys tik ilgąsias bangas (LP filtrai) arba tik trumpąsias bangas (SP filtrai), arba juostiniai filtrai. Kiekvienos bioliuminescencijos signalinės spalvos šviesos pralaidumo per filtrus koeficientai turėtų būti prieš bandymą kalibruojami pagal 3.2 priedėlį.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų vertinimas

31. Pagal teigiamo arba neigiamo sprendimo priėmimo kriterijus privaloma, kad per kiekvieną bandymo ciklą:

— IL-8 Luc tyrimo prognozė būtų laikoma teigiama, jei bandomosios cheminės medžiagos Ind-IL8LA yra ≥1,4, o Ind-IL8LA 95 % pasikliautinojo intervalo žemesnioji riba ≥1,0;

— IL-8 Luc tyrimo prognozė būtų laikoma neigiama, jei bandomosios cheminės medžiagos Ind-IL8LA yra <1,4, o Ind-IL8LA 95 % pasikliautinojo intervalo žemesnioji riba <1,0.

Prognozavimo modelis

32. Kai per bandomųjų cheminių medžiagų 1, 2, 3 ir 4 bandymo ciklus gaunami du teigiami rezultatai, tokios medžiagos rezultatas pripažįstamas teigiamu, o kai per 1, 2, 3 ar 4 bandymo ciklą gaunami trys neigiami rezultatai, daroma prielaida, kad rezultatas yra neigiamas (2 lentelė). Iš tų cheminių medžiagų, dėl kurių daroma prielaida, kad rezultatas yra neigiamas, tų cheminių medžiagų, kurios ištirpsta 20 mg/ml X-VIVO™ 15, rezultatai laikomi neigiamais, o į tas medžiagas, kurios neištirpsta 20 mg/ml X-VIVO™ 15, neturėtų būti atsižvelgiama (1 diagrama).

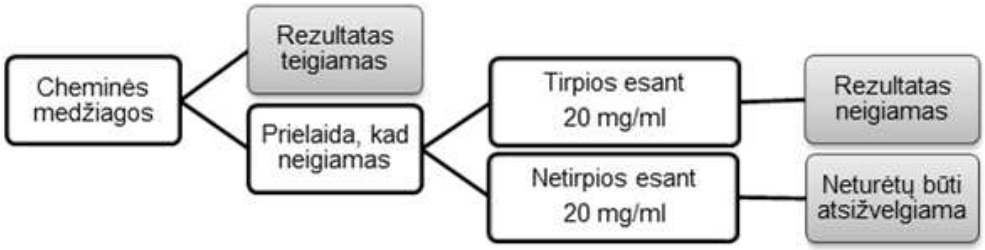
2 lentelė.

Kriterijai, pagal kuriuos nustatomi teigiami rezultatai ir daroma prielaida dėl neigiamų rezultatų

1 ciklas	2 ciklas	3 ciklas	4 ciklas	Galutinė prognozė
Teigiamas	Teigiamas	–	–	Teigiamas
	Neigiamas	Teigiamas	–	Teigiamas
		Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas
			Neigiamas	Prielaida, kad neigiamas
Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas	–	Teigiamas
		Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas
			Neigiamas	Prielaida, kad neigiamas
	Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas	Teigiamas
			Neigiamas	Prielaida, kad neigiamas
		Neigiamas	–	Prielaida, kad neigiamas

1 diagrama.

Prognozavimo modelis priimant galutinį sprendimą



Priimtinumo kriterijai

33. Atliekant IL-8 Luc tyrimą turėtų būti tenkinami šie priimtinumo kriterijai:

— bent vienos koncentracijos teigiamo kontrolinio bandinio su 4-NBB per kiekvieną bandymo ciklą Ind-IL8LA turėtų būti daugiau kaip 5,0;

— bet kurios koncentracijos neigiamo kontrolinio bandinio su pieno rūgštimi Ind-IL8LA per kiekvieną bandymo ciklą turėtų nesiekti 1,4;

— duomenis, gautus iš plokštelių, kurių kontrolinių bandinių duobutėse su ląstelėmis ir „Tripluc“, bet be cheminių medžiagų, GAPLA mažiau nei 5 kartus viršija GAPLA toje duobutėje, kurioje yra tik bandymo terpė (į duobutę dėta po 50 µl RPMI-1640 su 10 % FBS ir 50 µl X-VIVO™ 15), reikėtų atmesti;

— duomenis, gautus iš plokštelių, kuriose visų bandomųjų ar kontrolinių cheminių medžiagų koncentracijų Inh-GAPLA nesiekia 0,05, reikėtų atmesti. Šiuo atveju reikėtų kartoti pirmąjį bandymą, taigi per pakartotinį bandymą naudojama didžiausia galutinė koncentracija yra ta, kuri buvo mažiausia galutinė koncentracija per pirmesnį bandymą.

Bandymo ataskaita

34. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomosios cheminės medžiagos

Vienkomponentė medžiaga:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, molekulinė masė ir svarbios papildomos fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— tirpumas X-VIVO™ 15. Kai cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 – ar po centrifugavimo pastebima nuosėdų arba plūduriuojančių dalelių;

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, jei nenaudota X-VIVO™ 15.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis apibūdinimas, pvz., cheminė tapatybė (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinė sudėtis ir svarbios fizikinės ir cheminės savybės (žr. pirmiau), būdingos sudedamosioms dalims (tiek, kiek žinoma);

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir svarbios papildomos fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

— molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai yra žinomos sudėties mišiniai ar polimerai, arba kita šiam tyrimui svarbi informacija;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— tirpumas X-VIVO™ 15. Kai cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 – ar po centrifugavimo pastebima nuosėdų arba plūduriuojančių dalelių;

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, jei nenaudota X-VIVO™ 15.

Kontroliniai bandiniai

Teigiamas kontrolinis bandinys:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma, ir kai tinka);

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— nuoroda į ankstesnius teigiamus kontrolinių bandinių rezultatus, iš kurių nustatyti tinkami priimtinumo kriterijai (jei tinka).

Neigiamas kontrolinis bandinys:

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai) ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;

— fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma) tuo atveju, jei naudojami ne tie, kurie nurodyti bandymo gairėse, o kiti neigiami kontroliniai bandiniai;

— laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

— pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Bandymo sąlygos

— Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

— naudoto bandymo aprašymas;

— naudojama ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įstaiga, iš kurios ji gauta);

— FBS partijos numeris ir kilmė, tiekėjo pavadinimas, 96 duobučių plokščiadugnės juodos mikrotitravimo plokštelės partijos numeris ir „Tripluc“ reagento partijos numeris;

— sėjimų skaičius ir ląstelių tankis, naudotas per bandymą;

— ląstelių skaičiavimo metodas, naudotas sėjant ląsteles prieš bandymą, ir priemonės, kuriomis užtikrintas tolygus ląstelių skaičiaus paskirstymas;

— naudotas liuminometras (pvz., modelis), įskaitant instrumento nuostačius, naudotas liuciferazės substratas ir parodyti tinkami liuminescencijos matavimai remiantis 3.2 priedėlyje aprašytu kontroliniu bandymu;

— procedūra, pagal kurią įrodyta laboratorijos kvalifikacija atlikti šį bandymą (pvz., atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus) arba įrodytas šio bandymo atlikimo atkuriamumas laikui bėgant.

Bandymo procedūra

— Kartotinių bandinių ir atliktų bandymo ciklų skaičius;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės, įterpimo procedūra ir veikimo trukmė (jei skiriasi nuo rekomenduojamos);

— atliekant vertinimą ir priimant sprendimą taikytų kriterijų aprašymas;

— taikytų tyrimo priimtinumo kriterijų aprašymas;

— bet kokių bandymo procedūros keitimų aprašymas.

Rezultatai

— IL8LA ir GAPLA matavimai;

— nIL8LA, Ind-IL8LA ir Inh-GAPLA skaičiavimai;

— Ind-IL8LA 95 % pasikliautinasis intervalas;

— diagrama, kurioje parodytos dozės ir atsako kreivės vertinant liuciferazės aktyvumo indukciją ir gyvybingumą;

— bet kokių kitų svarbių stebėjimų aprašymas (jei tinka).

Rezultatų aptarimas

— Atliekant IL-8 Luc tyrimą gautų rezultatų aptarimas;

— tyrimo rezultatų apsvarstymas atsižvelgiant į IATA sistemą, jei turima ir kitos svarbios informacijos.

Išvada

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. Paskelbta 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. Paskelbta 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. Paskelbta http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) Van der Veen J. W., 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 P. S., 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 D. A., Asturiol D., Roberts D. W., 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 D. S. (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 V. R., Bechara E. J., 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). (dar nepaskelbta) 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. Paskelbta http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). *IL-8 Luc assay protocol*. Paskelbta http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K., Ichino Y., Kumata S., Nakajima Y., Hiraishi Y., Kato D., Viviani V. R., 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. Paskelbta http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

3.1. priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Tikslumas– bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tai yra bandymo atlikimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Šis terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (16).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway, AOP)*– įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupės cheminės struktūros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (20).

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

CV05 l– ąstelių gyvybingumo lygis 05, t. y. mažiausia koncentracija, kuriai esant cheminių medžiagų Inh-GAPLA nesiekia 0,05.

FInSLO-LA– IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti Ind-IL8LA. Žr. Ind-IL8LA apibrėžtį.

GAPLA– stabiliosios raudonos liuciferazės (SLR) geno liuciferazės aktyvumas (λ*max* = 630 nm), reguliuojamas GAPDH promotoriaus, parodo ląstelių gyvybingumą ir gyvybingų ląstelių skaičių.

Pavojus– būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

IATA (integruotasis bandymo ir vertinimo metodas, angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment)*– struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui nustatyti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (dėl galimo pavojaus ar veikimo gebos ir paveikimo ta medžiaga). Jį taikant strategiškai apibendrinami ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima ta informacija pagrįsti reglamentavimo sprendimą dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomus tikslinius, taigi minimalius bandymus.

II-SLR-LA– IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti Inh-GAPLA. Žr. Inh-GAPLA apibrėžtį.

IL-8 (interleukinas-8)– citokinas, gaunamas iš endotelio ląstelių, fibroblastų, keratinocitų, makrofagų ir monocitų, sukeliantis neutrofilų ir T ląstelių limfocitų chemotaksį.

IL8LA– stabiliosios oranžinės liuciferazės (SLO) geno liuciferazės aktyvumas (λ*max* = 580 nm), reguliuojamas IL-8 promotoriaus.

Ind-IL8LA– nIL8LA indukcijos padidėjimas (kiek kartų). Gaunamas dalijant cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių nIL8LA iš nestimuliuotų THP-G8 ląstelių nIL8LA ir atitinka IL-8 promotoriaus aktyvumo indukciją cheminėmis medžiagomis.

Inh-GAPLA– GAPLA slopinimas. Gaunamas dalijant cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA iš nepaveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA ir parodo cheminių medžiagų citotoksiškumą.

Minimali indukcijos riba (angl. *minimum induction threshold,* MIT)– mažiausia koncentracija, kuriai esant cheminė medžiaga atitinka teigiamo rezultato kriterijus.

Mišinys– iš dviejų ar daugiau medžiagų sudarytas mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga– medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga– medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje daugiau kaip vieno iš pagrindinių komponentų koncentracija yra ≥10 % (masės) ir <80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Daugiakomponentė medžiaga nuo mišinio skiriasi tuo, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi arba daugiau medžiagų, tarp kurių cheminė reakcija nevyksta. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

nIL8LA– SLO liuciferazės aktyvumas, atitinkantis IL-8 promotoriaus veikimą (IL8LA), normalizuotas pagal SLR liuciferazės aktyvumą, atitinkantį GAPDH promotoriaus veikimą (GAPLA). Jis parodo IL-8 promotoriaus veikimą, nustatytą atsižvelgus į ląstelių gyvybingumą arba ląstelių skaičių.

nSLO-LA– IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti nIL8LA. Žr. nIL8LA apibrėžtį.

Teigiamas kontrolinis bandinys– kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, apdorotas tam tikra medžiaga, kuri, kaip žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti, kad būtų galima vertinti teigiamo kontrolinio bandinio atsako kintamumą laikui bėgant, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Prehaptenai– cheminės medžiagos, kurios tampa jautrinančios po abiotinio virsmo.

Prohaptenai– cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, kad pasireikštų jų odos jautrinimo geba.

Tinkamumas– ryšio tarp bandymo ir tiriamo poveikio, taip pat bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas apima bandymo tikslumo (atitikties) aspektą (16).

Patikimumas– pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo atkuriamumo laboratorijose ir tarp laboratorijų, laikui bėgant, matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (16).

Bandymo ciklas– vienos ar daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas kartu naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį ir teigiamą kontrolinį bandinį.

Jautris– visų teigiamų (veikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (16).

SLO-LA– IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti IL8LA. Žr. IL8LA apibrėžtį.

SLR-LA– IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti GAPLA. Žr. GAPLA apibrėžtį.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys– neapdorotas bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, išskyrus bandomąją cheminę medžiagą, tačiau įskaitant naudojamą tirpiklį ar nešiklį. Jis naudojamas nustatant bazinį atsaką bandiniuose, apdorotuose bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta ar stabiliai disperguota tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai šis bandinys naudojamas bandymui kartu su terpės kontroliniu bandiniu, jis taip pat parodo, ar tirpiklis arba nešiklis veikia bandymo sistemą.

Specifiškumas– visų neigiamų (neveikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (16).

Medžiaga– gamtoje randami ar bet kokio gamybos proceso metu gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, įskaitant visus priedus, reikalingus produkto stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias dėl gamybos proceso, tačiau išskyrus tirpiklius, kuriuos galima atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ar nekeičiant jos sudėties.

Paviršinio aktyvumo medžiaga (taip pat vadinama aktyviąja paviršiaus medžiaga)– medžiaga, pvz., ploviklis, gebanti sumažinti skysčio paviršiaus įtemptį, kad jis galėtų putoti ar prasiskverbti į kietąsias medžiagas; be to, ji žinoma kaip drėkiklis. (TG437)

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

THP-G8– IL-8 reporterinių ląstelių linija, naudojama atliekant IL-8 Luc tyrimą. Žmogaus makrofagų tipo ląstelių linija THP-1 buvo transfekuota SLO ir SLR liuciferazės genais, atitinkamai kontroliuojamais IL-8 ir GAPDH promotorių.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS)– sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir lygius, ir naudojami atitinkami informaciniai elementai, tokie kaip piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų perduota informacija apie jų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbdavius, darbuotojus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likviduotojus) ir aplinką (21).

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas– bandymas, laikomas pakankamai tinkamu ir patikimu konkrečiam tikslui pasiekti ir pagrįstas moksliškai patikimais principais.

Bandymas niekada nėra absoliučiai tinkamas– jis yra tinkamas tik tam tikram tikslui pasiekti.

3.2. priedėlis

LIUCIFERAZĖS AKTYVUMO MATAVIMO PRINCIPAS IR OPTINIO FILTRO PRALAIDUMO SLO IR SLR KOEFICIENTŲ NUSTATYMAS

„Daugiareporterinių“ tyrimų sistema „Tripluc“ (angl. *MultiReporter Assay System -Tripluc-*) gali būti naudojama su mikroplokštelių tipo liuminometru su daugiaspalvio aptikimo sistema, kurioje galima naudoti optinį filtrą (pvz., *Phelios* AB-2350 (gamintojas ATTO), ARVO („PerkinElmer“), *Tristar* LB941 („Berthold“)). Matavimui naudojamas optinis filtras yra 600–620 nm tik ilgąsias bangas praleidžiantis (LP) ar tik trumpąsias bangas praleidžiantis (SP) filtras arba 600–700 nm juostinis filtras.

Dvispalvių liuciferazių matavimas optiniu filtru

Tai pavyzdys, kaip gali būti naudojamas *Phelios* AB-2350 (ATTO). Šis liuminometras yra su 600 nm tik ilgąsias bangas praleidžiančiu (LP) filtru (R60 HOYA Co., 600 nm LP, 1 filtras), kuriuo išskaidoma SLO (λmax = 580 nm) ir SLR (λmax = 630 nm) liuminescencija.

Siekiant nustatyti 600 nm LP filtro pralaidumo koeficientus, visų pirma, naudojant išgrynintus SLO ir SLR liuciferazės fermentus, matuojamas i) SLO ir SLR bioliuminescencijos intensyvumas be filtro (F0), ii) SLO ir SLR bioliuminescencijos, praleistos per 600 nm LP filtrą (1 filtrą), intensyvumas ir iii) apskaičiuojami 600 nm LP filtro pralaidumo SLO ir SLR koeficientai, išvardyti toliau.

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

SLO ir SLR intensyvumą bandinyje atitinkamai žymint O ir R, i) skleidžiamos šviesos intensyvumas be filtro (vien optiškai) F0 ir ii) šviesos intensyvumas ją praleidus per 600 nm LP filtrą (1 filtras) F1 apskaičiuojami taip, kaip parodyta toliau.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Šias formules galima išreikšti taip:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Tada, naudodami apskaičiuotus pralaidumo koeficientus (κO_{R60} ir κR_{R60}) ir išmatuotus F0 ir F1, galite O ir R vertes apskaičiuoti taip:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Nustatant pralaidumo koeficientą naudojamos medžiagos ir metodai

1) *Reagentai*

Atskiri išgryninti liuciferazės fermentai:

liofilizuotas išgrynintas SLO fermentas,

liofilizuotas išgrynintas SLR fermentas

(kurie, atliekant šio bandymo tinkamumo patvirtinimo darbą, buvo gauti iš Totoryje (Japonija) esančios laboratorijos „GPC Lab. Co. Ltd." kartu su THP-G8 ląstelių linija)

Tyrimo reagentas:

Tripluc® liuciferazės tyrimo reagentas (pvz., iš gamintojo TOYOBO, Cat#MRA-301)

Terpė: skirta liuciferazės tyrimui atlikti (30 ml, laikoma 2–8 °C temperatūroje)

Reagentas	Konc.	Galutinė konc. terpėje	Reikiamas kiekis
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) *Fermento tirpalo ruošimas*

Liofilizuotas išgrynintas liuciferazės fermentas ištirpinamas mėgintuvėlyje, įpilant 200 µl 10–100 mM Tris/HCl ar Hepes/HCl buferio (pH 7,5–8,0), į kurį papildomai dėta 10 % (m/V) glicerolio, tada fermento tirpalas padalijamas į 10 µl alikvotines dalis 1,5 ml vienkartiniuose mėgintuvėliuose, kurie laikomi šaldiklyje −80 °C temperatūroje. Užšaldytą fermento tirpalą galima naudoti iki 6 mėnesių. Jį naudojant įpilama 1 ml liuciferazės tyrimui skirtos terpės (RPMI-1640 su 10 % FBS) į kiekvieną iš mėgintuvėlių, kuriuose yra fermento tirpalai (gaunamas praskiestas fermento tirpalas), ir jie laikomi ant ledo, kad neprarastų aktyvumo.

3) *Bioliuminescencijos matavimas*

Tripluc® liuciferazės tyrimo regentas („Tripluc") atitirpinamas ir laikomas kambario temperatūroje – vandens vonelėje arba aplinkos oro temperatūroje. Liuminometras įjungiamas 30 min. prieš pradedant matavimą, kad fotodaugintuvas stabilizuotųsi. 100 µl praskiesto fermento tirpalo perkeliama į juodos spalvos 96 duobučių (plokščiadugnę) mikrotitravimo plokštelę (SLO etaloninis bandinys į #B1, #B2, #B3 duobutes, SLR etaloninis bandinys į #D1, #D2, #D3 duobutes). Tada, naudojant automatinį dozatorių („pipetmaną"), po 100 µl pašildyto „Tripluc" įpilama į kiekvieną plokštelės duobutę, kurioje yra praskiesto fermento tirpalo. Plokštelė 10 min. purtoma kambario temperatūroje (apie 25 °C) naudojant plokštelių purtyklę. Jei duobutėse susidaro tirpalo burbulų, juos reikia pašalinti. Plokštelė dedama į liuminometrą ir matuojamas liuciferazės aktyvumas. Bioliuminescencija matuojama po 3 sekundes be optinio filtro (F0) ir su optiniu filtru (F1).

Optinio filtro pralaidumo koeficientas apskaičiuotas taip:

Pralaidumo koeficientas (SLO (κO_{R60})) = (F1 #B1 + F1 #B2 + F1 #B3) / (F0 #B1 + F0 #B2 + F0 #B3)

Pralaidumo koeficientas (SLR (κR_{R60})) = (F1 #D1 + F1 #D2 + F1 #D3) / (F0 #D1 + F0 #D2 + F0 #D3)

Apskaičiuoti pralaidumo koeficientai naudojami per visus matavimus, atliekamus naudojant tą patį liuminometrą.

Įrangos kokybės kontrolė

Turėtų būti atliekamos IL-8 Luc bandymo protokole aprašytos procedūros (18).

3.3. priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Prieš pradėdamos įprastu būdu atlikti bandymą, aprašytą šiame priedėlyje, pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos numatomą IL-8 Luc tyrimo prognozę dėl 9 medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje, ir gaudamos vertes, patenkančias į atitinkamą etaloninį intervalą, dėl bent 8 iš 9 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų (kurios pasirinktos siekiant aprėpti odos jautrinimo pavojams būdingų atsakų spektrą). Kiti jų atrankos kriterijai buvo tokie, kad tų medžiagų būtų galima įsigyti iš komercinių tiekėjų ir kad būtų galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* duomenų, nustatytų atliekant IL-8 Luc tyrimą. Taip pat yra paskelbti IL-8 Luc tyrimo atlikimo etaloniniai duomenys (6) (1).

1 lentelė.

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti dėl IL-8 Luc tyrimo

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Būsena	Tirpumas 20 mg/ml X-VIVO15	Prognozė *in vivo* (1)	IL-8 Luc prognozė (2)	Etaloninis intervalas (μg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-dinitrochlorbenzenas	97-00-7	Kietoji medžiaga	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	Teigiama	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehidas	50-00-0	Skystis	Tirpus	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	Teigiama	9–30	4–9
2-merkaptobenztiazolas	149-30-4	Kietoji medžiaga	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Teigiama	250–290	60–250
Etilendiaminas	107-15-3	Skystis	Tirpus	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Teigiama	500–700	0,1–0,4
Etilenglikolio dimetakrilatas	97-90-5	Skystis	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	>2000	0,04–0,1
4-alilanizolas (estragolas)	140-67-0	Skystis	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	>2000	0,01–0,07
Streptomicino sulfatas	3810-74-0	Kietoji medžiaga	Tirpus	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	>2000	>2000
Glicerolis	56-81-5	Skystis	Tirpus	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	>2000	>2000
Izopropilo alkoholis	67-63-0	Skystis	Tirpus	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	>2000	>2000

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.
(1) Veikimo *in vivo* geba gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (19).
(2) Pagrįsta anksčiau nustatytomis vertėmis (1) (6).
(3) CV_{05} ir IL-8 liuciferazės minimalios indukcijos ribos (MIT) apskaičiuotos naudojant vandens tirpumo vertę, pateiktą *EPI Suite*™.
(4) CV_{05} – mažiausia koncentracija, kuriai esant cheminių medžiagų Inh-GAPLA nesiekia 0,05.
(5) MIT – mažiausios koncentracijos, kurioms esant cheminė medžiaga atitinka teigiamo rezultato kriterijus.

3.4. priedėlis

INDEKSAI IR SPRENDIMO PRIĖMIMO KRITERIJAI

nIL8LA (nSLO-LA)

Dėl IL8LA (SLO-LA) ir dėl GAPLA (SLR-LA) atitinkamai matuojamas *i* koncentracijos vertės (i = 0–11) pasikartojimas *j* kartų (j = 1–4). Normalizuotas IL8LA, žymimas kaip nIL8LA (nSLO-LA), apibrėžiamas taip:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Tai yra pagrindinis matavimo vienetas atliekant šį tyrimą.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Tai, kiek kartų padidėja vidutinis nIL8LA (nSLO-LA), kartojantis *i* koncentracijai, palyginti su jo verte esant 0 koncentracijai, yra pagrindinis šio tyrimo matas (Ind-IL8LA). Šis santykis apibūdinamas tokia formule:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}\}$$

Pagrindinė laboratorija pasiūlė, kad bandomosios cheminės medžiagos teigiamu rezultatu būtų laikoma vertė 1,4. Ši vertė pagrįsta tos pagrindinės laboratorijos ankstesnių duomenų tyrimu. Tada duomenų tvarkymo grupė naudojo šią vertę visuose tinkamumo patvirtinimo tyrimo etapuose. Pagrindinis rezultatas, Ind-IL8LA, yra 2 aritmetinių vidurkių santykis, kaip parodyta lygtyje.

95 % pasikliautinasis intervalas (95 % PI)

Pagal šį santykį galima apskaičiuoti 95 % pasikliautinąjį intervalą (95 % PI) siekiant parodyti šio pagrindinio rezultato mato tikslumą. Apatinė 95 % PI riba ≥1 reiškia, kad nIL8LA, esant *i* koncentracijai, yra kur kas didesnis negu tirpiklio kontrolinio bandinio. 95 % PI galima nustatyti keliais būdais. Atlikdami šį tyrimą taikėme metodą, vadinamą Fieller'io teorema. Ši 95 % pasikliautinojo intervalo teorema gauta pagal tokią formulę:

$$[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}],$$

kurioje:

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

yra centrinio t skirstinio 97,5 procentilis, esant laisvės laipsniui ν, kai:

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA yra vidutinio GAPLA (SLR-LA), gauto kartojantis *i* koncentracijai, santykis, gautas palyginus su atitinkama tirpiklio kontrolinio bandinio verte, išreikštas formule

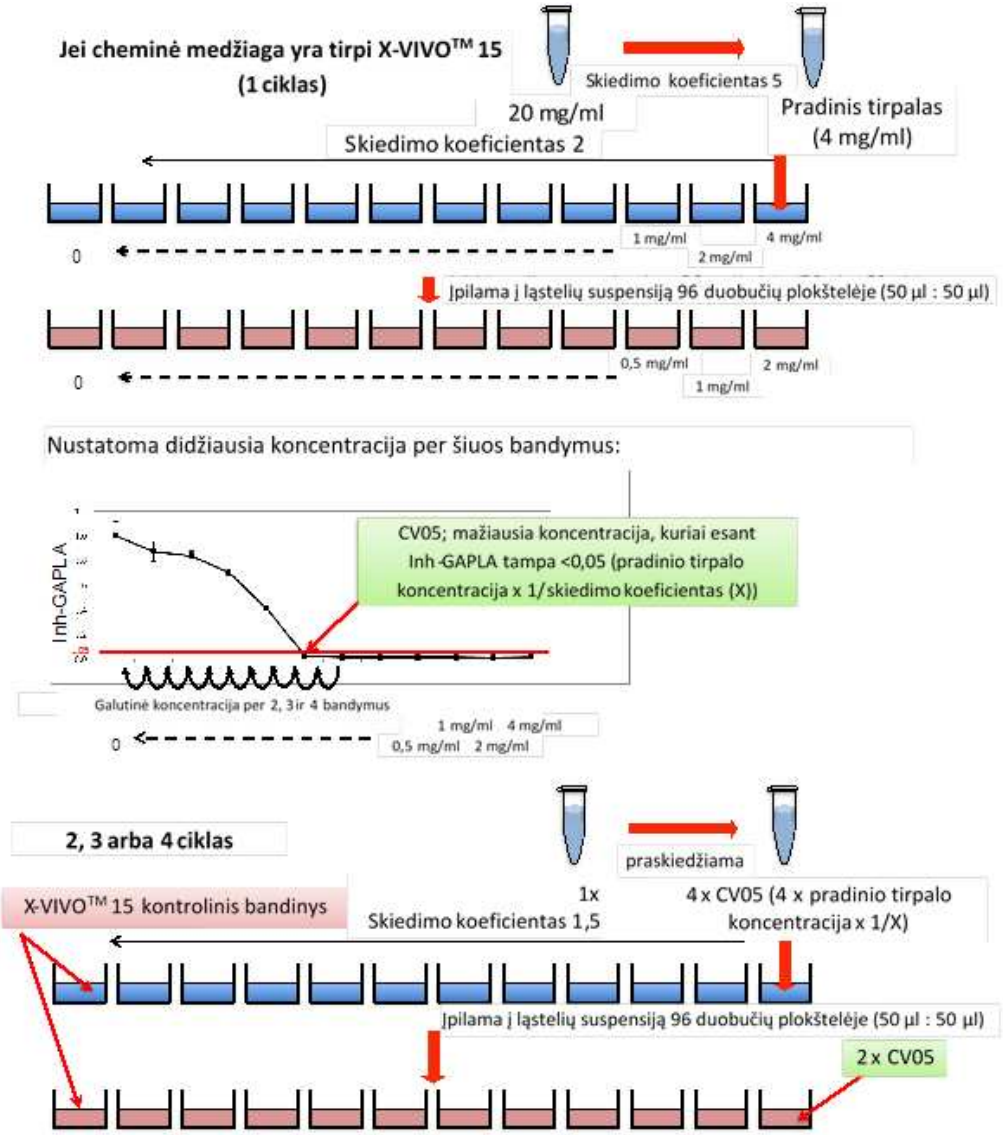
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Kadangi GAPLA yra nIL8LA vardiklis, labai maža jo vertė lemia didelį nIL8LA pokytį. Todėl, esant labai mažai (mažesnei nei 0,05) Inh-GAPLA vertei, Ind-IL8LA vertės gali būti laikomos nepakankamai tiksliomis.

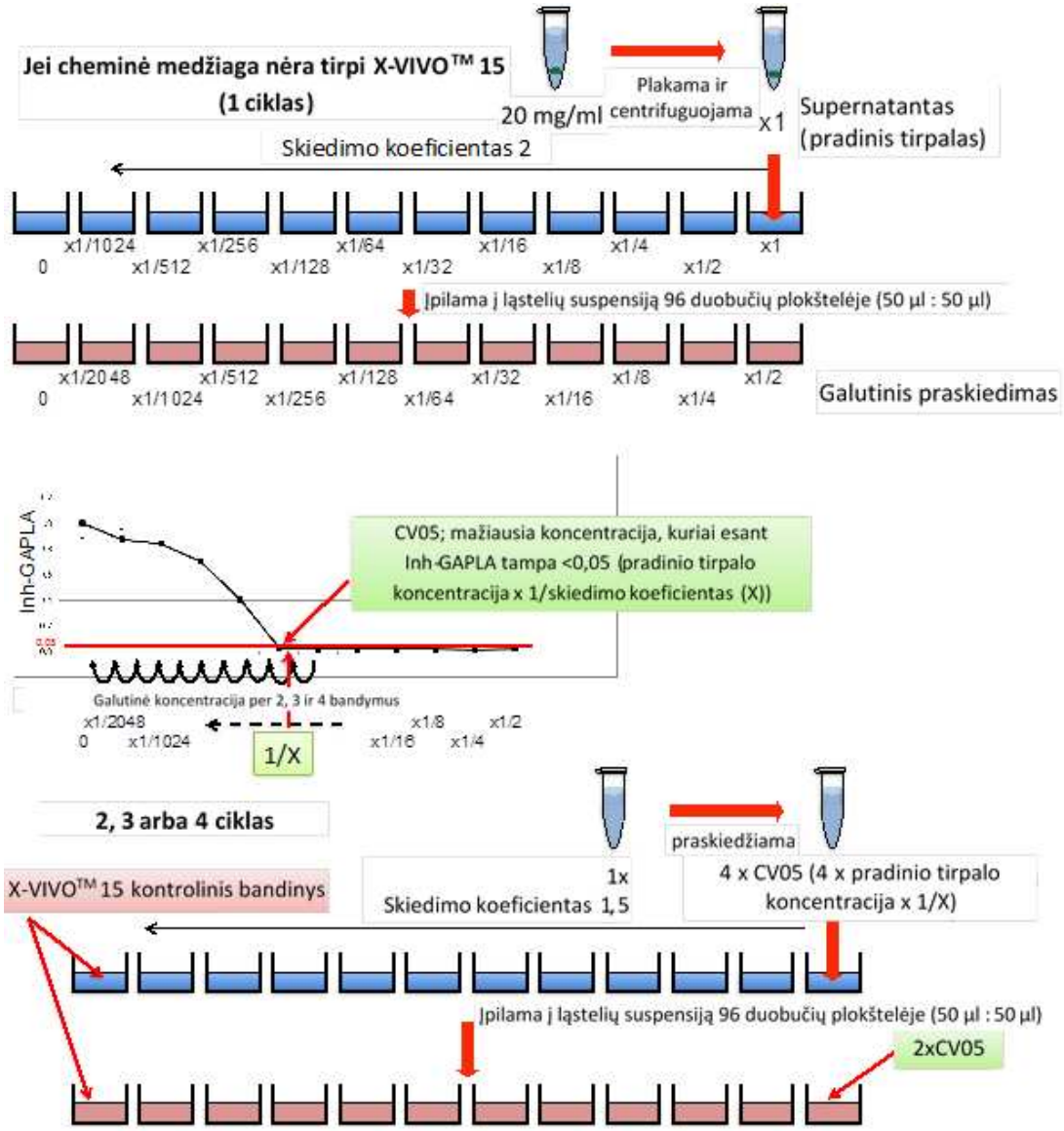
3.5. priedėlis

METODŲ, PAGAL KURIUOS IŠTIRPINAMOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS ATLIEKANT IL-8 LUC TYRIMĄ, TAIKYMO SCHEMA

a) Kai cheminės medžiagos ištirpsta X-VIVO™ 15 esant 20 mg/ml koncentracijai

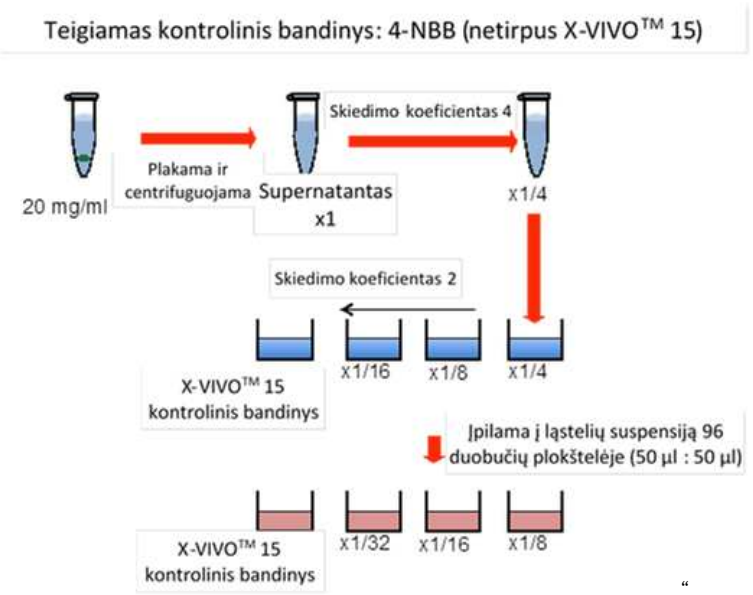


b) Kai cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 esant 20 mg/ml koncentracijai



3.6. priedėlis

METODO, PAGAL KURĮ IŠTIRPINAMAS 4-NBB, NAUDOJAMAS TEIGIAMAM KONTROLINIAM BANDINIUI PER IL-8 LUC TYRIMĄ, SCHEMA



“

9) C dalis papildoma šiais skyriais:

„C.52 **C.52 IŠPLĖSTINIS MEDAKŲ (*ORYZIAS LATIPES*) VIENOS KARTOS REPRODUKCIJOS BANDYMAS (MEOGRT)**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 240 (2015). Išplėstinis medakų vienos kartos bandymas (MEOGRT) – kompleksinis bandymo metodas, pagal kurį, veikiant bandomąja medžiaga kelias žuvų kartas, gaunami duomenys, svarbūs cheminių medžiagų, įskaitant įtariamas endokrininę sistemą galinčias ardyti chemines medžiagas, ekologinių pavojų ir rizikos vertinimui. Atliekant MEOGRT bandymą, bandomosios medžiagos ekspozicija trunka iki antros (F2) kartos išsiritimo (iki dviejų savaičių po apvaisinimo). Norint pagrįsti, kad būtų naudinga pratęsti F2 kartos tyrimą ir po išsiritimo, reikėtų atlikti papildomus tyrimus; kol kas nėra pakankamai informacijos, kad būtų galima nustatyti reikiamas sąlygas ar kriterijus F2 kartos bandymo pratęsimui pagrįsti. Vis dėlto šis bandymo metodas gali būti atnaujinamas, atsižvelgiant į naują informaciją ir duomenis. Pavyzdžiui, gairės dėl F2 kartos tyrimo pratęsimo iki reprodukcijos galėtų būti naudingos tam tikromis aplinkybėmis (pvz., kai cheminių medžiagų biokoncentracijos geba yra didelė arba turima žinių apie poveikį kelioms kartoms tiriant kitus taksonus). Šis bandymo metodas gali būti naudojamas vertinant cheminių medžiagų, įskaitant endokrininę sistemą galimai ardančias chemines medžiagas, galimą lėtinį poveikį žuvims. Pagal šį metodą pagrindinis dėmesys skiriamas galimam reikšmingam poveikiui populiacijai (tai yra neigiamas poveikis išgyvenamumui, vystymuisi, augimui ir reprodukcijai), apskaičiuojant nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) arba poveikio koncentraciją (ECx), nors reikėtų pažymėti, kad ECx metodai retai tinka šio pobūdžio didelio masto tyrimams, kai didinti bandomųjų koncentracijų skaičių, siekiant nustatyti norimą ECx vertę, gali būti nepraktiška ir kartu gali kilti reikšmingų gyvūnų gerovės problemų dėl didelio naudojamų gyvūnų skaičiaus. Kai nereikia vertinti cheminių medžiagų poveikio kelioms kartoms arba cheminės medžiagos nėra endokrininę sistemą galinčios ardyti medžiagos, gali būti tinkamesni kiti bandymų metodai (1). Japoninė medaka (*Oryzias latipes*) yra pagal šį bandymo metodą naudoti tinkama rūšis, nes jos gyvenimo ciklas yra trumpas ir galima nustatyti jos genetinę lytį (2), kuri pagal šį bandymo metodą laikoma esminės svarbos dalyku. Šio metodo aprašyme išdėstyti konkretūs metodai ir stebimos vertinamosios baigtys tinka tik japoninei medakai. Kitoms smulkių žuvų rūšims (pvz., zebrinei danijai) gali būti pritaikytas panašus bandymo protokolas.

2. Pagal šį bandymo metodą matuojamos kelios biologinės vertinamosios baigtys. Pagrindinis dėmesys skiriamas galimam neigiamam poveikiui reikšmingiems populiacijos parametrams, įskaitant išgyvenamumą, bendrą vystymąsi, augimą ir reprodukciją. Antra, siekiant pateikti informacijos apie susijusius mechanizmus ir nustatyti sąsają su rezultatais, gautais atlikus kitokius lauko ir laboratorinius tyrimus, kai iš patirties (*a posteriori*) turima įrodymų, kad cheminė medžiaga gali turėti endokrininę sistemą ardantį poveikį (pvz., androgeninis ar estrogeninis veikimas, nustatytas kitais bandymais ir tyrimais), kitos naudingos informacijos gaunama matuojant *vitelogenino* (*vtg*) mRNR (arba vitelogenino baltymo, VTG) kiekius, fenotipinius antrinius lytinius požymius, susijusius su genetine lytimi, ir vertinant histopatologiją. Pažymėtina, kad jei nekyla įtarimų, kad bandomoji cheminė medžiaga arba jos metabolitai gali būti endokrininę sistemą ardančios medžiagos, gali nereikėti matuoti šių antrinių vertinamųjų baigčių ir gali būti tinkamesni tokie tyrimai, kuriems reikia mažiau išteklių ir mažiau intensyvių bandymų su gyvūnais (1). Pagal šį bandymo metodą vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

3. Dėl riboto cheminių medžiagų, kurių bandymai atlikti, ir patvirtinant šio gana sudėtingo tyrimo tinkamumą dalyvavusių laboratorijų skaičiaus numatoma, kad kai jau bus atlikta pakankamai tyrimų, kad būtų galima nustatyti šio naujo tyrimo plano poveikį, šis bandymo metodas bus peržiūrėtas ir, jei reikės, pakeistas atsižvelgiant į įgytą patirtį. Jo duomenys gali būti naudojami 5-uoju lygmeniu (*Level 5*) pagal EBPO endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymų ir vertinimų konceptualiąją sistemą (3). Pagal šį bandymo metodą iš pradžių suaugusios (F0 kartos) žuvys yra veikiamos bandomąja chemine medžiaga reprodukcijos etape. Veikimas bandomąja medžiaga tęsiamas vystantis ir dauginantis F1 kartos žuvims ir iki F2 kartos išsiritimo iš ikrų; taigi, atliekant šį tyrimą galima vertinti ir struktūrinio, ir aktyvinamojo endokrininio poveikio kelius. Aiškinant su endokrinine sistema susijusias vertinamąsias baigtis galima taikyti įrodomosios duomenų galios nustatymo metodą.

4. Bandymui turėtų būti naudojamas pakankamas individų skaičius, kad būtų garantuotas pakankamas gebėjimas vertinti su reprodukcija susijusias vertinamąsias baigtis (žr. 3 priedėlį), kartu užtikrinant, kad naudojamų gyvūnų skaičius būtų minimalus (tik tiek, kiek būtina), dėl gyvūnų gerovės priežasčių. Kadangi naudojama daug bandomųjų gyvūnų, svarbu kruopščiai apsvarstyti, ar reikia atlikti šį bandymą, atsižvelgiant į esamus duomenis, kuriuose jau gali būti aktualios informacijos apie daugelį MEOGRT bandymo vertinamųjų baigčių. Šiuo atžvilgiu gali šiek tiek padėti EBPO toksiškumo žuvims bandymų programa (1).

5. Šis bandymo metodas sukurtas daugiausia tam, kad būtų galima nustatyti vienos cheminės medžiagos poveikį. Tačiau jei reikia atlikti mišinio bandymą, vertėtų apsvarstyti, ar taip gauti rezultatai bus tinkami naudoti numatomu reglamentavimo tikslu.

6. Prieš pradedant bandymą svarbu turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes, ypač kad būtų galima paruošti stabilius cheminių medžiagų tirpalus. Taip pat būtina taikyti pakankamai jautrų analizės metodą tikrinant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Bandymas pradedamas nuo to, kad lytiškai subrendę patinai ir patelės (kurių amžius yra bent 12 savaičių po apvaisinimo, toliau – s. p. a.), suskirstyti į veislines poras 3 savaites veikiami bandomąja chemine medžiaga; per tą laiką bandomoji cheminė medžiaga pagal jai būdingą toksikokinetinę elgseną pasiskirsto motininės kartos (F0) gyvūnų organizme. Ketvirtos savaitės pirmąją dieną arba kuo arčiau šios dienos surenkami žuvų ikrai, iš kurių įveisiama F1 karta. Auginant F1 kartos žuvis (iš viso 15 savaičių) vertinamas išsiritimas (angl. *hatchability*) ir išgyvenamumas. Be to, 9–10 s. p. a. žuvų ėminiai paimami vystymosi vertinamosioms baigtims tirti, o nerštas vertinamas tris savaites nuo 12 iki 14 s. p. a. F2 karta pradedama auginti po reprodukcijos vertinimo trečiosios savaitės ir auginama, iki baigia išsiristi iš ikrų.

BANDYMO TINKAMUMO KRITERIJAI

8. Taikomi šie bandymo tinkamumo kriterijai:

— vandenyje ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti ≥ 60 % oro soties vertės per visą bandymą;

— vidutinė vandens temperatūra per visą tyrimą turėtų būti nuo 24 iki 26 °C. Trumpi nukrypimai nuo šio vidurkio atskiruose akvariumuose neturėtų būti didesni nei 2 °C;

— kiekvienos kartos (F0 ir F1) kontrolinių grupių gyvūnų vidutinis vislumas turėtų būti didesnis nei 20 ikrų iš vienos poros per parą. Visų vertinimo metu gautų ikrų vaisingumas turėtų būti didesnis nei 80 %. Be to, 16 iš rekomenduojamų 24 kontrolinių veislinių porų (> 65 %) vislumas turėtų būti didesnis nei 20 ikrų iš vienos poros per parą;

— išsiritimas iš ikrų (vidutinis) turėtų būti ≥ 80 % kontrolinėse (ir F1, ir F2 kartos) grupėse;

— išgyvenamumas po išsiritimo iki 3 s. p. a. ir nuo 3 s. p. a. iki F1 kartos likvidavimo (t. y. 15 s. p. a.) kontrolinėse grupėse (F1) turėtų būti atitinkamai ≥ 80 % (vidutinis) ir ≥ 90 % (vidutinis);

— turėtų būti gauta įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai palaikomos vidutinių išmatuotų verčių ±20 % tikslumu.

Nors vandens temperatūra nėra vienas iš tinkamumo kriterijų, tos pačios bandomosios grupės kartotiniai bandiniai neturėtų būti šiuo atžvilgiu statistiškai skirtingi vienas nuo kito, o bandomosios grupės atliekant bandymą neturėtų būti statistiškai skirtingos viena nuo kitos (remiantis kasdieniais temperatūros matavimais, neatsižvelgiant į trumpus nuokrypius).

9. Nors didesnio bandomosios medžiagos poveikio grupėse gali būti pastebimas reprodukcijos sumažėjimas, F0 kartos reprodukcija bent trečios didžiausios dozės grupėje ir visų mažesnių dozių grupėse turėtų būti pakankama, kad būtų galima pripildyti ikrų inkubatorius. Be to, F1 kartos trečios didžiausios dozės ir mažesnių dozių poveikio grupėse turėtų būti pakankamai išgyvenusių embrionų, kad būtų galima įvertinti vertinamąsias baigtis iš nesuaugusių žuvų ėminių (žr. 36 ir 38 punktus ir 9 priedėlį). Be to, išgyvenamumas po išsiritimo turi būti bent minimalus (~20 %) F1 kartos antros didžiausios dozės poveikio grupėje. Tai nėra tinkamumo kriterijai, tačiau tai rekomendacijos, kaip būtų galima apskaičiuoti patikimas NOEC vertes.

10. Jei pastebima, kad nukrypta nuo bandymo tinkamumo kriterijų, reikėtų apsvarstyti to padarinius bandymo rezultatų patikimumui, ir tie nukrypimai bei svarstymai turėtų būti įtraukti į bandymo ataskaitą.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

11. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

a) deguonies ir pH matuokliai;

b) įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti;

c) tinkama temperatūros kontrolės (geriausia nuolatinės stebėsenos) aparatūra;

d) iš chemiškai inertiškos medžiagos pagaminti indai (akvariumai), tinkamos talpos pagal rekomenduojamą žuvų įkrovą ir laikymo tankį juose (žr. 3 priedėlį);

e) reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. ±0,5 mg tikslumo).

Vanduo

12. Bandymui galima naudoti bet kokį vandenį, kuriame bandomosios rūšies žuvys gali ilgai gyventi ir augti. Vandens kokybė turėtų būti pastovi per visą bandymą. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo nepadarytų netinkamo poveikio bandymo rezultatui (pvz., sudarydamas kompleksinius junginius su bandomąja chemine medžiaga) ar neigiamo poveikio veislinių žuvų produktyvumui, tam tikrais intervalais turėtų būti imami ėminiai analizei. Sunkiųjų metalų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticidų, bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių kiekių matavimai turėtų būti atliekami, pavyzdžiui, kas šešis mėnesius, kai yra žinoma, kad skiedimo vanduo yra gana pastovios kokybės. Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės nurodytos 2 priedėlyje. Vandens pH vertė turėtų būti intervale nuo 6,5 iki 8,5, bet per konkretų bandymą ji neturėtų pakisti daugiau kaip ±0,5 pH vieneto.

Ekspozicijos sistema

13. Ekspozicijos sistemos konstrukcija ir jai tinkamos medžiagos konkrečiai nenurodomos. Bandymo sistema turėtų būti pagaminta iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ar kitos chemiškai inertiškos medžiagos, neužterštos per ankstesnius bandymus. Šiam bandymui tinkama ekspozicijos sistema gali būti nuolatinio srauto pratekamoji sistema (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Bandymo tirpalai

14. Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas turėtų būti į ekspozicijos sistemą tiekiamas tinkamu siurbliu. Pradinio tirpalo srauto sparta (debitas) turėtų būti kalibruota remiantis bandymo tirpalų tinkamumo analiziniu patvirtinimu, prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą, ir periodiškai tikrinama tūrio matavimais per visą bandymą. Bandymo tirpalas kiekvienoje bandymo kameroje tinkamai atnaujinamas (pvz., visas jo tūris pakeičiamas ne mažiau kaip 5 kartus per parą, daugiausia iki 16 kartų per parą, arba palaikomas iki 20 ml per minutę srautas) priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos stabilumo ir vandens kokybės.

15. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą patartina ruošti paprasčiausiai sumaišant arba suplakant bandomąją cheminę medžiagą su skiedimo vandeniu mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ir (arba) ultragarsu). Tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles ar sistemas arba pasyviojo dozavimo metodus (14). Reikėtų stengtis, kiek tik įmanoma, nenaudoti tirpiklių ar nešiklių, nes: 1) kai kurie tirpikliai patys gali būti toksiški ir (arba) sukelti nepageidaujamus ar netikėtus atsakus, 2) kai bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos viršija jų tirpumo vandenyje gebą (taip gali dažnai nutikti naudojant tirpiklius), gali būti netiksliai nustatytos efektyviosios jų koncentracijos, 3) per ilgesnį laiką trunkančius bandymus naudojami tirpikliai gali paskatinti nemažą biologinės plėvelės, susijusios su mikroorganizmų aktyvumu, susidarymą, ir tai gali paveikti aplinkos sąlygas ir gebėjimą palaikyti tinkamas poveikio koncentracijas, ir 4) kai nėra ankstesnių duomenų, kuriais būtų patvirtinta, kad atitinkamas tirpiklis nedaro poveikio tyrimo rezultatui, naudojant tirpiklius reikia tirpiklio kontrolinio bandinio, o tai turi poveikį gyvūnų gerovei, nes bandymui atlikti reikia daugiau gyvūnų. Tiriant chemines medžiagas, kurių bandymus atlikti sunku, galima naudoti tirpiklį, kai nėra kitos išeities, ir reikėtų nustatyti geriausią metodą remiantis EBPO rekomendaciniu dokumentu Nr. 23 dėl sunkiai tiriamų medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymų (15). Tirpiklio pasirinkimas priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos cheminių savybių ir nuo to, ar yra ankstesnių duomenų apie to tirpiklio naudojimą. Jei naudojami tirpikliai-nešikliai, kartu su kontroliniais (neigiamais) bandiniais be tirpiklio (tik su skiedimo vandeniu) turėtų būti naudojami ir tinkami tirpiklio kontroliniai bandiniai. Tuo atveju, kai tirpiklio naudojimas neišvengiamas ir dėl to padidėja mikroorganizmų aktyvumas (susidaro biologinė plėvelė), rekomenduojama užrašyti ir ataskaitoje pranešti biologinės plėvelės susidarymo kiekviename inde duomenis per visą bandymą (bent kas savaitę). Geriausia yra palaikyti pastovią tirpiklio koncentraciją tirpiklio kontroliniame bandinyje ir visuose bandomosios medžiagos bandiniuose. Jei tirpiklio koncentracija nėra pastovi, didžiausia tirpiklio koncentracija, esanti bandinyje su bandomąja medžiaga, turėtų būti naudojama ir tirpiklio kontroliniame bandinyje. Tais atvejais, kai naudojamas tirpiklis-nešiklis, didžiausios tirpiklio koncentracijos neturėtų viršyti 100 µl/l ar 100 mg/l (15) ir rekomenduojama palaikyti kuo mažesnę tirpiklio koncentraciją (pvz., < 20 µl/l), kad būtų išvengta galimo tirpiklio poveikio matuojamoms vertinamosioms baigtims (16).

Bandomieji gyvūnai

Žuvų atranka ir laikymas

16. Bandomoji rūšis yra japoninė medaka *Oryzias latipes*, pasirinkta dėl jos trumpo gyvenimo ciklo ir galimybės nustatyti genetinę lytį. Nors panašų bandymo protokolą galima pritaikyti ir kitų smulkių rūšių žuvims, pagal šį bandymo metodą aprašyti konkretūs metodai ir stebimos vertinamosios baigtys tinka tik japoninei medakai (žr. 1 punktą). Medakas yra lengva veisti nelaisvėje; yra paskelbta jų auginimo metodų (17) (18) (19) ir turima duomenų, gautų iš jų trumpalaikio žūstamumo, ankstyvosios gyvenimo stadijos ir viso gyvenimo ciklo bandymų (5) (6) (8) (9) (20). Visų laikomų žuvų apšvietimo režimas yra 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos laikotarpis. Žuvys šeriamos gyvų sūriavandenių krevečių *Artemia* spp. nauplijais, kuriuos, jei būtina, galima papildyti pirktiniais žuvų pašaro dribsniais. Pirktiniai žuvų pašaro dribsniai turėtų būti reguliariai analizuojami, ar juose nėra teršalų.

17. Jei laikomasi tinkamos žuvų priežiūros praktikos, specialaus jų auginimo protokolo laikytis nereikia. Pavyzdžiui, medakas galima auginti 2 l tūrio induose, po 240 žuvų lervų kiekviename inde, iki 4 s. p. a., vėliau jas galima auginti 2 l tūrio induose po 10 žuvų viename inde iki 8 s. p. a., o tada į 2 l tūrio indus perkeliama po dvi žuvis (veislinės poros).

Žuvų aklimatizacija ir atranka

18. Žuvis bandymui reikėtų rinktis iš vienos laboratorinės populiacijos, aklimatizuotos bent dvi savaites prieš bandymą panašiomis, kaip bandymo, vandens kokybės ir apšvietimo sąlygomis (pastaba: šis aklimatizacijos laikotarpis nėra paruošiamasis laikotarpis bandymo vietoje, *in situ*). Rekomenduojama bandymui žuvis imti iš vietoje išaugintos kultūros, nes suaugusių žuvų gabenimas joms kelia stresą ir gali sukliudyti patikimai neršti. Žuvys turėtų būti šeriamos sūriavandenių krevečių nauplijais dukart per dieną per visą laikymo laikotarpį ir veikimo bandomąja medžiaga etape; jei reikia, šis pašaras papildomas pirktiniais žuvų pašaro dribsniais. Pradedant šį bandymą būtina turėti bent 42 veislines žuvų poras (54 veislines poras, jei reikia naudoti tirpiklio kontrolinį bandinį, iš dalies todėl, kad trūksta ankstesnių duomenų, kuriais būtų galima pagrįsti vien tik kontrolinio bandinio be tirpiklio naudojimą), kad būtų užtikrintas pakankamas dauginimasis. Be to, kiekvieną F0 kartos veislinę porą reikėtų patikrinti ir įsitikinti, kad jos genai yra XX-XY (t. y. normalus kiekvienos lyties lytinių chromosomų kompleksas), kad nebūtų įtraukta spontaninių XX patinų (žr. 39 punktą).

19. Auginamų žuvų gaištamumo aklimatizacijos etape duomenis reikėtų užrašyti, o po 48 val. stabilizacijos laikotarpio taikomi šie kriterijai:

— jei auginamos populiacijos gaištamumas per septynias paras iki perkėlimo į bandymo sistemą yra didesnis nei 10 %, visa ta partija atmetama;

— jei gaištamumas toje populiacijoje per septynias paras prieš perkėlimą į bandymo sistemą yra nuo 5 % iki 10 % – prie 2 savaičių aklimatizacijos laikotarpio pridedamos dar septynios papildomos aklimatizacijos paros; jei per tas septynias papildomas paras gaištamumas yra didesnis nei 5 %, visa ta partija atmetama;

— jei gaištamumas toje populiacijoje per septynias paras prieš perkėlimą į bandymo sistemą yra mažesnis nei 5 % – ta partija laikoma tinkama.

20. Dviejų savaičių aklimatizacijos laikotarpiu prieš bandymą ir veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu žuvys neturėtų būti gydomos nuo ligų, o jei įmanoma, gydymo nuo ligų reikėtų visiškai išvengti. Klinikinių ligos požymių turinčios žuvys neturėtų būti naudojamos tyrimui. Auginimo laikotarpiu prieš bandymą reikėtų pildyti stebėjimo ir bet kokios ligų profilaktikos bei gydymo žurnalą.

21. Pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą, turėtų būti naudojamos lytiškai dimorfiškos, genetinę lytį turinčios suaugusios žuvys iš laboratorijos turimų reprodukcijai subrendusių gyvūnų, augintų 25 ± 2 °C temperatūroje, išteklių. Tos žuvys turėtų būti patvirtintos kaip tinkamos veisimui (t. y. jau turėjusios gyvybingų palikuonių) per savaitę iki veikimo bandomąja medžiaga pradžios. Visoje bandymui naudojamų žuvų grupėje individų masės intervalas pagal lytį bandymo pradžioje neturėtų daugiau kaip ±20 % nukrypti nuo tos pačios lyties individų masės aritmetinio vidurkio. Prieš bandymą reikėtų pasverti žuvų poėminį ir nustatyti vidutinę masę. Pasirinktų žuvų amžius turėtų būti bent 12 s. p. a., patelės turėtų sverti ≥ 300 mg, patinai ≥ 250 mg.

BANDYMO PLANAS

Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

22. Rekomenduojama naudoti penkių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių bandinius kartu su kontroliniu (-iais) bandiniu (-iais). Renkantis bandomosios medžiagos koncentracijos verčių intervalą reikėtų atsižvelgti į visus informacijos šaltinius, įskaitant kiekybinius medžiagos struktūros ir savybių ryšius (QSAR), palyginimą su analogiškomis medžiagomis (analogijos metodas) ir bandymų su žuvimis rezultatus, kaip antai pagal ūmaus toksiškumo tyrimų (šio priedo C.1 skyrius), trumpalaikės žuvų reprodukcijos tyrimo (šio priedo C.48 skyrius) ir kitus bandymų metodus, pvz., pateiktus šio priedo C.15, C.37, C.41, C.47 arba C.49 skyriuje (21) (22) (23) (24) (25) (26), jei tokios informacijos yra, arba, jei būtina, atlikti intervalo nustatymo bandymą, galbūt apimantį reprodukcijos etapą. Jei reikia, intervalo nustatymo bandymas gali būti atliekamas panašiomis (vandens kokybės, bandymo sistemos, gyvūnų įkrovos) sąlygomis į tas, kurios naudojamos per galutinį bandymą. Jei būtina naudoti tirpiklį ir dėl jo neturima ankstesnių duomenų, per intervalo nustatymo bandymą galima kartu nustatyti to tirpiklio tinkamumą. Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų viršyti jos tirpumo vandenyje ribos, 10 mg/l arba 1/10 96h-LC50 vertės (27). Mažiausia koncentracija turėtų būti nuo 10 iki 100 kartų mažesnė nei didžiausia koncentracija. Naudojant penkias koncentracijos vertes per šį bandymą galima ne tik išmatuoti dozės ir atsako santykius, bet ir gauti mažiausios pastebėto poveikio koncentracijos (LOEC) ir nepastebėto poveikio koncentracijos (NOEC) vertes, kurios reikalingos rizikos vertinimui pagal kai kurias reglamentavimo programas ar jurisdikcijas. Apskritai bandomosios cheminės medžiagos nominaliųjų koncentracijų skirtumo koeficientas tarp gretimų dozių yra ≤ 3,2.

Kartotiniai bandiniai bandomosiose grupėse ir kontrolinėse grupėse

23. Kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai turėtų būti naudojamos bent šešios kartotinės bandymo kameros (žr. 7 priedėlį). Reprodukcijos (išskyrus F0 kartos reprodukciją) etape kartotinių bandinių struktūra padvigubinama, siekiant vertinti vislumą, ir kiekviename kartotiniame bandinyje laikoma tik viena veislinė pora (žr. 42 punktą).

24. Kartu su įvairių bandomosios medžiagos koncentracijų bandiniais turėtų būti papildomai naudojamas skiedimo vandens kontrolinis bandinys ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinis bandinys. Kontrolinių bandinių kartotinių kamerų skaičius turėtų būti dvigubai didesnis, kad būtų užtikrinta pakankama statistinė galia (t. y. reikėtų naudoti bent dvylika kontrolinių bandinių kontrolinėse grupėse). Reprodukcijos etape kartotinių kontrolinių bandinių skaičius padvigubinamas (t. y. mažiausiai 24 kartotiniai bandiniai ir kiekviename kartotiniame bandinyje tik viena veislinė pora). Po reprodukcijos kontroliniuose kartotiniuose bandiniuose turėtų būti ne daugiau kaip po 20 embrionų (žuvų).

PROCEDŪRA

Bandymo pradžia

25. Aktyvaus reprodukcinio amžiaus suaugusios žuvys, naudojamos pradedant F0 kartos bandymą, atrenkamos pagal du kriterijus: amžių (paprastai daugiau kaip 12 s. p. a., bet patartina ne daugiau kaip 16 s. p. a.) ir masę (patelės turėtų sverti ≥ 300 mg, patinai ≥ 250 mg).

26. Šias nurodytas sąlygas atitinkančios patelių ir patinų poros perkeliamos atskiromis poromis į kiekvieną kartotinio bandinio indą, t. y. bandymo pradžioje turi būti dvylika kartotinių bandinių kontrolinėse grupėse ir šeši kartotiniai bandiniai chemine medžiaga veikiamose grupėse. Šiems bandymo indams atsitiktine tvarka skiriama tam tikra bandomosios medžiagos dozė (pvz., T1–T5 ir kontrolinis bandinys) ir kartotinis bandinys (pvz., A–L kontrolinėse grupėse ir A–F bandomojoje grupėje), tada jie įdedami į ekspozicijos sistemą, užtikrinant tinkamą tirpalo srautą į kiekvieną indą.

Veikimo bandomąja medžiaga sąlygos

27. Visi bandymo parametrai ir sąlygos išsamiai išdėstyti 3 priedėlyje. Laikantis šių specifikacijų kontrolinės grupės žuvų vertinamųjų baigčių vertės turėtų būti panašios į tas, kurios nurodytos 4 priedėlyje.

28. Bandymo metu vandenyje ištirpęs deguonis, pH ir temperatūra turėtų būti matuojami bent viename kiekvienos bandomosios grupės ir kontrolinės grupės bandymo inde. Šiuos (išskyrus temperatūros) matavimus veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu reikėtų atlikti bent kartą per savaitę. Vidutinė vandens temperatūra per visą tyrimą turėtų būti nuo 24 iki 26 °C visu bandymo laikotarpiu. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu temperatūra turėtų būti matuojama kiekvieną dieną. Vandens pH vertė turėtų būti intervale nuo 6,5 iki 8,5, bet per konkretų bandymą ji neturėtų pakisti daugiau kaip ±0,5 pH vieneto. Vienos bandomosios grupės kartotiniai bandiniai neturėtų būti statistiškai skirtingi vienas nuo kito, o bandomosios grupės atliekant bandymą neturėtų būti statistiškai skirtingos viena nuo kitos (remiantis kasdieniais temperatūros matavimais, neatsižvelgiant į trumpus nuokrypius).

Ekspozicijos trukmė

29. Pradedant bandymą, lytiškai subrendusios reprodukcijai F0 kartos žuvys veikiamos bandomąja medžiaga tris savaites. Ketvirtą savaitę, maždaug 24 bandymo dieną, pradedama auginti F1 karta, o F0 veislinių porų žuvys humaniškai numarinamos ir užrašomi jų masės ir ilgio duomenys (žr. 34 punktą). Tada F1 kartos žuvys veikiamos bandomąja medžiaga dar 14 savaičių (iš viso F1 kartai tenka 15 savaičių poveikis), o F2 karta – dvi savaites iki išsiritimo iš ikrų. Visa bandymo trukmė yra preliminariai 19 savaičių (t. y. iki F2 kartos išsiritimo). Bandymo tvarkaraštis pateikiamas 2 lentelėje ir išsamiau paaiškintas 9 priedėlyje.

Šėrimo režimas

30. Žuvis galima šerti sūriavandenėmis krevetėmis *Artemia* spp. (24 valandų amžiaus nauplijais) iki soties, o jei reikia, ir papildomai pirktiniais žuvų pašaro dribsniais. Pirktiniai žuvų pašaro dribsniai turėtų būti reguliariai analizuojami, ar juose nėra teršalų, kaip antai chloro organinių pesticidų, policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) ar polichlorintųjų bifenilų (PCB). Reikėtų stengtis nenaudoti tokių pašarų, kuriuose yra didesnis endokrininę sistemą veikiančių medžiagų (pvz., fitoestrogenų), galinčių paveikti bandymo rezultatą, kiekis. Nesuvartotas pašaras ir išmatos iš bandymo indų turėtų būti pašalinami taip dažnai, kaip reikia, pvz., kruopščiai išvalant kiekvieno indo dugną sifonu. Kiekvieno indo šonus ir dugną taip pat reikėtų nuvalyti (pvz., nugrandyti mentele) vieną ar du kartus per savaitę. Žuvų šėrimo režimo pavyzdys pateiktas 5 priedėlyje. Šėrimo normos priklauso nuo žuvų skaičiaus kartotiniame bandinyje. Taigi jei kartotiniame bandinyje nugaišta dalis žuvų, šėrimo norma sumažinama.

Analizinis nustatymas ir matavimai

31. Prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą reikėtų įsitikinti, kad cheminės medžiagos tiekimo sistema tinkamai veikia. Turėtų būti nustatyti visi reikiami analizės metodai, taip pat reikėtų pakankamai žinoti apie tos cheminės medžiagos stabilumą bandymo sistemoje. Atliekant bandymą, tinkamais intervalais nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (patartina tai daryti bent kartą per savaitę) viename kiekvienos bandomosios grupės kartotiniame bandinyje, kas savaitę renkantis tikrinti vis kitą kartotinį bandinį toje pačioje bandomojoje grupėje.

32. Bandymo metu turėtų būti tinkamais intervalais (pvz., bent tris kartus per savaitę) tikrinami skiesto ir pradinio tirpalo srautai (debitas). Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis, tačiau jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo tinkamai palaikoma ±20 % vidutinių išmatuotų verčių tikslumu per visą bandymą, rezultatus galima pagrįsti arba nominaliosiomis, arba išmatuotomis vertėmis. Tuo atveju, kai cheminės medžiagos labai kaupiasi žuvyse, bandomosios medžiagos koncentracijos gali sumažėti žuvims augant. Tokiais atvejais rekomenduojama atitinkamai pritaikyti bandymo tirpalo atnaujinimo spartą kiekvienoje kameroje, kad būtų palaikomos kuo pastovesnės bandomosios medžiagos koncentracijos.

Stebėjimai ir matuojamos vertinamosios baigtys

33. Matuojamos vertinamosios baigtys yra vislumas, vaisingumas, išsiritimas, augimas ir išgyvenamumas, vertinant galimą poveikį populiacijos lygiu. Taip pat reikėtų kasdien stebėti gyvūnų elgesį ir užrašyti pastabas dėl bet kokio neįprasto elgesio. Kitos mechaninio pobūdžio vertinamosios baigtys yra kepenų vitelogenino (*vtg*) mRNR arba VTG baltymo kiekiai, nustatomi imuniniu tyrimu (28), lyties fenotipiniai požymiai, tokie kaip patinams būdingi analinio peleko gumburėliai, histologinis lytinių liaukų (gonadų) lyties vertinimas ir histopatologinis inkstų, kepenų ir lytinių liaukų vertinimas (žr. vertinamųjų baigčių sąrašą 1 lentelėje). Visos šios konkrečios vertinamosios baigtys vertinamos nustačius individo genetinę lytį pagal tai, ar yra medakos vyriškąją lytį lemiantis genas *dmy*, ar jo nėra (žr. 41 punktą). Papildomai vertinamas laikas iki nerštо. Be to, paprastus fenotipinius lyčių santykius galima nustatyti naudojant informaciją apie suskaičiuotus analinio peleko gumburėlius, taip identifikuojant atskirą medaką kaip fenotipinį patiną arba patelę. Šiuo bandymo metodu nesitikima nustatyti nedidelių nukrypimų nuo tikėtino lyčių santykio, nes dėl palyginti nedidelio žuvų, esančių kiekviename kartotiniame bandinyje, skaičiaus nepakanka statistinės galios. Be to, atliekant histopatologinį vertinimą, įvertinama lytinė liauka ir atliekamos kur kas patikimesnės analizės, vertinant lytinės liaukos fenotipą genetinės lyties kontekste.

34. Pagrindinis šio bandymo metodo tikslas yra įvertinti galimą populiacijai reikšmingą bandomosios cheminės medžiagos poveikį. Mechanistinės vertinamosios baigtys (VTG, antriniai lytiniai požymiai ir tam tikras histopatologinis poveikis lytinėms liaukoms) taip pat gali padėti nustatyti, ar koks nors poveikis patiriamas dėl endokrininės sistemos veikimo. Tačiau šioms mechaninio pobūdžio vertinamosioms baigtims gali turėti įtakos ir sisteminis bei kitoks toksiškumas, todėl taip pat galima išsamiau įvertinti kepenų ir inkstų histopatologiją, siekiant geriau suprasti bet kokius organizmo atsakus, nustatytus tiriant mechaninio pobūdžio vertinamąsias baigtis. Jei neatliekama šių išsamių vertinimų, vis vien reikėtų atkreipti dėmesį į dideles anomalijas, atsitiktinai pastebėtas atliekant histopatologinį vertinimą, ir apie jas pranešti ataskaitoje.

Humaniškas žuvų numarinimas

35. Nutraukus F0 ir F1 kartų žuvų veikimą bandomąja chemine medžiaga ir kai paimamas nesuaugusių žuvų poėminis, žuvys turėtų būti numarinamos tinkamais anestetiko tirpalo kiekiais (pvz., trikaino metansulfonato, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l), buferiniame tirpale su 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrio hidrokarbonato, CAS.144-55-8), kuriuo sumažinamas gleivinių dirginimas. Jei yra požymių, kad žuvys patiria didelių kančių (kurios yra labai didelės ir galima patikimai prognozuoti žūtį), ir jos laikomos gaištančiomis, reikėtų tuos gyvūnus anestezuoti ir numarinti, o per duomenų analizę traktuoti kaip nugaišusius gyvūnus. Kai žuvys numarinamos dėl liguistumo, reikėtų tai užrašyti ir pranešti ataskaitoje. Priklausomai nuo to, kuriame tyrimo etape žuvys numarinamos, galima pasilikti žuvis histopatologinei analizei (užfiksuoti žuvis, kad būtų galima atlikti histopatologinę analizę).

Žuvų ikrų ir lervų tvarkymas

Veislinių porų ikrų rinkimas naujai kartai įveisti

36. F0 kartos žuvų ikrai F1 kartai įveisti renkami 4 bandymo savaitės pirmąją dieną (arba, jei reikia, dvi pirmas dienas), o F1 kartos ikrai F2 kartai įveisti renkami 18 bandymo savaitę. 18 bandymo savaitę F1 kartos žuvys yra suaugusios (15 savaičių po apvaisinimo, s. p. a.). Svarbu, prieš pradedant rinkti ikrus, prieš vieną dieną pašalinti visus ikrus iš kiekvieno indo, taip užtikrinant, kad visi surinkti veislinės poros ikrai būtų vienos vados. Po nerštо medakos patelė kartais nešiojasi ikrus prikibusius prie savo kūno, arti išeinamosios angos, kad galėtų juos padėti ant tinkamo substrato. Kadangi bandymo inde substrato nėra, ikrus galima rasti arba prikibusius prie patelės, arba indo dugne. Priklausomai nuo jų buvimo vietos, ikrai atsargiai nuimami nuo patelės arba išsiurbiami iš dugno sifonu 4 bandymo savaitę (F0 kartos) ir 18 savaitę (F1 kartos). Visi surinkti vienos bandomosios grupės ikrai sudedami kartu prieš juos paskirstant į inkubavimo kameras.

37. Išnerštus ikrus jungiančios gijos turėtų būti pašalintos. Apvaisinti ikrai (iki 20) paimami iš kiekvienos veislinės poros (1 pora kiekviename kartotiniame bandinyje), sudedami kartu pagal bandomąją grupę ir sistemingai paskirstomi į tinkamas inkubavimo kameras (6, 7 priedėliai). Naudojant kokybišką stereomikroskopą (skrodimo mikroskopą) galima įžiūrėti ankstyvus apvaisinimo, vystymosi požymius, tokius kaip apvaisinimo membranos (choriono) pakilimas, tolesnis ląstelių dalijimasis ar blastulės susidarymas. Inkubavimo kameras galima įdėti į atskirus inkubavimo akvariumus, paruoštus kiekvienai bandomajai grupei (tokiu atveju juose turi būti matuojami vandens kokybės parametrai ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos), arba į kartotinio bandinio akvariumą, kuriame bus laikomos išsiritusios lervos (pvz., eleuteroembriono stadijoje). Jei ikrus reikia rinkti ir antrą dieną (23 bandymo dieną), visus per abi dienas surinktus ikrus reikėtų sudėti kartu, o tada sistemingai perskirstyti į kiekvienos bandomosios grupės kartotinius bandinius.

Ikrų priežiūra iki išsiritimo

38. Apvaisinti ikrai nuolat judinami, pvz., ikrų inkubatoriuje oro burbulais arba vertikaliai supant ikrų inkubatorių. Apvaisintų ikrų (embrionų) žūstamumas tikrinamas ir užrašomas kiekvieną dieną. Negyvi ikrai pašalinami iš inkubatorių (9 priedėlis). 7 dieną po apvaisinimo (d. p. a.) judinimas sustabdomas arba sumažinamas, kad apvaisinti ikrai nusėstų į inkubatoriaus dugną. Tai palengvina išsiritimą, kuris paprastai vyksta per vieną ar dvi tolesnes dienas. Kiekvienos bandomosios grupės ir kontrolinės grupės išsiritę gyvūnai (jaunos lervos; eleuteroembrionai) suskaičiuojami (jungtinio kartotinio bandinio pagrindu). Apvaisinti ikrai, iš kurių dar nėra išsiritusios lervos per dukart ilgesnį laiką nei iki vidutinės (medianinės) išsiritimo kontrolinėje grupėje dienos (paprastai 16 ar 18 d. p. a.), laikomi negyvybingais ir pašalinami.

39. Dvylika išsiritusių lervų perkeliamos į kiekvieną kartotinio bandinio indą. Išsiritusios lervos iš inkubavimo kamerų sudedamos kartu ir sistemingai paskirstomos į kartotinių bandinių indus (7 priedėlis). Tai galima daryti atsitiktine tvarka išrenkant išsiritusią lervą iš jungtinės bandomosios grupės ir paeiliui, taip pat atsitiktine tvarka, dedant po vieną lervą į kiekvieną kartotinio bandinio akvariumą. Kiekviename inde turėtų būti vienodas skaičius (n = 12) išsiritusių lervų (daugiausia 20 lervų kiekviename inde). Jei išsiritusių lervų nepakanka visiems bandomosios grupės kartotiniams bandiniams užpildyti, rekomenduojama užtikrinti, kad būtų kuo daugiau kartotinių bandinių, kuriuose būtų po 12 išsiritusių lervų. Išsiritusias lervas galima saugiai perkelti plačiaangėmis stiklo pipetėmis. Bet kokios atliekamos išsiritusios lervos humaniškai numarinamos anestetiku. Per kelias savaites iki veislinių porų sudarymo reikėtų užrašyti, kurią dieną pastebėtas pirmas neršto atvejis kiekviename kartotiniame bandinyje.

Veislinių porų sudarymas

Pelekų kirpimas ir genotipinės lyties nustatymas

40. Genotipinės lyties nustatymas iš pelekų nuokarpų atliekamas 9–10 s. p. a. (t. y. F1 kartos žuvų 12 ar 13 bandymo savaitę). Visos inde esančios žuvys anestezuojamos (patvirtintais metodais, pvz., IACUC) ir paimamas mažas audinio ėminys iš kiekvienos žuvies uodeginio peleko galo iš nugaros ar pilvo pusės, kad būtų galima nustatyti individo genotipinę lytį (29). Vieno kartotinio bandinio žuvis galima laikyti mažuose narveliuose (jei įmanoma, po vieną žuvį narvelyje) tame kartotinio bandinio inde, arba kiekviename narvelyje galima laikyti po dvi žuvis, jeigu įmanoma jas vieną nuo kitos atskirti. Vienas būdas jas skirti yra skirtingai įpjauti uodeginį peleką (pvz., vienos žuvies peleko galą iš pilvo pusės, kitos – iš nugaros pusės) imant audinio ėminį.

41. Medakos genotipinė lytis nustatoma iš identifikuoto ir nustatytos sekos geno *dmy*, kuris yra Y chromosomoje. Geno *dmy* buvimas reiškia, kad tai yra XY individas, nepriklausomai nuo jo fenotipo, o jei geno *dmy* nėra, tai yra XX individas, nepriklausomai nuo fenotipo (30); (31). Iš kiekvieno peleko nuokarpos išgaunama deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir galima nustatyti, ar genas *dmy* yra, ar jo nėra, polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodais (žr. šio priedo C.41 skyriaus 9 priedėlį, arba 3 ir 4 priedėlius (29) literatūros šaltinyje).

Veislinių porų sudarymas

42. Informacija apie genotipinę lytį naudojama sudarant XX-XY veislines poras nepriklausomai nuo išorinio fenotipo, kuris gali būti pakitęs dėl bandomosios cheminės medžiagos poveikio. Kitą dieną po to, kai nustatoma kiekvienos žuvies genotipinė lytis, atsitiktine tvarka atrenkamos dvi XX žuvys ir dvi XY žuvys iš kiekvieno kartotinio bandinio ir sudaromos dvi XX-XY veislinės poros. Jei kartotiniame bandinyje nėra dviejų XX ar dviejų XY žuvų, tinkamas žuvis reikėtų gauti iš kitų tos bandomosios grupės kartotinių bandinių. Pagrindinė užduotis yra gauti rekomenduojamą kartotinių veislinių porų skaičių (12) kiekvienoje bandomojoje grupėje ir kontrolinėse grupėse (24). Žuvys, turinčios akivaizdžių anomalijų (plaukimo pūslės problemų, stuburo deformacijų, kraštutinių dydžio skirtumų ir kt.), sudarant veislines poras būtų atmetamos. F1 kartos reprodukcijos etape kiekviename kartotinio bandinio inde turėtų būti tik viena veislinė pora.

Nesuaugusių žuvų ėminių ėmimas ir vertinamųjų baigčių vertinimas

Ne veislinių porų žuvų ėminių ėmimas

43. Po veislinių porų sudarymo likusios žuvys, kurios nepasirinktos tolesniam veisimui, yra humaniškai numarinamos, kad būtų galima išmatuoti nesuaugusių (F1 kartos) žuvų vertinamąsias baigtis 12 ar 13 bandymo savaitę. Nepaprastai svarbu žuvis tvarkyti taip, kad vis dar būtų galima atsekti konkrečios žuvies genotipinę lytį, nustatytą išrenkant veislines poras. Visi surinkti duomenys analizuojami atsižvelgiant į konkrečios žuvies genotipinę lytį. Kiekviena žuvis naudojama matuojant įvairias vertinamąsias baigtis, įskaitant jauniklių (nesuaugusių žuvų) išgyvenamumo lygio

nustatymą (nuo 7 iki 12 ar 13 bandymo savaitės (F1)), augimą į ilgį (galima matuoti standartinį ilgį, jei uodeginis pelekas yra sutrumpintas imant ėminį genetinės lyties analizei; visą ilgį galima matuoti, jei ėminiui dėl *dmy* geno buvo paimta tik dalis uodeginio peleko galo iš nugaros ar pilvo pusės) ir kūno masę (t. y. šlapio kūno masę, nusausinus sugeriamuoju popieriumi), kepenų *vtg* mRNR (arba VTG) ir analinio peleko gumburėlius (žr. 1 ir 2 lenteles). Įsidėmėtina, kad veislinių porų žuvų masę ir ilgį taip pat būtina žinoti apskaičiuojant vidutinį žuvų augimą tam tikroje bandomojoje grupėje.

Audinių ėminių ėmimas ir vitelogenino kiekio matavimas

44. Kepenys išskrodžiamos ir turėtų būti laikomos ≤–70 °C temperatūroje iki *vtg* mRNR (arba VTG) matavimo. Žuvies uodega, įskaitant analinį peleką, užkonservuojama tinkamo (pvz., Davidson'o) fiksatoriaus tirpale arba nufotografuojama, kad vėliau būtų galima suskaičiuoti analinio peleko gumburėlius. Tuo pat metu, jei norima, galima paimti ir užkonservuoti ir kitų audinių (t. y. lytinės liaukos) ėminius. Kepenų VTG koncentracija turėtų būti kiekybiškai nustatyta pagal homologinės IFA (ELISA) metodą (žr. rekomenduojamas medakai tinkamas procedūras šio priedo C.48 skyriaus 6 priedėlyje); arba galima naudoti JAV aplinkos apsaugos agentūros (EPA) (29) nustatytus *vtg* mRNR kiekybinio nustatymo metodus, t. y. *vtg I* geno mRNR gaunant iš kepenų ėminio ir suskaičiuojant *vtg I* geno kopijas (iš 1 ng visos mRNR) kiekybinės PGR metodu. Vietoj *vtg* geno kopijų skaičiaus nustatymo kontrolinėse ir bandomosiose grupėse galima rinktis techniškai mažiau sudėtingą metodą, kuriam reikia mažiau išteklių, – nustatyti *vtg I* ekspresijos santykinį pokytį (kiek kartų ji pakito) kontrolinėse ir bandomosiose grupėse.

Antriniai lytiniai požymiai

45. Normaliomis sąlygomis tik lytiškai subrendę medakos patinai turi gumburėlius, išsivysčiusius ant kai kurių analinio peleko spindulių sujungtų plokštelių; tai yra antrinis lytinis požymis ir galimas biologinis žymuo, iš kurio galima spręsti apie endokrininę sistemą ardantį poveikį. Analinio peleko gumburėlių (sujungtų plokštelių su gumburėliais skaičiaus) skaičiavimo metodas pateiktas 8 priedėlyje. Kiekvieno individo analinio peleko gumburėlių skaičius taip pat naudojamas jį klasifikuojant kaip patiną arba patelę pagal išorinį fenotipą, kad būtų galima apskaičiuoti paprastąjį lyčių santykį kiekviename kartotiniame bandinyje. Medaka, kurios peleko gumburėlių skaičius yra bet koks didesnis už 0, laikoma patinu, o medaka, kurios analinio peleko gumburėlių skaičius yra 0, laikoma patele.

Vislumo ir vaisingumo vertinimas

46. F0 kartos vislumas ir vaisingumas vertinami 1–3 bandymo savaites, o F1 kartos 15–17 bandymo savaites. Kiekvienos veislinės poros ikrai kasdien renkami 21 dieną iš eilės. Ikrai atsargiai nuimami nuo tinkleliu pagautų patelių ir (arba) sifonu nusiurbiami nuo akvariumo dugno kiekvieną rytą. Kiekvieno kartotinio bandinio veislinės poros vislumo ir vaisingumo duomenys užrašomi kiekvieną dieną. Vislumas apibrėžiamas kaip išnerštų ikrų skaičius, o vaisingumas praktiškai apibrėžiamas kaip apvaisintų ir gyvybingų ikrų skaičius, nustatytas skaičiavimo metu. Suskaičiuoti ikrus reikėtų kuo greičiau po jų surinkimo.

47. Kartotinių bandinių žuvų vislumo duomenys kasdien užrašomi kaip kiekvienos veislinės poros ikrų skaičius, kuris analizuojamas pagal rekomenduojamas statistines procedūras, naudojant kartotinių bandinių vidurkius. Vaisingumas kartotiniame bandinyje yra visų iš veislinės poros gautų apvaisintų ikrų bendras skaičius, padalytas iš visų išnerštų tos poros ikrų bendro skaičiaus. Statistiškai vaisingumas analizuojamas kaip santykinis dydis kiekviename kartotiniame bandinyje. Išsiritimas kartotiniame bandinyje yra išsiritusių lervų skaičius, padalytas iš įdėtų embrionų skaičiaus (paprastai 20). Statistiškai išsiritimas analizuojamas kaip santykinis dydis kiekviename kartotiniame bandinyje.

Suaugusių žuvų ėminių ėmimas ir vertinamųjų baigčių vertinimas

Veislinių žuvų porų ėminių ėmimas

48. Po 17 bandymo savaitės (t. y. po to, kai sėkmingai įveisiama F2 karta), F1 kartos suaugusios žuvys humaniškai numarinamos ir įvertinamos įvairios vertinamosios baigtys (žr. 1 ir 2 lenteles). Padaromas analinio peleko atvaizdas, kad būtų galima vertinti analinio peleko gumburėlius (žr. 8 priedėlį), ir (arba) uodega nupjaunama iškart po išeinamosios angos ir užfiksuojama, kad būtų galima gumburėlius suskaičiuoti vėliau. Jei norima, galima tuo pat metu paimti ir išsaugoti uodeginio peleko dalį, kad būtų galima patikrinti genetinę lytį (pagal *dmy* geną). Jei reikia, galima paimti audinio ėminį, kad būtų galima pakartoti *dmy* analizę ir patikrinti konkrečios žuvies genetinę lytį. Atveriama kūno ertmė, kad galėtų įsigerti tinkamas (pvz., Davidson'o) fiksatorius, prieš panardinant visą kūną į fiksavimo tirpalą. Tačiau jei prieš fiksuojant atliekama tinkama permeabilizacija, kūno ertmės atverti nereikia.

Histopatologija

49. Atliekamas kiekvienos žuvies histologinis vertinimas siekiant nustatyti lytinės liaukos audinio patologiją (30); (29). Kaip nurodyta 33 punkte, sisteminis arba kitoks toksiškumas gali turėti įtakos kitoms mechaninio pobūdžio vertinamosioms baigtims, vertinamoms per šį tyrimą (t. y. VTG, antriniams lytiniams požymiams ir tam tikram histopatologiniam poveikiui lytinėms liaukoms). Todėl taip pat galima išsamiau įvertinti kepenų ir inkstų histopatologinius pakitimus, kad būtų geriau suprantami bet kokie atsakai, nustatomi tiriant mechanistines vertinamąsias baigtis. Jei neatliekama šių išsamių vertinimų, vis vien reikėtų atkreipti dėmesį į dideles anomalijas, atsitiktinai pastebėtas atliekant histopatologinį vertinimą, ir apie jas pranešti ataskaitoje. Būtų galima pradėti vertinimą „iš viršaus į apačią“ nuo didžiausios dozės bandomosios grupės (palyginti su kontroline grupe) iki tos bandomosios grupės, kuri jokio poveikio nepatyrė, tačiau rekomenduojama remtis histopatologinio tyrimo gairėmis (29). Paprastai visi ėminiai apdorojami / išskrodžiami, o tada juos ištiria patologas. Jei tiriama principu „iš viršaus į apačią“, pažymėtina, kad pagal procedūrą, kuri vadinama „Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices“ (RSCABS; tai yra Rao-Scott'o patikslintas Cochrane-Armitage'o trendo kriterijus pagal „pjūvius“ – angl. *slices*), remiamasi prielaida, kad didinant dozes didėja ir biologinis poveikis (patologija). Taigi, vertinimo galia sumažėja, jei vertinama tik viena didelė dozė, be jokių tarpinių dozių. Jei nebūtina atlikti statistinės analizės siekiant nustatyti, kad didžiausia dozė neturi jokio poveikio, šis metodas gali būti priimtinas. Lytinės liaukos fenotipas taip pat nustatomas atliekant šį vertinimą.

Kiti stebėjimai

50. Pagal MEOGRT metodą pateikiama duomenų, kurie gali būti naudojami (pvz., pagal įrodomosios duomenų galios nustatymo metodą) vienu metu vertinant bent dviejų bendrų tipų nepalankios baigties kelius (angl. *adverse outcome pathways*, AOP), kurių baigtis – reprodukcijos funkcijos sutrikimas: a) endokrininio poveikio kelius, kai sutrikdoma endokrininės sistemos pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų (HPG) ašis, ir b) poveikio kelius, dėl kurių sumažėja išgyvenamumas, augimas (ilgis ir masė) ir reprodukcija dėl toksiškumo ne per endokrininę sistemą. Vertinamosios baigtys, paprastai matuojamos atliekant lėtinio toksiškumo bandymus, tokius kaip viso gyvenimo ciklo bandymas ir ankstyvosios gyvenimo stadijos bandymas, taip pat yra įtrauktos į šį bandymą ir gali būti naudojamos vertinant pavojus, kylančius ir dėl neendokrininių toksinių cheminės medžiagos veikimo būdų, ir dėl endokrininio toksinio poveikio kelių. Per bandymą reikėtų kasdien stebėti gyvūnų elgesį ir užrašyti pastabas dėl bet kokio neįprasto elgesio. Be to, reikėtų užrašyti duomenis apie bet kokį gaištamumą ir apskaičiuoti išgyvenamumą iki žuvų skaičiaus sumažinimo (6 ar 7 bandymo savaitę), po šio skaičiaus sumažinimo likusių žuvų išgyvenamumą iki nesuaugusių žuvų ėminių ėmimo (9–10 s. p. a.) ir išgyvenamumą nuo suporavimo iki suaugusių žuvų ėminių ėmimo.

1 lentelė

MEOGRT bandymo vertinamųjų baigčių apžvalga (*)

Gyvenimo stadija	Vertinamoji baigtis	Karta
Embrionai (2 s. p. a.)	Išsiritimas (% ir laikas iki išsiritimo)	F1, F2
Jaunikliai (4 s. p. a.)	Išgyvenamumas	F1
Nesuaugusios žuvys (9 ar 10 s. p. a.)	Išgyvenamumas	F1
	Augimas (ilgis ir masė)	
	Vitelogeninas (mRNR arba baltymas)	
	Antriniai lytiniai požymiai (analinio peleko gumburėliai)	
	Lyčių santykis pagal išorinius požymius	
	Laikas iki pirmojo neršto	
Suaugusios žuvys (12–14 s. p. a.)	Reprodukcija (vislumas ir vaisingumas)	F0, F1
Suaugusios žuvys (15 s. p. a.)	Išgyvenamumas	F1
	Augimas (ilgis ir masė)	
	Antriniai lytiniai požymiai (analinio peleko gumburėliai)	
	Histopatologija (lytinių liaukų, kepenų, inkstų)	

(*) Šios vertinamosios baigtys turi būti statistiškai analizuojamos.

TVARKARAŠTIS

51. MEOGRT bandymo tvarkaraštis parodytas 2 lentelėje. Per MEOGRT bandymą 4 savaites bandomąja medžiaga veikiamos F0 kartos suaugusios žuvys ir 15 savaičių – F1 kartos žuvys, o antrosios kartos (F2) veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis trunka iki išsiritimo (2 s. p. a.). MEOGRT bandymo metu vykdoma veikla apibendrinta 9 priedėlyje.

2 lentelė

MEOGRT bandymas: veikimo bandomąja medžiaga ir vertinamųjų baigčių matavimo tvarkaraštis

MEOGRT veikimo bandomąja medžiaga ir vertinamųjų baigčių tvarkaraštis

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Bandymo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Gyvenimo stadija (sutartinės spalvos)					**Embrionai**					**Lervos**					**Jaunikliai**			**Nesuaugusios žuvys**	**Suaugusios žuvys**
Vertinamosios baigtys																			
Vislumas	F_0														F_1				
Vaisingumas	F_0														F_1				
Išsiritimas					F_1														F_2
Išgyvenamumas						F_1						F_1						F_1	
Augimas				F_0								F_1						F_1	
Vitelogeninas												F_1							
Antrinė lytis												F_1						F_1	
Histopatologija																		F_1	
Bandymo savaitė	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Bandymo planas apima 7 kartotinių bandinių grupes
  - 5 grupės – cheminės medžiagos dozių bandomosios grupės
  - 2 grupės kontroliniams bandiniams (4 grupės, jei naudojamas tirpiklis)
- Grupės vidaus sandara
  - 12 kartotinių bandinių skiriama reprodukcijai, suaugusių žuvų patologijai ir ALP tirti (10–18 sav.)
  - 6 kartotiniai bandiniai skiriami išsiritimui, išgyvenamumui, *Vtg*; taip pat nesuaugusių žuvų ALP ir augimui tirti (1–9 sav.)

ALP – antriniai lytiniai požymiai; sav. – savaitės;
VTG – vitelogeninas.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Statistinė analizė

52. Kadangi nustatoma visų bandymui naudojamų žuvų genotipinė lytis, kiekvienos genotipinės lyties (t. y. XY patinų ir XX patelių) duomenys turėtų būti analizuojami atskirai. Jei to nebus daroma, labai sumažės bet kokios analizės statistinė galia. Statistines duomenų analizes patartina atlikti pagal procedūras, aprašytas EBPO dokumente dėl ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės dabartinių metodų (taikymo gairėse) (32). 10 priedėlyje pateikta daugiau rekomendacijų dėl statistinės analizės.

53. Bandymo planas ir statistinių kriterijų pasirinkimas turėtų būti tokie, kad būtų galima pakankamai patikimai nustatyti biologiškai svarbius vertinamųjų baigčių pokyčius, kai ataskaitoje reikia pateikti NOEC (32). Reikiamų poveikio koncentracijos verčių ir parametrų pateikimas ataskaitose gali priklausyti nuo reglamentavimo sistemos. Turėtų būti nustatytas kiekvienos vertinamosios baigties procentinis pokytis, kurį svarbu aptikti arba apskaičiuoti. Kad tai būtų įmanoma, reikėtų atitinkamai priderinti bandymo planą. Nėra tikėtina, kad visų vertinamųjų baigčių procentinis pokytis būtų toks pats, taip pat nėra tikėtina, kad būtų praktiškai įmanoma suplanuoti tokį bandymą, kuris atitiktų šiuos kriterijus dėl visų vertinamųjų baigčių, todėl svarbu, tinkamai planuojant bandymą, sutelkti dėmesį į tas vertinamąsias baigtis, kurios yra svarbios tam bandymui. 10 priedėlyje pateikta statistinė struktūrinė diagrama ir rekomendacijos, kurios turėtų padėti apdoroti duomenis ir pasirinkti tinkamiausią statistinį kriterijų arba modelį. Galima taikyti ir kitus statistinius metodus, jei jie yra moksliškai pagrįsti.

54. Būtina analizuoti variacijas kiekvienoje kartotinių bandinių grupėje, atliekant dispersinės analizės ar faktorinės analizės lentelės procedūras, ir naudoti pakankamai tinkamų statistinės analizės metodų remiantis šia analize. Kad būtų galima keleriopai palyginti atskirų koncentracijų bandinių ir kontrolinių bandinių rezultatus, rekomenduojama atlikti žingsnio žemyn procedūrą (pvz., taikant Jonckheere-Terpstra kriterijų) tiriant tolydžiuosius atsakus. Kai duomenys neatitinka monotoniško koncentracijos ir atsako priklausomybės ryšio, turėtų būti taikomas Dunnett'o kriterijus arba Dunn'o kriterijus (po tinkamos duomenų transformacijos, jei ji reikalinga).

55. Vislumo tyrimui ikrai skaičiuojami kas dieną, tačiau analizuojamas gali būti bendras ikrų skaičius arba pakartotinių skaičiavimų duomenys. 10 priedėlyje išsamiai parodyta, kaip analizuojama ši vertinamoji baigtis. Histopatologiniams duomenims, kurie pateikiami kaip poveikio stiprumo balai, sukurtas naujas statistinis kriterijus, Rao-Scott'o patikslintas Cochran-Armitage'o trendo kriterijus pagal pjūvius (angl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*, RSCABS) (33).

56. Ataskaitoje reikėtų pranešti apie bet kokias bandomosios cheminės medžiagos paveiktose bandomosiose grupėse nustatytas vertinamąsias baigtis, kurios reikšmingai skiriasi nuo atitinkamų kontrolinių grupių.

Aktualūs duomenų analizės aspektai

Reikalavimų neatitinkančių dozių bandomųjų grupių naudojimas

57. Nustatant, ar kuriame nors kartotiniame bandinyje arba visoje bandomojoje grupėje yra aiškaus toksiškumo požymių ir jų nereikėtų įtraukti į analizę, svarbu atsižvelgti į kelis veiksnius. Aiškus toksiškumas apibrėžiamas kaip > 4 gyvūnų žūtys bet kuriame kartotiniame bandinyje nuo 3 s. p. a. iki 9 s. p. a., kurių negalima paaiškinti technine klaida. Kiti aiškaus toksiškumo požymiai yra kraujavimas, neįprastas elgesys, nenormalūs plaukimo judesiai, nesimaitinimas ir bet kokie kiti klinikiniai ligos požymiai. Dėl nemirtinų toksiškumo požymių gali reikėti atlikti kokybinius vertinimus ir jie visada turėtų būti atliekami lyginant su skiedimo vandens kontroline grupe (kuriai naudotas tik švarus vanduo). Jei nustatomas aiškus toksiškumas didžiausios dozės bandomojoje grupėje arba grupėse, rekomenduojama tų bandomųjų grupių neįtraukti į analizę.

Tirpiklio kontroliniai bandiniai

58. Tirpiklio naudojimas turėtų būti laikomas tik kraštutine priemone, kai jau apsvarstyti visi kiti galimi cheminės medžiagos tiekimo būdai. Jei naudojamas tirpiklis, kartu turėtų būti naudojamas skiedimo vandens kontrolinis bandinys. Baigus bandymą turėtų būti įvertintas galimas tirpiklio poveikis. Tai daroma atliekant tirpiklio kontrolinės grupės ir skiedimo vandens kontrolinės grupės statistinį palyginimą. Svarbiausios vertinamosios baigtys, į kurias reikia atsižvelgti atliekant šią analizę, yra augimo parametrai (masė), nes jie gali būti paveikti bendrojo toksiškumo. Jei nustatoma statistiškai reikšmingų šių vertinamųjų baigčių skirtumų tarp skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių grupių, reikėtų, vadovaujantis profesine nuovoka, nuspręsti, ar tai kenkia bandymo tinkamumui. Jei abi kontrolinės grupės skiriasi, cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes reikėtų palyginti su tirpiklio kontroline grupe, nebent būtų žinoma, kad geriau atlikti palyginimą su skiedimo vandens kontroline grupe. Jei nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp abiejų kontrolinių grupių, rekomenduojama bandomosios cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes palyginti su jungtinėmis (tirpiklio ir skiedimo vandens) kontrolinėmis grupėmis, nebent būtų žinoma, kad geriau būtų lyginti tik su skiedimo vandens ar tik su tirpiklio kontroline grupe.

Bandymo ataskaita

59. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga: fizinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt. (įskaitant bendrosios organinės anglies kiekį, jei tinka).

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis apibūdinimas: cheminė tapatybė (žr. pirmiau), kiekybinė sudėtis ir svarbios sudedamųjų dalių fizikinės ir cheminės savybės.

Bandomųjų gyvūnų rūšis:

— mokslinis pavadinimas, padermė (jei žinoma), gavimo šaltinis ir apvaisintų ikrų surinkimo metodas bei vėlesnis apdorojimas.

Bandymo sąlygos:

— apšvietimo laikotarpis (-iai);

— bandymo planas (pvz., kamerų dydis, medžiaga ir vandens tūris, bandymo kamerų ir kartotinių bandinių skaičius, išsiritusių lervų skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje);

— pradinių tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpiklį ir jo koncentraciją, kai jis naudojamas);

— bandomosios cheminės medžiagos dozavimo metodas (pvz., siurbliai, skiedimo sistemos);

— regeneravimo našumas pagal šį metodą ir ir nominaliosios bandymui naudojamos koncentracijos vertės, kiekybinio nustatymo riba, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai bandymo induose bei metodas, pagal kurį jie nustatyti, taip pat įrodymas, kad tie matavimai parodo bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas realiame tirpale;

— skiedimo vandens savybės: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, bendras chloro kiekis (jei matuojamas), bendroji organinė anglis (jei matuojama), suspenduotos kietosios dalelės (jei matuojamos), bandymo terpės druskingumas (jei matuojamas) ir bet kokie kiti atlikti matavimai;

— nominaliosios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai;

— bandymų induose esančio vandens kokybė, pH, kietumas, temperatūra (matuojama kasdien) ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie šėrimą (pvz., pašarų rūšis, šaltinis, duodamas kiekis ir dažnis).

Rezultatai:

— įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka bendruosius tinkamumo patvirtinimo kriterijus;

— šie kontrolinės grupės (ir tirpiklio kontrolinės grupės, kai ji naudojama) duomenys: F1 ir F2 kartų gyvūnų išsiritimas ir laikas iki išsiritimo, F1 išgyvenamumas po išsiritimo, F1 augimas (kūno ilgis ir masė), F1 genotipinė lytis ir lytinė diferenciacija (pvz., antriniai lytiniai požymiai, remiantis analinio peleko gumburėliais ir lytinių liaukų histologija), F1 fenotipinė lytis, F1 antriniai lytiniai požymiai (analinio peleko gumburėliai), F1 *vtg* mRNR (ar VTG baltymas), F1 histopatologinis (lytinių liaukų, kepenų ir inkstų) vertinimas, F0 ir F1 reprodukcija (vislumas ir vaisingumas) (žr. 1 ir 2 lenteles);

— statistinės analizės metodas (regresinė analizė ar dispersinė analizė) ir duomenų apdorojimas (taikyti statistiniai kriterijai ir modeliai);

— nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) vertinant kiekvieną atsaką;

— mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) vertinant kiekvieną atsaką (kai p = 0,05); kiekvieno vertinto atsako ECx vertė, jei taikoma, ir pasikliautinieji intervalai (pvz., 90 % ar 95 %), taip pat jos apskaičiavimui naudoto priderinto modelio grafikas, koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės krypties koeficientas, regresijos modelio formulė, įvertinti modelio parametrai ir jų standartinės paklaidos;

— bet koks nukrypimas nuo šio bandymo metodo ir nukrypimai nuo priimtinumo kriterijų ir apsvarstytas galimas to poveikis bandymo rezultatui.

60. Teikiant vertinamųjų baigčių matavimų rezultatus turėtų būti pateiktos vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai (jei įmanoma, tiek kartotinio bandinio, tiek koncentracijos vertės pagrindu).

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 D. E., Yuen B., Law S., Kullman S. W., Johnson R., Hardman R. C., Flynn K. and Au D. W. T. (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 D. A., Mattson V. R., Olson D. L. (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 I. J., 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*. Paskelbta 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 T. H., Shillabeer N., Winter M. J. and Pickford D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69-92.

(17) Denny J. S, Spehar R. L, Mead K. E and Yousuff S. C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger C. S., Teh S. J. and Hinton D. E. (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) Šio priedo C.15 skyrius. Trumpalaikio toksiškumo žuvims bandymas embriono ir trynio maišelio stadijose.

(22) Šio priedo C.37 skyrius. 21 dienos trukmės žuvų tyrimas. Trumpalaikis estrogeninio bei androgeninio veikimo ir aromatazės slopinimo atrankos tyrimas.

(23) Šio priedo C.41 skyrius. Žuvų lytinio vystymosi bandymas.

(24) Šio priedo C.48 skyrius. Trumpalaikis žuvų reprodukcijos tyrimas.

(25) Šio priedo C.47 skyrius. Toksiškumo ankstyvųjų gyvenimo stadijų žuvims bandymas.

(26) Šio priedo C.49 skyrius. Ūmaus toksiškumo žuvų embrionams (FET) bandymas.

(27) Wheeler J. R., Panter G. H., Weltje L. and Thorpe K. L. (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* (šio leidinio priedai parengti kaip atskiras dokumentas), OECD Publishing, Paris.

(33) Green J. W., Springer T. A., Saulnier A. N. and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

1 Priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

IFA (angl. ELISA) – imunofermentinė analizė.

Vislumas – ikrų skaičius.

Vaisingumas – gyvybingų ikrų skaičius, padalytas iš vislumo vertės.

Ilgis iki šakutės (angl. *fork length,* FL) – ilgis nuo snukio galo iki uodeginio peleko vidurinių spindulių galo, naudojamas matuojant žuvis, kurių stuburo pabaigą sunku nustatyti (www.fishbase.org).

Išsiritimas – išsiritusių lervų skaičius, padalytas iš embrionų, įdėtų į inkubatorių, skaičiaus.

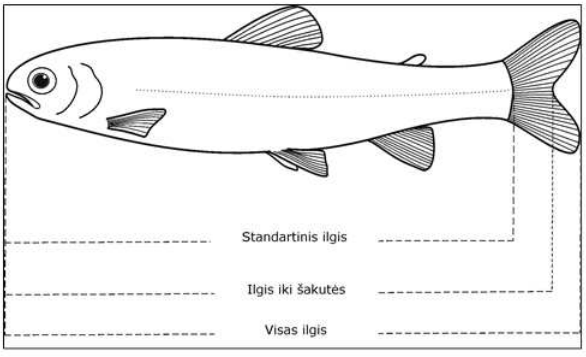
IACUC – Institucinis gyvūnų priežiūros ir naudojimo komitetas.

Standartinis ilgis (angl. *standard length,* SL) – žuvies ilgis, išmatuotas nuo snukio galo iki paskutiniojo slankstelio užpakalinio galo arba iki stuburo plokštės mediolateralinės dalies užpakalinio galo. Kitaip tariant, į šį matmenį neįtrauktas uodeginio peleko ilgis (www.fishbase.org).

Visas ilgis (angl. *total length,* TL) – ilgis nuo snukio galo iki uodeginio peleko ilgesnės mentės galo, paprastai matuojamas mentes prispaudus išilgai vidurio linijos. Tai yra tiesinis matmuo, matuojamas ne per kūno išlinkį (www.fishbase.org).

1 diagrama.

Įvairių naudojamų ilgio matų apibūdinimas.



ECx (x % poveikio sukelianti koncentracija) – koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per tam tikrą veikimo bandomąja medžiaga laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC50 yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, per tam tikrą nustatytą jos ekspozicijos laikotarpį padaro poveikį bandymo vertinamajai baigčiai pusėje (50 %) paveiktos populiacijos.

Pratekamosios srovės bandymas – toks bandymas, kai per bandymo sistemą visu bandomosios medžiagos poveikio laikotarpiu teka nuolatinis bandymo tirpalų srautas.

HPG ašis – pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

IUPAC – Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga.

Įkrova – drėgna žuvų masė vandens tūrio vienete.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomoji cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebėtas statistiškai reikšmingas jos poveikis (esant $p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe. Tačiau visų LOEC viršijančių bandomosios medžiagos koncentracijų kenksmingas poveikis turėtų būti lygus LOEC poveikiui arba už jį didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, reikėtų išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė. Rekomendacijų dėl to pateikta 5 ir 6 priedėliuose.

Vidutinė mirtina koncentracija (LC50) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant, kaip įvertinta, per visą bandymą žūsta 50 % bandomųjų organizmų.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios medžiagos koncentracija, kiek mažesnė už LOEC, kuri, palyginti su kontroline grupe, per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$).

SMILES – supaprastinto molekulių pateikimo linijine forma specifikacija (angl. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Žuvų laikymo tankis – žuvų skaičius vandens tūrio vienete.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

VTG – vitelogeninas, fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris paprastai gaminamas visų kiaušinius dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

s. p. a. – savaitės po apvaisinimo.

2 Priedėlis

KAI KURIOS SKIEDIMUI TINKAMO VANDENS CHEMINĖS SAVYBĖS

Medžiaga	Ribinė koncentracija
Kietosios dalelės	5 mg/l
Bendroji organinė anglis	2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
Bendras chloro kiekis	10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	25 ng/l
Aliuminis	1 µg/l
Arsenas	1 µg/l
Chromas	1 µg/l
Kobaltas	1 µg/l
Varis	1 µg/l
Geležis	1 µg/l
Švinas	1 µg/l
Nikelis	1 µg/l
Cinkas	1 µg/l
Kadmis	100 ng/l
Gyvsidabris	100 ng/l
Sidabras	100 ng/l

3 Priedėlis

MEOGRT BANDYMO SĄLYGOS

1. Rekomenduojama rūšis	Japoninė medaka (*Oryzias latipes*)
2. Bandymo tipas	Pratekamosios srovės
3. Vandens temperatūra	Nominalioji bandymo temperatūra yra 25 °C. Vidutinė temperatūra per visą bandymą kiekviename inde yra 24–26 °C.
4. Apšvietimo kokybė	Liuminescencinės lempos (plataus spektro ir ~150 liumenų/m^2) (~150 lux)
5. Apšvietimo trukmė	16 val. šviesos, 8 val. tamsos laikotarpis
6. Įkrova	F0 – po 2 suaugusias žuvis kartotiniame bandinyje; F1 – iš pradžių ne daugiau kaip po 20 ikrų (embrionų) kartotiniame bandinyje, išsiritus sumažinama iki 12 embrionų kartotiniame bandinyje, o vėliau po 2 suaugusias žuvis (XX-XY veislinė pora), 9–10 s. p. a., laikoma kartu reprodukcijos etapui
7. Mažiausias bandymo kameros naudojamasis tūris	1,8 l (pvz., bandymo kameros dydis 18x9x15 cm)
8. Bandymo tirpalų tūrio keitimas	Visas tūris pakeičiamas ne mažiau kaip 5 kartus per parą, daugiausia iki 16 kartų per parą (arba palaikomas 20 ml/min. srautas)
9. Bandomųjų organizmų amžius bandymo pradžioje	F0: >12 s. p. a., bet rekomenduojama ne daugiau kaip 16 s. p. a.
10. Organizmų skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje	F0: 2 žuvys (patino ir patelės pora); F1: ne daugiau kaip 20 žuvų (ikrų) kiekviename kartotiniame bandinyje (gautų iš F0 ir F1 veislinių porų)
11. Bandomųjų grupių skaičius	5 bandomosios cheminės medžiagos dozių bandomosios grupės ir tinkama kontrolinė grupė arba grupės
12. Kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje	Ne mažiau kaip 6 kartotiniai bandiniai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir ne mažiau kaip 12 kartotinių bandinių kontrolinėje grupėje ir tirpiklio kontrolinėje grupėje, jei ji naudojama (kartotinių bandinių skaičius padvigubinamas F1 reprodukcijos etape)
13. Bandymui naudojamų organizmų skaičius	Mažiausiai 84 F0 kartos žuvys ir 504 F1 kartos žuvys (jei naudojama tirpiklio kontrolinė grupė, bandymui naudojamos 108 F0 kartos žuvys ir 648 F1 kartos žuvys). Skaičiuojamas vienetas yra individas po eleuteroembriono stadijos.
14. Šėrimo režimas	Žuvys šeriamos sūriavandenėmis krevetėmis *Artemia* spp. (24 valandų amžiaus nauplijais) iki soties ir, jei reikia, papildomai pirktiniais žuvų pašaro dribsniais (tinkamo šėrimo režimo, kad būtų užtikrintas pakankamas augimas ir vystymasis, taigi sėkminga reprodukcija, pavyzdys pateiktas 5 priedėlyje).
15. Aeravimas	Neaeruojama, nebent ištirpusio deguonies kiekis sumažėtų iki < 60 % oro soties vertės.
16. Skiedimo vanduo	Švarus paviršinių telkinių, gręžinio ar regeneruotas vanduo arba vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras.

17. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis	Preliminariai 19 savaičių (nuo F0 iki F2 išsiritimo)
18. Biologinės vertinamosios baigtys (pirminės)	išsiritimas (F1 ir F2); išgyvenamumas (F1, nuo išsiritimo iki 4 s. p. a. (lervos stadijos pabaigos, jauniklio stadijos pradžios), nuo 4 iki 9 (ar 10) s. p. a. (nuo jauniklio stadijos pradžios iki nesuaugusios žuvies) ir nuo 9 iki 15 s. p. a. (nuo nesuaugusios iki suaugusios žuvies, iki likvidavimo)); augimas (F1, ilgis ir masė 9 ir 15 s. p. a.); antriniai lytiniai požymiai (F1, analinio peleko gumburėliai 9 ir 15 s. p. a.); vitelogeninas (F1, *vtg* mRNR ar VTG baltymas 15 s. p. a.); fenotipinė lytis (F1, nustatyta per lytinių liaukų histologinį tyrimą 15 s. p. a.); reprodukcija (F0 ir F1, vislumas ir vaisingumas 21 dieną); laikas iki neršto (F1); ir histopatologija (F1, lytinių liaukų, kepenų ir inkstų 15 s. p. a.)
19. Bandymo tinkamumo kriterijai	Vandenyje ištirpęs deguonis sudaro ≥ 60 % oro soties vertės; vidutinė vandens temperatūra 24–26 ^{O}C per visą bandymą; sėkminga ≥ 65 % patelių reprodukcija kontrolinėje (-ėse) grupėje (-ėse); vidutinis vislumas ≥ 20 ikrų per dieną kontrolinėje (-ėse) grupėje (-ėse); išsiritimas ≥80 % (vidutinis) kontrolinėse grupėse (ir F1, ir F2 kartos); išgyvenamumas po išsiritimo iki 3 s. p. a. ≥80 % (vidutinis) ir nuo 3 s. p. a. iki tos kartos likvidavimo ≥90 % (vidutinis) kontrolinėse grupėse (F1); bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale turėtų būti tinkamai palaikomos ±20 % vidutinių išmatuotų verčių tikslumu.

4 priedėlis

REKOMENDACIJOS DĖL ĮPRASTŲ KONTROLINIŲ VERČIŲ

Reikėtų pažymėti, kad šios kontrolinės vertės nustatytos remiantis tik keliais tinkamumo patvirtinimo tyrimais ir gali būti keičiamos, atsižvelgiant į tolesnę patirtį.

Augimas

Išmatuojami visų žuvų, paimtų ėminiams 9 (ar 10) ir 15 savaitę po apvaisinimo (s. p. a.), ilgis ir masė. Pagal šį protokolą turėtų būti gauta tokia šlapio kūno masė: 9 s. p. a. patinų 85–145 mg, patelių 95–150 mg. 15 s. p. a. patinų masė turėtų būti 250–330 mg, patelių 280–350 mg. Nors pavienės žuvys gali nemažai nukrypti nuo šių intervalų, jei vidutinė kontrolinių žuvų masė labai nuo jų nutoltų, ypač jei ji būtų mažesnė, tai reikštų, kad yra problemų, susijusių su šėrimu, temperatūros kontrole, vandens kokybe, ligomis arba keliais iš šių veiksnių.

Išsiritimas

Išsiritimo sėkmė kontrolinėse grupėse paprastai yra apie 90 %, tačiau neretai šios vertės yra mažesnės, net apie 80 %. Jei išsiritimo sėkmė mažesnė nei 75 %, tai gali reikšti, kad besivystantys ikrai nepakankamai judinami ar nepakankamai atsargiai tvarkomi, pavyzdžiui, laiku nepašalinus negyvų ikrų gali įsiveisti grybelinė infekcija.

Išgyvenamumas

Išgyvenamumo lygis nuo išsiritimo iki 3 s. p. a. ir po 3 s. p. a. kontrolinėse grupėse paprastai yra 90 % arba didesnis, tačiau net kai išgyvenamumas ankstyvose gyvenimo stadijose yra mažesnis ir siekia 80 %, tai dar nėra priežastis nerimauti. Jei išgyvenimo lygis kontrolinėse grupėse yra mažesnis nei 80 %, vertėtų dėl to susirūpinti – tai gali reikšti, kad akvariumai nepakankamai valomi, todėl žuvų lervos žūsta dėl ligų ar uždūsta dėl per mažo vandenyje ištirpusio deguonies kiekio. Gaištamumas gali padidėti ir dėl sužalojimų, patiriamų, kai valomi indai, ir dėl žuvų lervų įtraukimo į indo vandens nuleidimo sistemą.

Vitelogenino genas

Nors absoliutieji *vitelogenino* (*vtg*) geno kiekiai, išreiškiami kaip jo kopijos/ng iš visos mRNR, gali būti įvairiose laboratorijose nustatomi labai skirtingi dėl jose naudojamų procedūrų arba instrumentų, santykinis *vtg* kiekis kontrolinių patelių organizme turėtų būti apie 200 kartų didesnis nei kontrolinių patinų. Neretai šis santykis yra net 1 000–2 000, tačiau mažesnis nei 200 santykis yra abejotinas ir gali reikšti, kad yra problemų dėl ėminių užteršimo ar dėl atliekamos procedūros ir (arba) naudojamų reagentų.

Antriniai lytiniai požymiai

Patinų antrinių lytinių požymių, apibrėžiamų kaip bendras analinio peleko gumburėlių segmentų peleko spinduliuose skaičius, normalus intervalas yra 40–80 segmentų 9–10 s. p. a. Iki 15 s. p. a. šis intervalas (kontrolinių patinų) turėtų pasiekti apie 80–120, o kontrolinių patelių – 0. Dėl neaiškių priežasčių retais atvejais kai kurie patinai dar neturi gumburėlių iki 9 s. p. a., bet kadangi visų kontrolinių patinų peleko gumburėliai išauga iki 15 s. p. a., taip tikriausiai yra dėl pavėluoto vystymosi. Kai peleko gumburėlių turi kontrolinės patelės, tai reiškia, kad toje populiacijoje yra XX patinų.

XX patinai

Normalus bendras XX patinų buvimo dažnis auginamų žuvų kultūroje, atrodo, yra apie 4 % arba mažesnis esant 25 °C temperatūrai; temperatūrai didėjant tokių atvejų dažnėja. Reikėtų imtis priemonių, kad XX patinų dalis populiacijoje būtų minimali. Kadangi atrodo, jog XX patinų buvimas turi genetinį komponentą, taigi yra paveldimas, jų dažnį populiacijoje galima veiksmingai sumažinti stebint pradinę žuvų kultūrą ir užtikrinant, kad jos dauginimui nebūtų naudojami XX patinai.

Neršto eiga

Prieš atliekant vislumo vertinimą turėtų būti kiekvieną dieną stebima neršto eiga kontroliniuose kartotiniuose bandiniuose. Kontrolines poras galima kokybiškai įvertinti apžiūrint, ar nėra požymių, kad vyksta nerštas. Iki 12–14 s. p. a. turėtų pradėti neršti dauguma kontrolinių porų. Jei iki šio laiko pradėjusių neršti porų yra nedaug, tai reiškia, kad gali būti problemų, susijusių su žuvų sveikata, branda ar gerove.

Vislumas

Sveikos, gerai šeriamos 12–14 s. p. a. medakos paprastai neršia kasdien, apie 15–50 ikrų per dieną. 16 iš rekomenduojamų 24 kontrolinių veislinių porų (>65 %) ikrų dėjimas turėtų būti daugiau kaip 20 ikrų vienai porai per dieną ir gali siekti net apie 40 ikrų per dieną. Mažesnis skaičius gali reikšti, kad veislinės poros yra nesubrendusios, nepakankamai gerai šeriamos ar ligotos.

Vaisingumas

Kontrolinių neršiančių porų apvaisintų ikrų procentinė dalis paprastai yra apie 90 %, o neretai net iki 95 % ar didesnė. Kai kontrolinių porų ikrų apvaisinimas yra mažesnis nei 80 %, tai yra įtartina ir gali reikšti, kad tie individai yra nesveiki arba jų auginimo sąlygos nėra idealios.

5 priedėlis

ŠĖRIMO REŽIMO PAVYZDYS

Tinkamo šėrimo režimo, kad būtų užtikrintas pakankamas augimas ir vystymasis, taigi sėkminga reprodukcija, pavyzdys pateiktas 1 lentelėje. Nukrypimai nuo šio šėrimo režimo gali būti priimtini, tačiau patartina tuos pakeitimus išbandyti ir įsitikinti, kad palaikomas tinkamas augimas ir dauginimasis. Siekiant laikytis siūlomo šėrimo režimo reikia prieš pradedant bandymą nustatyti sausą sūriavandenių krevečių masę viename sūriavandenių krevečių suspensijos tūrio vienete. Tai galima nustatyti pasveriant iš tam tikro sūriavandenių krevečių suspensijos tūrio vieneto gautą sausą masę, 24 valandas džiovintą 60 °C temperatūroje, iš anksto pasvertose lėkštelėse. Siekiant atsižvelgti į suspensijoje esančių druskų masę, tokį patį to paties druskos tirpalo, kuris naudojamas krevečių suspensijai, tūrio vienetą taip pat reikėtų išdžiovinti, pasverti ir jo masę atimti iš išdžiovintos sūriavandenių krevečių suspensijos masės, arba sūriavandenes krevetes galima nukošti ir nuplauti distiliuotu vandeniu prieš išdžiovinant, kad nereikėtų papildomai sverti vien druskos ėminio. Ši informacija naudojama perskaičiuojant lentelėje pateiktą informaciją iš sausos sūriavandenių krevečių masės į sūriavandenių krevečių suspensijos, kuri bus naudojama kiekvienai žuviai šerti, tūrį. Be to, rekomenduojama kartą per savaitę pasverti sūriavandenių krevečių suspensijos alikvotines dalis ir įsitikinti, kad žuvims šerti naudojamas reikiamas sūriavandenių krevečių sausos masės kiekis.

1 lentelė.

Šėrimo režimo pavyzdys

Laikas (po išsiritimo)	Sūriavandenės krevetės (sausos masės mg 1 žuviai per dieną)
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

Laikas (po išsiritimo)	Sūriavandenės krevetės (sausos masės mg 1 žuviai per dieną)
14 diena	4,8
15 diena	5,2
16–21 dienos	5,6
4 savaitė	7,7
5 savaitė	9,0
6 savaitė	11,0
7 savaitė	13,5
8 savaitė – iki numarinimo	22,5

6 priedėlis

IKRŲ INKUBAVIMO KAMEROS PAVYZDŽIAI

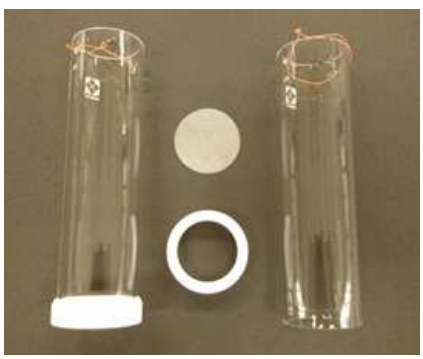
A pavyzdys





Šis inkubatorius sudarytas iš nupjauto stiklinio centrifugavimo mėgintuvėlio, prijungto nerūdijančio plieno mova ir pritvirtinto užsukamuoju centrifugos kamšteliu. Per šį kamštelį į vidų įkištas mažas stiklinis arba nerūdijančio plieno vamzdelis, siekiantis arti išgaubto dugno; per jį nesmarkiai pučiami oro burbulai, taip suspenduojant ikrus ir sumažinant saprofitinių grybinių infekcijų perdavimą tarp ikrų, o kartu palengvinant cheminių medžiagų apykaitą tarp inkubatoriaus ir indo, kuriame jis laikomas.

B pavyzdys





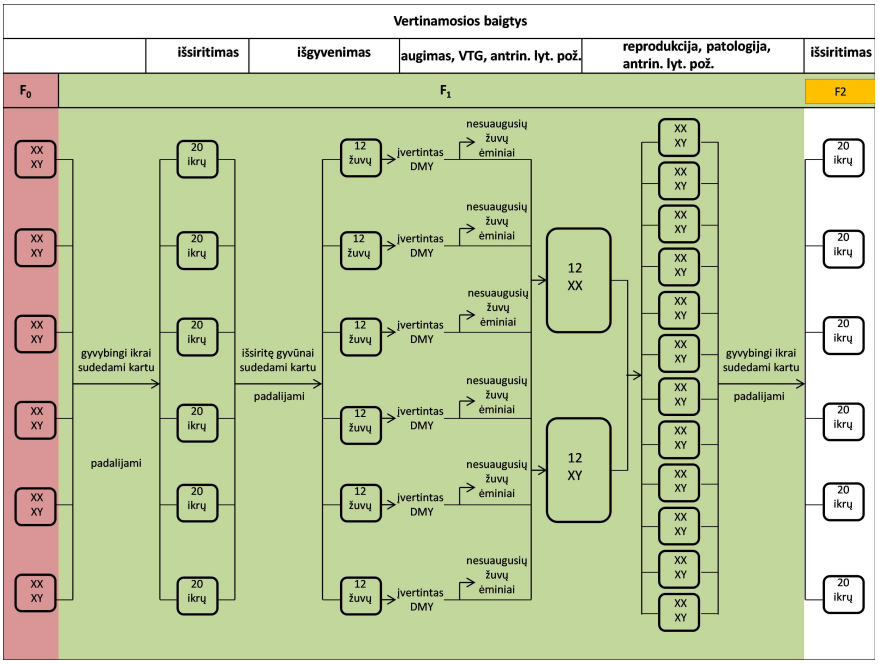
Šis inkubatorius sudarytas iš stiklinio cilindro (5 cm skersmens ir 10 cm aukščio) ir nerūdijančio plieno tinklelio (0,25 φ ir 32 dydžio tinklelis), kuris pritvirtinamas prie cilindro dugno PTFE žiedu. Inkubatoriai su medakų ikrais pakabinami ant laikančiosios sijos, įleidžiami į indus ir vertikaliai purtomi (apie 5 cm amplitude) tinkamu ciklu (maždaug kas 4 sekundes).

7 priedėlis

KARTOTINIŲ BANDINIŲ SUJUNGIMO IR SUDARYMO SCHEMA PAGAL MEOGRT BANDYMO METODĄ

1 diagrama.

Kartotinių bandinių sujungimas ir pakartotinis sudarymas atliekant MEOGRT bandymą. Šioje diagramoje parodyta viena bandomoji grupė arba ½ kontrolinės grupės. Kadangi kartotiniai bandiniai sujungiami, juose esantys gyvūnai nėra nuolat identifikuojami per visą bandymą. Atminkite, kad „ikrais“ vadinami gyvybingi, apvaisinti ikrai (lygiaverčiai embrionams).



Bandomųjų grupių ir kartotinių bandinių paruošimas

Pagal šį bandymo metodą rekomenduojama sudaryti penkių bandomosios cheminės medžiagos dozių bandomąsias grupes naudojant techniškai gryną medžiagą ir neigiamą kontrolinį bandinį. Kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje per visą MEOGRT bandymą nėra pastovus, o kartotinių bandinių skaičius kontrolinėje grupėje yra dukart didesnis nei bet kurioje atskiroje bandomosios cheminės medžiagos bandomojoje grupėje. F0 kartos žuvų kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje yra šeši kartotiniai bandiniai, o neigiamoje kontrolinėje grupėje yra 12 kartotinių bandinių. Naudoti tirpiklių labai nerekomenduojama, o jeigu jie vis dėlto naudojami, ir tirpiklio naudojimą, ir jo pasirinkimą reikėtų pagrįsti MEOGRT ataskaitoje. Be to, jei naudojamas tirpiklis, reikalingi dviejų tipų kontroliniai bandiniai: a) tirpiklio kontrolinis bandinys ir b) neigiamas kontrolinis bandinys. Kiekvienoje iš šių dviejų kontrolinių grupių turėtų būti visas kartotinių bandinių komplektas visuose etapuose pagal MEOGRT bandymo tvarkaraštį. Per visą F1 kartos bandomųjų organizmų vystymosi procesą (ir F2 kartos, iki išsiritimo) ši kartotinių bandinių struktūra tebėra tokia pati. Tačiau suaugusių gyvūnų etape, kai sudaromos F1 veislinės poros, reprodukcinių porų kartotinių bandinių skaičių kiekvienoje bandomojoje grupėje geriausia padvigubinti; taigi yra iki 12 kartotinių porų kiekvienoje bandomosios cheminės medžiagos bandomojoje grupėje ir 24 kartotinės poros kontrolinėje grupėje (ir dar 24 kartotinės poros tirpiklio kontrolinėje grupėje, jei reikia). Išsiritimas iš F1 porų išneršių embrionų nustatomas esant tai pačiai kartotinių bandinių struktūrai kaip ir dėl F0 porų išneršių embrionų – tai reiškia, kad iš pradžių yra šeši kartotiniai bandiniai kiekvienoje bandomosios cheminės medžiagos bandomojoje grupėje ir 12 kartotinių bandinių kontrolinėje grupėje arba grupėse.

8 Priedėlis

ANALINIO PELEKO GUMBURĖLIŲ SKAIČIAVIMAS

Svarbiausios medžiagos ir reagentai

— Stereomikroskopas (gali būti su prijungtu fotoaparatu);

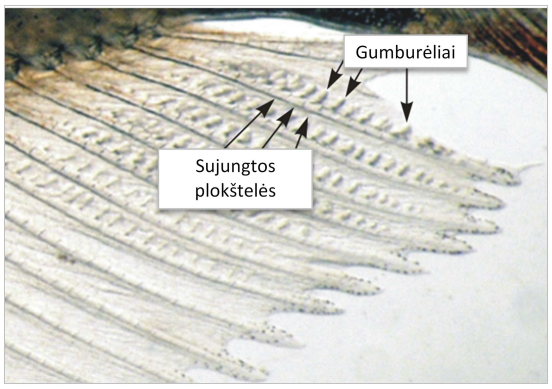
— fiksatorius, pvz., Davidson'o (Bouin'o fiksatoriaus naudoti nerekomenduojama), jei gumburėliai skaičiuojami ne iš nuotraukos.

Procedūros

Po skrodimo reikėtų padaryti analinio peleko atvaizdą, kad būtų galima patogiai suskaičiuoti analinio peleko gumburėlius. Nors rekomenduojamas metodas yra fotografavimas, analinį peleką galima užfiksuoti maždaug 1 minutę palaikant Davidson'o fiksatoriuje ar kitame tinkamame fiksavimo tirpale. Svarbu fiksuojamą analinį peleką laikyti paplokščią, kad būtų lengviau suskaičiuoti gumburėlius. Žuvies skerdeną su analiniu peleku galima laikyti Davidson'o fiksatoriuje ar kitame tinkamame fiksavimo tirpale iki analizės. Suskaičiuojamas sujungtų plokštelių (žr. **1 diagramą**) su gumburėliais, kyšančiais iš sujungtos plokštelės užpakalinės briaunos, skaičius.

1 diagrama.

Analinio peleko gumburėliai



9 priedėlis

IŠSAMUS MEOGRT BANDYMO TVARKARAŠTIS

1–3 bandymo savaitės (F0)

F0 kartos neršiančios žuvys, atitinkančios atrankos kriterijus (žr. 16–20 punktus), tris savaites veikiamos bandomąja chemine medžiaga, kad per tą laiką ji paveiktų besivystančias gametas ir lytinių liaukų audinius. Kiekviename kartotinio bandinio inde laikoma viena veislinių žuvų pora (veislinę porą sudaro XX patelė ir XY patinas). Išneršti ikrai renkami, skaičiuojami ir vaisingumas vertinamas 21 dieną iš eilės, pradedant nuo 1 bandymo dienos.

4 bandymo savaitė (F0 ir F1)

Patartina apvaisintus ir gyvybingus ikrus (embrionus) surinkti per vieną dieną, tačiau jei embrionų nepakanka, galima embrionus surinkti per dvi dienas. Jei embrionai surenkami per dvi dienas, visi per pirmąją dieną surinkti embrionai atitinkamose bandomosiose grupėse sudedami kartu su tais, kurie surinkti antrąją dieną. Tada visi kartu sudėti embrionai kiekvienoje bandomojoje grupėje atsitiktine tvarka paskirstomi į kiekvieną iš kartotinių bandinių inkubatorių, po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių. Apvaisintų ikrų (embrionų) žūstamumas tikrinamas ir užrašomas kiekvieną dieną. Negyvi ikrai šalinami iš inkubatorių (apvaisintų ikrų žūtį, ypač ankstyvose vystymosi stadijose, galima nustatyti iš pastebimai sumažėjusio skaidrumo ir pakitusios spalvos dėl baltymų koaguliacijos ir (arba) nusėdimo, kai atsiranda baltas matinis atspalvis; OECD (2010)).

Pastaba. Jei vienos bandomosios grupės ikrus reikia rinkti ir antrą dieną, tuomet visų bandomųjų grupių (įskaitant kontrolines grupes) ikrai turi būti renkami pagal šią procedūrą. Jei po antrosios rinkimo dienos kurioje nors bandomojoje grupėje yra surinkta nepakankamai embrionų, kad būtų galima įdėti po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių, toje konkrečioje bandomojoje grupėje embrionų skaičius sumažinamas iki 15 embrionų, dedamų į kiekvieną inkubatorių. Jei nepakanka embrionų, kad būtų galima įdėti po 15 embrionų į kiekvieną inkubatorių, kartotinių inkubatorių skaičių reikia sumažinti tiek, kad embrionų būtų pakankamai ir būtų galima dėti po 15 iš jų į kiekvieną inkubatorių. Papildomai galima įtraukti ir daugiau F0 kartos veislinių porų į kiekvieną bandomąją grupę ir kontrolines grupes, kad būtų gauta daugiau ikrų, siekiant surinkti rekomenduojamą skaičių – po 20 ikrų kiekviename kartotiniame bandinyje.

24 bandymo dieną F0 veislinių porų žuvys humaniškai numarinamos ir užrašomi jų masės ir ilgio duomenys. Jei reikia, F0 veislines poras galima laikyti papildomas 1–2 dienas, kad būtų galima iš naujo įveisti F1 kartą.

5–6 bandymo savaitės (F1)

Likus vienai arba dviem dienoms iki numatomo išsiritimo pradžios, sustabdykite arba sumažinkite inkubuojamų ikrų judinimą, kad paspartintumėte išsiritimą. Kadangi embrionai ritasi kiekvieną dieną, išsiritusios lervos sudedamos kartu kiekvienoje bandomojoje grupėje ir sistemingai paskirstomos į kiekvieną kartotinį konkrečios bandomosios grupės lervų laikymo indą, kuriame turi būti ne daugiau kaip 12 išsiritusių lervų. Tai daroma atsitiktine tvarka išrenkant išsiritusias lervas ir dedant po vieną lervą paeiliui į kartotinius bandinius vieną po kito, jų nesirenkant, eilės tvarka pripildant konkrečios bandomosios grupės kartotinius bandinius, kad visuose tos bandomosios grupės kartotiniuose bandiniuose būtų po 12 išsiritusių lervų. Jei išsiritusių lervų nepakanka visiems kartotiniams bandiniams pripildyti, reikia užtikrinti, kad pradedant F1 etapą būtų kuo daugiau kartotinių bandinių, kuriuose būtų po 12 išsiritusių lervų.

Ikrai, iš kurių dar nėra išsiritusios lervos per dukart ilgesnį laiką negu iki vidutinės (medianinės) kontrolinės išsiritimo dienos, laikomi negyvybingais ir pašalinami. Išsiritusių lervų skaičius užrašomas ir apskaičiuojama išsiritimo sėkmė (išsiritimas) kiekviename kartotiniame bandinyje.

7–11 bandymo savaitės (F1)

Žuvų lervų išgyvenimas visuose kartotiniuose bandiniuose kiekvieną dieną tikrinamas ir užrašomas. 43 bandymo dieną užrašomas kiekviename kartotiniame bandinyje išgyvenusių žuvų skaičius, taip pat pradinis į kartotinį bandinį įdėtų išsiritusių lervų skaičius (nominalusis skaičius 12). Taip galima apskaičiuoti procentinį išgyvenamumą nuo išsiritimo iki nesuaugusių žuvų stadijos.

12 bandymo savaitė (F1)

78–85 bandymo dienomis paimamas nedidelis ėminys iš kiekvienos žuvies uodeginio peleko, kad būtų galima nustatyti kiekvienos žuvies genotipinę lytį (t. y. iš pelekų nuokarpų). Ši informacija naudojama sudarant veislines poras.

Per tris dienas po to, kai nustatoma kiekvienos žuvies genotipinė lytis, atsitiktine tvarka sudaroma 12 veislinių porų kiekvienoje bandomojoje grupėje ir 24 poros kiekvienoje kontrolinėje grupėje. Atsitiktine tvarka išrenkama po dvi XX ir XY žuvis iš kiekvieno kartotinio bandinio, tada jos sudedamos kartu pagal lytį ir iš jų atsitiktinės atrankos būdu sudaroma veislinė pora (t. y. XX-XY pora). Sudaroma ne mažiau kaip 12 kartotinių bandinių kiekvienos cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir ne mažiau kaip 24 kartotiniai bandiniai kontrolinėje grupėje; kiekviename kartotiniame bandinyje yra viena veislinė pora. Jei kartotiniame bandinyje nėra dviejų XX ar dviejų XY žuvų, kurias būtų galima sudėti kartu, tuomet atitinkamos lyties genotipo žuvis reikėtų gauti iš kitų tos bandomosios grupės kartotinių bandinių.

Likusios žuvys (daugiausia 8 žuvys iš kiekvieno kartotinio bandinio) humaniškai numarinamos ir paimami ėminiai įvairioms nesuaugusių žuvų vertinamosioms baigtims tirti. Visų nesuaugusių žuvų ėminių geno *dmy* duomenys (XX ar XY) saugomi, siekiant užtikrinti, kad visus vertinamųjų baigčių duomenis būtų galima susieti su kiekvienos konkrečios žuvies genetine lytimi.

13–14 bandymo savaitės (F1)

Veikimas bandomąja medžiaga tęsiamas, kol nesuaugusių žuvų veislinės poros tampa suaugusiomis žuvimis. 98 bandymo dieną (t. y. vieną dieną prieš pradedant rinkti ikrus) iš akvariumų pašalinami ir nuo patelių nuimami visi ikrai.

15–17 bandymo savaitės (F1)

Išneršti ikrai kasdien renkami 21 dieną iš eilės kiekviename kartotiniame bandinyje, vertinamas vislumas ir vaisingumas.

18 bandymo savaitė (kartojama ta pati procedūra kaip ir 4 bandymo savaitę) (F1 ir F2)

120 bandymo dieną, ryte, surenkami ikrai iš kiekvieno kartotinio bandinio indo. Surinkti ikrai įvertinami ir apvaisinti kiekvienos veislinės poros ikrai (pašalinus juos jungiančias gijas) sudedami kartu kiekvienoje bandomojoje grupėje ir sistemingai paskirstomi į ikrų inkubavimo kameras – po 20 apvaisintų ikrų kiekviename inkubatoriuje. Inkubatorius galima sudėti į atskirus inkubatorių laikymo indus, paruoštus kiekvienai bandomajai grupei, arba į kartotinio bandinio indą, kuriame po išsiritimo bus laikomos išsiritusios lervos. Patartina, kad embrionai būtų surinkti per vieną dieną; tačiau jei embrionų nepakanka, embrionus galima surinkti per dvi dienas. Jei embrionai surenkami per dvi dienas, visi per pirmąją dieną surinkti embrionai atitinkamose bandomosiose grupėse sudedami kartu su tais, kurie surinkti antrąją dieną. Tada visi kartu sudėti embrionai kiekvienoje bandomojoje grupėje atsitiktine tvarka paskirstomi į kiekvieną iš kartotinių bandinių inkubatorių, po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių. Pastaba. Jei vienos bandomosios grupės ikrus reikia rinkti ir antrą dieną, tuomet visų bandomųjų grupių (įskaitant kontrolines grupes) ikrai turi būti renkami pagal šią procedūrą. Jei po antrosios rinkimo dienos kurioje nors bandomojoje grupėje yra surinkta nepakankamai embrionų, kad būtų galima įdėti po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių, toje konkrečioje bandomojoje grupėje embrionų skaičius sumažinamas iki 15 embrionų, dedamų į kiekvieną inkubatorių. Jei nepakanka embrionų, kad būtų galima įdėti po 15 embrionų į kiekvieną inkubatorių, kartotinių inkubatorių skaičių reikia sumažinti tiek, kad embrionų būtų pakankamai ir būtų galima dėti po 15 iš jų į kiekvieną inkubatorių.

121 bandymo dieną (arba 122 bandymo dieną, siekiant įsitikinti, kad sėkmingai įveista F2 karta), F1 veislinės poros humaniškai numarinamos ir analizuojamos tiriant suaugusių žuvų vertinamąsias baigtis. Jei reikia, F1 veislines poras galima laikyti papildomas 1–2 dienas, kad būtų galima iš naujo įveisti F2 kartą.

19–20 bandymo savaitės (F2)

Likus vienai arba dviem dienoms iki numatomo išsiritimo pradžios, sustabdykite arba sumažinkite inkubuojamų ikrų judinimą, kad paspartintumėte išsiritimą. Jei bandymas baigiamas tada, kai baigia išsiristi F2 karta, kiekvieną dieną išsiritusios lervos suskaičiuojamos ir pašalinamos (embrionai, kurie neišsirita per pratęstą inkubavimo laikotarpį, skaičiuojamą kaip dukart ilgesnė trukmė negu iki vidutinės (medianinės) išsiritimo kontrolės dienos, laikomi negyvybingais).

10 priedėlis

STATISTINĖ ANALIZĖ

Per MEOGRT bandymą gaunami tokio pobūdžio biologiniai duomenys, kurie yra būdingi ne vien šiam bandymui, ir yra sukurta daug tinkamų statistinių metodikų, pagal kurias galima tinkamai analizuoti panašius duomenis (išskyrus patologijų duomenis), priklausomai nuo tų duomenų savybių, įskaitant normalumą, dispersijos vienalytiškumą, ar pats tyrimo planas yra palankus hipotezės tikrinimui arba regresinei analizei, ar taikytini parametriniai, ar neparametriniai kriterijai, ir kt. Pagal bendrą principą siūlomos statistinės analizės atitinka EBPO rekomendacijas dėl ekotoksiškumo duomenų (EBPO, 2006), o 2 diagramoje pateikta MEOGRT duomenų analizės sprendimų priėmimo schema.

Daroma prielaida, kad dažniausiai duomenų rinkiniuose bus gaunami monotoniški atsakai. Papildomai reikėtų apsvarstyti klausimą, ar taikyti vienpusį statistinį kriterijų, ar dvipusį statistinį kriterijų. Jei nėra biologinių priežasčių, dėl kurių vienpusis kriterijus būtų netinkamas, siūloma taikyti vienpusius kriterijus. Nors tolesniame skirsnyje rekomenduojami tam tikri statistiniai kriterijai, jei būtų sukurta tinkamesnių ir (arba) didesnės galios statistinių metodų, taikytinų konkretiems per MEOGRT bandymą gautiems duomenims, tie statistiniai kriterijai būtų naudojami, siekiant pasinaudoti tais pranašumais.

MEOGRT duomenys turėtų būti analizuojami atskirai pagal genotipinę lytį. Lytį pakeitusių žuvų (XX patinų arba XY patelių) duomenis galima analizuoti pagal dvi strategijas: 1) atmesti visus lytį pakeitusių žuvų duomenis per visą bandymą, išskyrus duomenis apie lyties pakeitimo paplitimą kiekviename kartotiniame bandinyje; 2) palikti visų lytį pakeitusių žuvų duomenis duomenų rinkinyje ir analizuoti pagal genotipą.

Histopatologiniai duomenys

Histopatologiniai duomenys ataskaitoje pateikiami kaip poveikio stiprumo balai, kurie vertinami pagal naujai sukurtą statistinę procedūrą, vadinamą „Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices“ (RSCABS; tai yra Rao-Scott'o patikslintas Cochrane-Armitage'o trendo kriterijus pagal „pjūvius“ – angl. *slices*) (Green *et al.*, 2014). Pagal šią Rao-Scott'o pataisą išlaikoma informacija apie kartotinius bandinius; atliekant procedūrą pagal „pjūvius“ įtraukiama biologinė tikimybė, kad didėjant bandomosios medžiagos koncentracijoms, poveikio stiprumo balai paprastai didėja. Dėl kiekvienos diagnozės gautas RSCABS rezultatas parodo, kuriose bandomosiose grupėse patologija yra labiau paplitusi negu kontrolinėse grupėse, ir susijęs poveikio stiprumo lygis.

Vislumo duomenys

Vislumo duomenų analizės atliekamos pagal žingsnio žemyn Jonckheere-Terpstra arba Williams'o kriterijų nustatant dozės poveikį, jei duomenys atitinka monotoniską koncentracijos ir atsako priklausomybės ryšį. Taikant žingsnio žemyn kriterijų, visi palyginimai atliekami esant 0,05 reikšmingumo lygiui ir nekoreguojant dėl palyginimų skaičiaus. Duomenys turėtų atitikti monotoniską koncentracijos ir atsako priklausomybės ryšį, tačiau galima tai patikrinti, vizualiai patikrinant duomenis arba sudarant bandomųjų grupių vidurkių tiesinius ir kvadratinius kontrastus po duomenų rangų transformacijos. Jei nėra taip, kad kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis kontrastas – nereikšmingas, taikomas trendo kriterijus. Kitu atveju naudojamas Dunnett'o kriterijus nustatant dozės poveikį, jei duomenys yra normaliai pasiskirstę ir jų dispersijos vienalytės. Jei tie reikalavimai netenkinami, taikomas Dunn'o kriterijus su Bonferonni-Holm'o pataisa. Visi nurodyti kriterijai taikomi nepriklausomai nuo bet kokio bendrai taikomo F kriterijaus ar Kruskal-Wallis'o kriterijaus. Daugiau informacijos pateikta OECD (2006).

Ikrų skaičiavimui galima naudoti alternatyvius metodus, tokius kaip apibendrintasis tiesinis modelis su Poisson'o paklaidomis (be transformacijos), jei tai statistiškai pagrįsta (Cameron ir Trividi, 2013). Jei naudojamas alternatyvus metodas, patartina pasikonsultuoti su statistikos specialistais.

Kasdienis vienos kartos ikrų skaičiavimas

ANOVA modelis yra išreiškiamas formule Y = Laikas*Laikas+Dozė + *Dozė + Laikas*Dozė + *Laikas*Dozė, atsižvelgiant į atsitiktinį poveikį, tokį kaip Kartotinis bandinys(Karta*Dozė), ir Laikas*Kartotinis bandinys(Dozė), taigi yra galimi abiejų tipų nelygios dispersijos komponentai per kelias kartas. „Laikas“ šioje formulėje yra ikrų skaičiavimo dažnis (pvz., kas dieną arba kas savaitę). Tai yra pakartotinė matų analizė, o koreliacijos tarp tų pačių kartotinių bandinių stebėjimų atitinka kartotinių matavimų pobūdį, būdingą šiems duomenims.

Pagrindinis dozės poveikis tiriamas taikant Dunnett'o (ar Dunnett-Hsu) kriterijų, koreguojant dėl palyginimų skaičiaus. Reikia atlikti pataisas dėl pagrindinio kartos arba laiko poveikio, nes šių dviejų veiksnių „kontrolinio“ lygio nėra ir kiekvienos lygių poros palyginimas gali būti reikšmingas. Dėl šių dviejų rūšių pagrindinio poveikio, jei F kriterijus, taikomas pagrindiniam poveikiui, yra reikšmingas esant 0,05 reikšmingumo lygiui, galima atlikti porinius palyginimus tarp kelių to veiksnio lygių, esant 0,05 reikšmingumo lygiui, be tolesnių pataisų.

Šis modelis apima dviejų ir trijų veiksnių sąveikas, todėl pagrindinis (pavyzdžiui, laiko) poveikis gali nebūti reikšmingas, nors laikas turi reikšmingą poveikį rezultatams. Taigi, jei dviejų ar trijų veiksnių, įskaitant laiką, sąveika yra reikšminga esant 0,05 reikšmingumo lygiui, palyginimai tarp įvairių laiko lygių, esant 0,05 reikšmingumo lygiui, gali būti priimtini be tolesnių pataisų.

Tada taikomi F kriterijai dėl dozės reikšmingumo laiko atžvilgiu – vadinamieji pjūviai ANOVA lentelėje. Jeigu, pavyzdžiui, pjūvis dėl dozės (F1 kartos, laiko vertė – 12) yra reikšmingas esant 0,05 reikšmingumo lygiui, poriniai palyginimai pagal dozę (F1 kartos, laiko vertė – 12) gali būti priimtini esant 0,05 reikšmingumo lygiui, be tolesnių pataisų. Panašūs principai tinka ir kriterijams dėl laiko (F1 kartos) ir dozės ir dėl kartos tam tikro laiko ir dozės atžvilgiu.

Galiausiai, kai palyginimai neįeina į kurią nors iš minėtų kategorijų, palyginimai turėtų būti koreguojami taikant Bonferroni-Holm'o p verčių pataisą. Daugiau informacijos apie tokių modelių analizes galima gauti iš Hocking (1985), Hochberg ir Tamhane (1987).

Kitu atveju neapdoroti duomenys yra užrašomi ir pateikiami tyrimo ataskaitoje kaip vislumo duomenys (ikrų skaičius) kiekviename kartotiniame bandinyje kiekvieną dieną. Turėtų būti apskaičiuojamas kiekvieno kartotinio bandinio vidurkis iš neapdorotų duomenų, tada taikoma kvadratinės šaknies transformacija. Turėtų būti atlikta transformuotų kartotinių bandinių duomenų vidurkių vienfaktorinė ANOVA, tada taikomi Dunnett'o kontrastai. Taip pat gali būti naudinga vizualiai patikrinti kiekvienos bandomosios grupės ir (arba) kartotinio bandinio vislumo duomenis naudojant sklaidos diagramą, kurioje parodomi duomenys laiko atžvilgiu. Taip bus galima neformaliai įvertinti galimą poveikį laikui bėgant.

Visi kiti biologiniai duomenys

Statistinės analizės grindžiamos pagrindine prielaida, kad tinkamai parinkus dozes, duomenys bus monotoniški. Taigi, daroma prielaida, kad duomenys yra monotoniški, ir jų monotoniškumas formaliai įvertinamas naudojant tiesinius ir kvadratinius kontrastus. Jei duomenys yra monotoniški, rekomenduojama taikyti Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų kartotinių bandinių medianinėms vertėms (kaip rekomenduota EBPO, 2006). Jei kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis kontrastas – nereikšmingas, duomenys laikomi nemonotoniškais.

Jei duomenys yra nemonotoniški, ypač dėl mažesnio bandomųjų grupių atsako į didžiausią ar dvi didžiausias dozes, vertėtų apsvarstyti, ar nereikėtų atmesti viso to duomenų rinkinio, kad analizė būtų atliekama be tų dozių bandomųjų grupių. Šį sprendimą reikės priimti vadovaujantis profesine nuovoka ir visais prieinamais duomenimis, ypač tais duomenimis, kurie parodo aiškų toksiškumą esant tų dydžių dozėms.

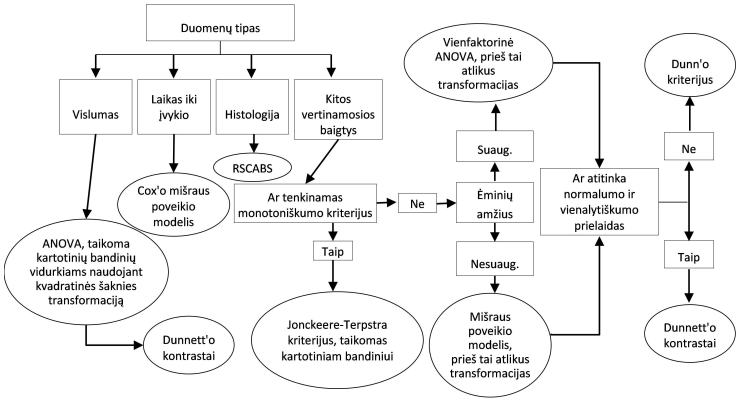
Masės ir ilgio duomenų transformacijų atlikti nerekomenduojama, nors kai kada jos gali būti reikalingos. Tačiau rekomenduojama atlikti vitelogenino duomenų logaritminę transformaciją; antrinių lytinių požymių (analinio peleko gumburėlių) duomenų kvadratinės šaknies transformaciją; procentinio išsiritimo duomenų, procentinio išgyvenamumo, lyčių santykio ir apvaisintų ikrų procentinės dalies duomenų kvadratinės šaknies arksinuso transformaciją. Laiką iki išsiritimo ir laiką iki pirmojo neršto reikėtų laikyti laiko iki įvykio duomenimis, o pavienių embrionų, neišsiritusių per nustatytą laikotarpį, arba kartotinių bandinių žuvų, kurios niekada nepradėjo neršti, duomenis traktuoti kaip atmetamus „iš dešinės“ (dešinėje grafiko pusėje). Laikas iki išsiritimo turėtų būti skaičiuojamas nuo vidutinės (medianinės) išsiritimo dienos kiekviename kartotiniame bandinyje. Šios vertinamosios baigtys turėtų būti analizuojamos naudojant mišraus poveikio Cox'o proporcinių pavojų modelį.

Biologiniai duomenys iš suaugusių žuvų ėminių gaunami atliekant vieną matavimą kiekviename kartotiniame bandinyje, t. y. kartotinio bandinio akvariume yra viena XX žuvis ir viena XY žuvis. Todėl rekomenduojama vienfaktorinę ANOVA analizę atlikti naudojant kartotinių bandinių vidurkius. Jei patvirtinamos ANOVA prielaidos (dėl normalumo ir dispersijos vienalytiškumo, vertinant pagal ANOVA liekanas, atitinkamai taikant Shapiro-Wilks'o kriterijų ir Levene'o kriterijų), Dunnett'o kontrastai turėtų būti naudojami nustatant bandomąsias grupes, kurios skyrėsi nuo kontrolinės grupės. Kita vertus, jei ANOVA prielaidos nepatvirtinamos, reikėtų taikyti Dunn'o kriterijų nustatant, kurios bandomosios grupės skyrėsi nuo kontrolinės grupės. Panašią procedūrą rekomenduojama taikyti duomenims, išreikštiems procentiniais (vaisingumo, išsiritimo ir išgyvenamumo) dydžiais.

Biologiniai duomenys iš nesuaugusių žuvų ėminių gaunami per 1–8 matavimus iš kiekvieno kartotinio bandinio, t. y. kiekvienos genotipinės lyties individų, prisidedančių prie kartotinio bandinio vidurkio, skaičiai gali būti skirtingi. Todėl rekomenduojama naudoti mišraus poveikio ANOVA modelį, o po to taikyti Dunnett'o kontrastus, jei patvirtinamos normalumo ir dispersijos vienalytiškumo prielaidos (pagal mišraus poveikio ANOVA liekanas). Jei šios prielaidos nepatvirtinamos, reikėtų taikyti Dunn'o kriterijų nustatant, kurios bandomosios grupės skyrėsi nuo kontrolinės grupės.

2 diagrama.

Atliekant MEOGRT duomenų analizę rekomenduojamų taikyti statistinių procedūrų schema.



LITERATŪRA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: *A guidance to application* (šio leidinio priedai parengti kaip atskiras dokumentas), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron A. C. and Trivedi P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, *Econometric Society Monograph* No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking R. R. (1985). *The Analysis of Linear Models*, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y. and Tamhane A. C. (1987). *Multiple Comparison Procedures*. John Wiley and Sons, New York.

C.53 **VARLIAGYVIŲ LERVŲ AUGIMO IR VYSTYMOSI TYRIMAS (LAGDA)**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires Nr. 241 (2015). Poreikis sukurti ir patvirtinti tyrimą, kurį atliekant būtų galima nustatyti ir apibūdinti toksiškų cheminių medžiagų poveikio varliagyviams neigiamus padarinius, kyla iš susirūpinimo, kad aplinkoje esančios cheminės medžiagos gali kenkti tiek žmonėms, tiek laukinei gyvūnijai. EBPO varliagyvių lervų augimo ir vystymosi tyrimo (LAGDA) bandymo gairėse aprašytas toksiškumo bandymas naudojant tam tikros rūšies varliagyvius, kurį atliekant vertinamas augimas ir vystymasis nuo apvaisinimo iki ankstyvojo jauniklių periodo. Tai tyrimas (paprastai trunkantis 16 savaičių), kurio metu vertinamas ankstyvasis vystymasis, metamorfozė, išgyvenamumas, augimas ir dalinis subrendimas reprodukcijai. Jį atliekant taip pat galima matuoti kai kurias kitas vertinamąsias baigtis, taigi galima diagnostiškai įvertinti įtariamas endokrininę sistemą ardančias chemines medžiagas ar kitokias vystymuisi ir reprodukcijai toksiškas medžiagas. Šis aprašytas bandymo metodas yra pagrįstas afrikinės naguotosios varlės (*Xenopus laevis*) tinkamumo bandymams patvirtinimo darbu, atliktu JAV aplinkos apsaugos agentūros (U.S. EPA); papildomas darbas atliktas Japonijoje (1). Nors kitų rūšių varliagyviams galima pritaikyti augimo ir vystymosi bandymo protokolą, kurio svarbi dalis yra gebėjimas nustatyti genetinę lytį, konkretūs metodai ir stebimos vertinamosios baigtys, aprašyti pagal šį bandymo metodą, yra tinkami tik *Xenopus laevis*.

2. LAGDA yra aukštesnės pakopos bandymas su varliagyviais siekiant surinkti daugiau visapusiškos koncentracijos ir atsako informacijos apie neigiamą poveikį, kuri būtų tinkama naudoti nustatant ir apibūdinant pavojus ir vertinant ekologinę riziką. Šis tyrimas atitinka EBPO endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymų ir vertinimų konceptualiosios sistemos 4-ąjį lygmenį (*Level 4*), pagal kurį tyrimai *in vivo* taip pat teikia duomenų apie neigiamą poveikį su endokrinine sistema susijusioms vertinamosioms baigtims (2). Bendrąjį bandymo planą sudaro *X. laevis* embrionų, esančių 8–10 vystymosi stadijose pagal Nieuwkoop ir Faber (NF) klasifikaciją (3), veikimas mažiausiai keturių skirtingų koncentracijų (tarp kurių paprastai yra ne mažesni kaip pusiau logaritminiai intervalai) bandomąja chemine medžiaga, kartu naudojant kontrolinę grupę arba grupes, iki 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėje grupėje, paimant vieną tarpinį poėminį NF 62 stadijoje (≤ 45 dienos po apvaisinimo; paprastai apie 45 dienos (d. p. a.)). Naudojami keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotiniai bandiniai ir aštuoni kartotiniai bandiniai kontrolinėje grupėje. Vertinamosios baigtys, vertinamos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu (tuo metu, kai imamas tarpinis poėminis, ir galutinis ėminys baigiant bandymą), apima ir tas, kurios parodo bendrąjį toksiškumą: gaištamumą, elgesio anomalijas ir augimo parametrus (ilgį ir masę), taip pat vertinamąsias baigtis, nustatytas siekiant apibūdinti konkrečius endokrininei sistemai toksiškus poveikio būdus, veikiančius estrogenų, androgenų arba skydliaukės valdomus fiziologinius procesus. Pagal šį metodą pagrindinis dėmesys skiriamas galimam populiacijai reikšmingam poveikiui (t. y. neigiamam poveikiui išgyvenamumui, vystymuisi, augimui ir reprodukciniam vystymuisi), apskaičiuojant nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) arba poveikio koncentraciją, sukeliančią matuojamos vertinamosios baigties × % pokytį (ECx). Vis dėlto reikėtų pažymėti, kad ECx metodai retai yra tinkami šio pobūdžio didelio masto tyrimams, kai didinti bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičių, siekiant nustatyti norimą ECx, gali būti nepraktiška. Taip pat pažymėtina, kad šis metodas neapima paties reprodukcijos (dauginimosi) etapo. Pagal šį bandymo metodą vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

3. Dėl riboto cheminių medžiagų, kurių bandymai atlikti, ir patvirtinant šio gana sudėtingo tyrimo tinkamumą dalyvavusių laboratorijų skaičiaus (ypač jo tarplaboratorinis atkuriamumas dar nėra patvirtintas bandymų duomenimis) numatoma, kad kai jau bus atlikta pakankamai tyrimų, kad būtų galima nustatyti šio naujo tyrimo plano poveikį, EBPO bandymų gairės Nr. 241 bus peržiūrėtos ir, jei reikės, pakeistos atsižvelgiant į įgytą patirtį. LAGDA yra svarbus tyrimas siekiant tirti veiksnius, galinčius prisidėti prie varliagyvių populiacijų mažėjimo: cheminių medžiagų poveikio padariniai vertinami jautrių lervų stadijoje, kurioje poveikis išgyvenamumui ir vystymuisi, įskaitant normalų reprodukcinių organų vystymąsi, gali neigiamai paveikti populiacijas.

4. Šis bandymas sukurtas siekiant nustatyti apikalinį poveikį, patiriamą ir dėl endokrininių, ir dėl neendokrininių mechanizmų, ir apima diagnostines vertinamąsias baigtis, kurios yra iš dalies konkrečiai susietos su pagrindiniais endokrininės sistemos veikimo būdais. Reikėtų pažymėti, kad iki LAGDA sukūrimo dar nebuvo patvirtinto šios paskirties tyrimo, kuriam būtų naudojami varliagyviai.

5. Prieš pradedant šį tyrimą svarbu turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes, ypač kad būtų galima ruošti stabilius cheminių medžiagų tirpalus. Taip pat būtina taikyti pakankamai jautrų analizės metodą tikrinant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes. Per visą šį tyrimą, kuris trunka maždaug 16 savaičių, reikia iš viso 480 gyvūnų, t. y. *X. laevis* embrionų (arba 640 embrionų, jei naudojamas tirpiklio kontrolinis bandinys), siekiant užtikrinti pakankamą bandymo patikimumą vertinant tokias populiacijai reikšmingas vertinamąsias baigtis kaip augimas, vystymasis ir reprodukcinė branda.

6. Prieš taikant šį bandymo metodą mišinio bandymui dėl reglamentavimo, vertėtų apsvarstyti, ar taip gauti rezultatai bus tinkami naudoti tuo numatomu reglamentavimo tikslu. Be to, atliekant šį tyrimą nėra tiesiogiai vertinamas vislumas, todėl jis gali būti netinkamas naudoti aukštesnės pakopos nei 4-uoju lygiu pagal EBPO endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymų ir vertinimų konceptualiąją sistemą.

ŠIO BANDYMO METODO MOKSLINIS PAGRINDAS

7. Didelė mūsų dabartinių žinių apie varliagyvių biologiją dalis yra gauta naudojant pavyzdinę laboratorinę rūšį *X. laevis*. Šios rūšies varles galima įprastai auginti laboratorijoje, patelėms galima paskatinti ovuliaciją naudojant žmogaus chorioninį gonadotropiną (hCG), o šių gyvūnų išteklių galima lengvai gauti iš komercinių veisėjų.

8. Varliagyvių, kaip ir visų stuburinių gyvūnų, reprodukcija yra valdoma pagumburio-hipofizės-lytinių liaukų (HPG) ašies (4). Šios endokrininės sistemos mediatoriai yra estrogenai ir androgenai, lemiantys lytiškai dimorfiškų audinių vystymąsi ir fiziologiją. Yra trys aiškios varliagyvių gyvenimo ciklo fazės, kuriose ši ašis yra ypač aktyvi: 1) lytinių liaukų diferenciacija vystantis lervoms, 2) antrinių lytinių požymių vystymasis ir lytinių liaukų subrendimas jauniklių stadijoje ir 3) suaugusių gyvūnų funkcinė reprodukcija. Kiekviename iš šių trijų vystymosi etapų gyvūnai gali būti jautrūs endokrininės sistemos trikdymui tam tikromis cheminėmis medžiagomis, tokiomis kaip estrogenai ir androgenai, dėl kurio organizmai galiausiai praranda reprodukcinį tinkamumą.

9. Lytinės liaukos pradeda vystytis NF 43 stadijoje, kai pirmiausia išsivysto bipotencinis genitalinis gūbrelis. Lytinių liaukų diferenciacija prasideda NF 52 stadijoje, kai pirmapradės embrioninės ląstelės migruoja į besivystančių lytinių liaukų vidinį audinį (patinų) arba lieka žievės regione (patelių) (3). Apie tai, kad šiame lytinės diferenciacijos procese *Xenopus* lytinės liaukos yra jautrios cheminių medžiagų poveikiui, galinčiam jose sukelti pakitimų, pirmą kartą pranešta praėjusio amžiaus 6-ajame dešimtmetyje (5) (6). Paveikus buožgalvius estradioliu šiuo lytinių liaukų diferenciacijos laikotarpiu, patinai pakeičia lytį ir, išauginti iki subrendimo, yra visiškai funkcionalios patelės (7) (8). Patelių funkcinis lyties pakeitimas į patinus taip pat yra įmanomas; apie tai pranešta po bandymo, kurio metu buožgalviams buvo įsodinta sėklidžių audinio (9). Tačiau nors aromatazės inhibitoriaus veikimas taip pat paskatina

funkcinį *X. tropicalis* lyties pakeitimą (10), tokio poveikio *X. laevis* nenustatyta. Praeityje toksiškų medžiagų poveikis lytinių liaukų diferenciacijai vertintas atliekant lytinių liaukų histologinį tyrimą metamorfozės stadijoje, o lyties pakeitimą buvo įmanoma nustatyti tik lyčių santykio analize. Dar visai neseniai nebuvo jokių būdų tiesiogiai nustatyti *Xenopus* genetinę lytį, tačiau neseniai nustačius su lytimi susijusius *X. laevis* požymius, dabar galima nustatyti genetinę lytį ir tiesiogiai atskirti lytį pakeitusius gyvūnus (11).

10. Vystantis jaunikliams patinams, didėja testosterono kiekis kraujyje ir kartu atsiranda antriniai lytiniai požymiai, taip pat vystosi sėklidės. Patelių kiaušidės gamina estradiolį, todėl kraujo plazmoje atsiranda vitelogenino (VTG), kiaušidėse – vitelogeninių ovocitų, ir vystosi kiaušintakiai (12). Kiaušintakiai yra patelių antrinis lytinis požymis; jie funkcionuoja bręstant ovocitams reprodukcijos metu. Ovocitų išorė padengiama gleivių apvalkalu, kai jie slenka kiaušintakiais ir surenkami ikrų maišelyje, paruošti apvaisinimui. Atrodo, kad kiaušintakių vystymąsi reguliuoja estrogenai, nes jų vystymasis siejasi su estradiolio kiekiais *X. laevis* (13) ir *X. tropicalis* (12) varlių kraujyje. Pranešama, kad dėl polichlorintųjų bifenilų junginių (14) ir 4-*tert*-oktilfenolio (15) poveikio kiaušintakiai ėmė vystytis patinams.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Pagal šio bandymo planą *X. laevis* NF 8–10 vystymosi stadijų embrionai yra per vandenį veikiami keturių skirtingų koncentracijų bandomąja chemine medžiaga, kartu naudojant kontrolinę grupę arba grupes, iki 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėje grupėje, taip pat paimant vieną NF 62 stadijos tarpinį poėminį. Nors labai hidrofobiškas chemines medžiagas taip pat gali būti įmanoma dozuoti per pašarą, kol kas turima nedaug patirties, susijusios su šio poveikio būdo naudojimu per šį tyrimą. Naudojami keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotiniai bandiniai ir aštuoni kartotiniai bandiniai kiekvienoje naudojamoje kontrolinėje grupėje. Vertinamosios baigtys, vertinamos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu, apima tas, kurios parodo bendrąjį toksiškumą (t. y. gaištamumas, elgesio anomalijos ir augimo parametrai (ilgis ir masė)), taip pat vertinamąsias baigtis, nustatytas siekiant apibūdinti konkrečius endokrininei sistemai toksiškus poveikio būdus, veikiančius estrogenų, androgenų arba skydliaukės valdomus fiziologinius procesus (t. y. skydliaukės histopatologija, lytinių liaukų ir lytinių liaukų latakų histopatologija, vystymosi sutrikimai, vitelogeninas kraujo plazmoje (nebūtinai) ir genotipinis / fenotipinis lyčių santykis).

BANDYMO TINKAMUMO KRITERIJAI

12. Taikomi šie bandymo tinkamumo kriterijai:

— vandenyje ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti ≥ 40 % oro soties vertės per visą bandymą;

— vandens temperatūra turėtų būti 21 ± 1 °C intervale, o jos skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 1,0 °C;

— bandymo tirpalo pH turėtų būti palaikomas intervale tarp 6,5 ir 8,5, o skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 0,5;

— turėtų būti gauta įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai palaikomos vidutinių išmatuotų verčių ±20 % tikslumu;

— veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu gaištamumas kiekviename kontrolinių grupių kartotiniame bandinyje turėtų būti ≤ 20 %;

— pradedant tyrimą pasirinktos naudoti vados gyvybingumas turėtų būti ≥ 70 %;

— vidutinis (medianinis) laiko tarpsnis, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėse grupėse, turėtų būti ≤ 45 dienos.

— bandomųjų organizmų vidutinė masė NF 62 stadijoje ir užbaigus tyrimą kontroliniuose bandiniuose ir tirpiklio kontroliniuose bandiniuose (jei jie naudojami) turėtų siekti atitinkamai 1,0 ± 0,2 ir 11,5 ± 3 g.

13. Nors tai nėra tinkamumo kriterijus, rekomenduojama analizei pateikti ne mažiau kaip trijų bandomosios medžiagos poveikio dozių tris reikalavimus atitinkančius kartotinius bandinius. Per didelis gaištamumas, kuris kenkia bandomajai grupei, apibrėžiamas kaip > 4 gyvūnų žūtys (> 20 %) dviejuose arba daugiau kartotinių bandinių, kurių negalima paaiškinti technine klaida. Analizei reikėtų pateikti ne mažiau kaip trijų bandomosios medžiagos dozių bandomųjų grupių, kuriose nepastebėta aiškaus toksiškumo, bandinius. Aiškaus toksiškumo požymiai gali būti, be kita ko, plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštielninkas arba nenormalus plaukimas, retas pakilimas į paviršių ir nereagavimas į dirgiklius, morfologinės anomalijos (pvz., galūnių deformacijos), kraujuojančios žaizdos ir pilvo edema.

14. Tuo atveju, jei pastebima, kad nukrypta nuo bandymo tinkamumo kriterijų, reikėtų apsvarstyti to padarinius bandymo rezultatų patikimumui, ir tie nukrypimai bei svarstymai turėtų būti įtraukti į bandymo ataskaitą.

METODŲ APRAŠYMAS

Aparatūra

15. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

a) temperatūros reguliavimo aparatūra (pvz., šildytuvai arba vėsintuvai, kuriais galima nustatyti 21 ± 1 °C temperatūrą);

b) termometras;

c) dviejų okuliarų stereomikroskopas ir skrodimo įrankiai;

d) skaitmeninė kamera, kurios skiriamoji geba ne mažesnė kaip 4 megapikseliai, su mikroskopinio fotografavimo funkcija (jei reikia);

e) analizinės svarstyklės, kuriomis galima sverti iki 0,001 mg ar 1 µg tikslumu;

f) ištirpusio deguonies matuoklis ir pH matuoklis;

g) šviesos stiprio matuoklis, kuris matuoja liuksais.

Vanduo

Šaltinis ir kokybė

16. Galima naudoti bet kokį skiedimo vandenį, kuris gaunamas vietoje (pvz., šaltinio vandenį ar per aktyvintąsias anglis filtruotą vandentiekio vandenį), kuriame gali normaliai augti ir vystytis *X. laevis*; reikėtų turėti įrodymų, kad šios varlės normaliai auga šiame vandenyje. Kadangi iš įvairių vietų paimto vietos vandens kokybė gali būti labai skirtinga, reikėtų atlikti vandens kokybės analizę, ypač jei nėra ankstesnių duomenų apie to vandens tinkamumą varliagyvių lervoms auginti. Sunkiųjų metalų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), pesticidų, bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių kiekių matavimai turėtų būti atlikti prieš pradedant bandymą ir (arba) atliekami, pavyzdžiui, kas šešis mėnesius, kai yra žinoma, kad skiedimo vanduo yra gana pastovios kokybės. Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės nurodytos 2 priedėlyje.

Jodido koncentracija bandymo vandenyje

17. Varliagyvių lervos per vandenį ir su pašaru turėtų gauti pakankamai jodido, kad jų skydliaukė galėtų gaminti skydliaukės hormonus, reikalingus normaliai metamorfozei. Šiuo metu dar nėra empiriškai parengtų gairių dėl minimalių jodido koncentracijų pašare ar vandenyje, reikalingų tinkamam vystymuisi užtikrinti; tačiau jodido pakankamumas gali turėti įtakos skydliaukės sistemos atsakui į skydliaukę veikiančias medžiagas ir yra žinoma, kad jodidas reguliuoja skydliaukės bazinį aktyvumą, todėl į tai derėtų atsižvelgti aiškinant skydliaukės histopatologinio tyrimo rezultatus. Remiantis ankstesniu darbu įrodyta, kad šis tyrimas sėkmingai atliekamas tada, kai jodido (I^{-}) koncentracijos skiedimo vandenyje yra 0,5–10 μg/l. Būtų geriausia, kad minimali jodido koncentracija skiedimo vandenyje per visą bandymą būtų 0,5 μg/l (jo dedant natrio ar kalio druskos pavidalu). Jei bandymo vanduo regeneruojamas iš dejonizuoto vandens, į jį dedamo jodo koncentracija turėtų būti ne mažesnė kaip 0,5 μg/l. Ataskaitoje reikėtų nurodyti išmatuotas jodido koncentracijas bandymo vandenyje (t. y. skiedimo vandenyje) ir bandymui naudojamo vandens papildymą jodu arba kitomis druskomis (jei naudojamos). Jodo kiekis taip pat gali būti matuojamas ne tik bandymo vandenyje, bet ir pašare (-uose).

Ekspozicijos sistema

18. Šis bandymas sukurtas naudojant pratekamąją skiediklio sistemą. Sistemos komponentai, kurie liečiasi su vandeniu, turėtų būti pagaminti iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ir (arba) kitų chemiškai inertinių medžiagų. Bandomosios medžiagos poveikiui tirti skirti indai turėtų būti stiklo arba nerūdijančiojo plieno akvariumai, o indo naudojamasis tūris turėtų būti nuo 4,0 iki 10,0 l (minimalus vandens gylis 10–15 cm). Šioje sistemoje turėtų būti galima laikyti visų bandomosios medžiagos poveikio koncentracijų bandinius, kontrolinį bandinį ir tirpiklio kontrolinį bandinį (jei jis reikalingas), su keturiais kartotiniais bandiniais kiekvienoje bandomojoje grupėje ir aštuoniais kartotiniais bandiniais kontrolinėse grupėse. Turėtų būti palaikomas pastovus skysčio srautas į kiekvieną indą, užtikrinant ir reikiamų biologinių sąlygų palaikymą, ir cheminės medžiagos veikimą. Rekomenduojama palaikyti tinkamus srautus (pvz., kad visas vanduo inde būtų pakeičiamas bent 5 kartus per parą), kad būtų išvengta cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimo dėl metabolizmo (tiek bandomųjų organizmų, tiek vandens mikroorganizmų, esančių akvariumuose) ar abiotinių irimo būdų (hidrolizės, fotolizės) arba išsisklaidymo (garavimo, sorbcijos). Bandymo indai turėtų būti ekspozicijos sistemoje išdėstomi atsitiktine tvarka, siekiant sumažinti galimą poveikį dėl padėties, įskaitant nežymius temperatūros, šviesos intensyvumo ir kitus skirtumus. Daugiau informacijos apie pratekamųjų ekspozicijos sistemų įrengimą galima gauti iš ASTM standartų vadovo dėl ūmaus toksiškumo bandymams su žuvimis, makrobestuburiais ir varliagyviais naudojamų medžiagų (16).

Cheminės medžiagos tiekimas į bandymo sistemą: bandymo tirpalų paruošimas

19. Ruošiant bandymo tirpalus, skirtus naudoti ekspozicijos sistemoje, bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas turėtų būti ekspozicijos sistemoje dozuojamas naudojant tinkamą siurblį ar kitą aparatūrą. Pradinio tirpalo srauto sparta (debitas) turėtų būti kalibruota remiantis bandymo tirpalų tinkamumo analiziniu patvirtinimu, prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą, ir periodiškai tikrinama tūrio matavimais per visą bandymą. Bandymo tirpalas kiekvienoje bandymo kameroje turėtų būti atnaujinamas, kad visas jo tūris būtų pakeistas mažiausiai 5 kartus per parą.

20. Bandomosios cheminės medžiagos tiekimo į sistemą metodas gali skirtis, priklausomai nuo jos fizikinių ir cheminių savybių, todėl prieš bandymą reikėtų gauti pagrindinę informaciją apie cheminę medžiagą, kuri yra svarbi nustatant jos tinkamumą bandymui. Naudinga informacija apie bandomajai cheminei medžiagai būdingas savybes apima jos struktūrinę formulę, molekulinę masę, grynumą, stabilumą vandenyje ir šviesoje, pK_a ir K_{ow}, tirpumą vandenyje (geriausia bandymo terpėje) ir garų slėgį, taip pat lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatus (bandymo metodas C.4 (17) arba C.29 (18)). Tirpumas ir garų slėgis gali būti naudojami apskaičiuojant Henrio dėsnio konstantą, kuri parodys, ar gali būti bandomosios cheminės medžiagos nuostolių dėl garavimo. Reikėtų atsakingai apsvarstyti šio bandymo atlikimą tuo atveju, kai nėra minėtos informacijos, nes tyrimo planas priklausys nuo bandomosios cheminės medžiagos fizikinių ir cheminių savybių, ir be šių duomenų bandymo rezultatus gali būti sunku išaiškinti arba jie gali būti beprasmiai. Reikėtų turėti patikimą analitinį metodą, pagal kurį būtų galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos kiekį bandomuosiuose tirpaluose ir kurio tikslumo lygis bei aptikimo riba būtų žinomi ir paskelbti. Vandenyje tirpias bandomąsias chemines medžiagas galima ištirpinti skiedimo vandens alikvotinėse dalyse iki tokios koncentracijos, kad jas būtų galima į pratekamąją sistemą tiekti tikslinės bandymui naudojamos koncentracijos. Kai cheminės medžiagos yra skystos arba kietos kambario temperatūroje ir vidutiniškai tirpios vandenyje, gali reikėti naudoti skysčio ir skysčio arba skysčio ir kietosios medžiagos sotintuvus (pvz., stiklo pluošto kolonėlę) (19). Nors labai hidrofobiškas bandomąsias chemines medžiagas taip pat gali būti įmanoma dozuoti per pašarą, iki šiol turima nedaug patirties, susijusios su tokio poveikio būdo naudojimu per šį tyrimą.

21. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą patartina ruošti paprasčiausiai sumaišant arba suplakant bandomąją cheminę medžiagą su skiedimo vandeniu mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ir (arba) ultragarsu). Tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles ar sistemas arba pasyviojo dozavimo metodus (20). Patartina naudoti bandymo sistemą be pagalbinio tirpiklio, tačiau įvairios bandomosios cheminės medžiagos turi skirtingų fizikinių ir cheminių savybių, dėl kurių tikriausiai reikės skirtingais būdais ruošti vandenį cheminės medžiagos bandymui. Reikėtų stengtis, kiek tik įmanoma, nenaudoti tirpiklių ar nešiklių, nes: 1) kai kurie tirpikliai patys gali būti toksiški ir (arba) sukelti nepageidaujamus ar netikėtus atsakus, 2) kai bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos viršija jų tirpumo vandenyje gebą (taip gali dažnai nutikti naudojant tirpiklius), gali būti netiksliai nustatytos efektyviosios jų koncentracijos, 3) per ilgesnį laiką trunkančius bandymus naudojami tirpikliai gali paskatinti nemažą biologinės plėvelės, susijusios su mikroorganizmų aktyvumu, susidarymą, ir tai gali paveikti aplinkos sąlygas ir gebėjimą palaikyti tinkamas poveikio koncentracijas, ir 4) kai nėra ankstesnių duomenų, kuriais būtų patvirtinta, kad atitinkamas tirpiklis nedaro poveikio tyrimo rezultatui, naudojant tirpiklius reikia tirpiklio kontrolinio bandinio, o tai turi reikšmingą poveikį gyvūnų gerovei, nes bandymui atlikti reikia daugiau gyvūnų. Tiriant chemines medžiagas, kurių bandymus atlikti sunku, galima naudoti tirpiklį, kai nėra kitos išeities, ir reikėtų nustatyti geriausią metodą remiantis EBPO rekomendaciniu dokumentu dėl sunkiai tiriamų medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymų (angl. *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (21). Tirpiklio pasirinkimas priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos cheminių savybių ir nuo to, ar yra ankstesnių to tirpiklio kontrolinių duomenų. Jei nėra ankstesnių duomenų, tirpiklio tinkamumą reikėtų įvertinti prieš atliekant galutinį tyrimą. Tuo atveju, kai tirpiklio naudojimas neišvengiamas ir dėl to padidėja mikroorganizmų aktyvumas (susidaro biologinė plėvelė), rekomenduojama užrašyti ir ataskaitoje pranešti biologinės plėvelės susidarymo kiekviename inde duomenis per visą bandymą (bent kas savaitę). Geriausia yra palaikyti pastovią tirpiklio koncentraciją tirpiklio kontroliniame bandinyje ir visuose bandomosios medžiagos bandiniuose. Jei tirpiklio koncentracija nėra pastovi, didžiausia tirpiklio koncentracija, esanti bandinyje su bandomąja medžiaga, turėtų būti naudojama ir tirpiklio kontroliniame bandinyje. Tais atvejais, kai naudojamas tirpiklis-nešiklis, didžiausios tirpiklio koncentracijos neturėtų viršyti 100 µl/l ar 100 mg/l (21) ir rekomenduojama palaikyti kuo mažesnę tirpiklio koncentraciją (pvz., ≤20 µl/l), kad būtų išvengta galimo tirpiklio poveikio matuojamoms vertinamosioms baigtims (22).

Bandomieji gyvūnai

Bandomoji rūšis

22. Bandomoji rūšis yra *X. laevis*, nes: 1) šios rūšies gyvūnai yra įprastai auginami laboratorijose visame pasaulyje, 2) juos lengva gauti iš komercinių tiekėjų ir 3) galima nustatyti jų genetinę lytį.

Suaugusių gyvūnų priežiūra ir veisimas

23. *X. laevis* tinkama priežiūra ir veisimas yra aprašyti standartizuotose gairėse (23). *X. laevis* laikymą ir priežiūrą taip pat aprašė Read (24). Siekiant paskatinti veisimąsi, suaugusių patelių ir patinų 3–5 poroms atliekama žmogaus chorioninio gonadotropino (hCG) injekcija į pilvo ertmę. Patelėms ir patinams įšvirkščiama, pvz., atitinkamai apie 800–1 000 IU ir 500–800 IU hCG, ištirpinto 0,6–0,9 % fiziologiniame tirpale (arba varlėms skirtame Ringer'io tirpale – izotoniniame druskos tirpale, skirtame naudoti varliagyviams). Įšvirkščiami kiekiai turėtų būti apie 10 µl vienam kūno masės gramui (~1 000 µl). Vėliau, paskatinus veisimąsi, veislinės poros laikomos dideliuose induose, netrikdomos ir nekintamomis sąlygomis, kad būtų skatinamas apglėbimas. Kiekvieno veisimo indo dugne turėtų būti antras dugnas iš nerūdijančiojo plieno tinklo (pvz., su 1,25 cm dydžio akutėmis), per kurį ikrai nukristų į indo dugną.

Jei hCG injekcija varlėms atliekama vėlyvą popietę, jos paprastai padeda daugumą ikrų iki kitos dienos vėlyvo ryto. Kai išleidžiama ir apvaisinama pakankamai ikrų, suaugusius gyvūnus reikėtų išimti iš veisimo indų. Tada ikrai surenkami ir gleivių apvalkalai pašalinami apdorojant L-cisteinu (23). Reikėtų paruošti 2 % L-cisteino tirpalą ir jo pH patikslinti iki 8,1, pridedant 1 M NaOH. Šio 21 °C temperatūros tirpalo įpilama į 500 ml tūrio kūginę kolbą, į kurią sudėti vienos vados ikrai, ir atsargiai pamaišoma sukant kolbą 1–2 minutes, o tada ikrai 6–8 kartus kruopščiai nuplaunami kultūros auginimo vandeniu (21 °C temperatūros). Tada ikrai perkeliami į kristalizatorių ir patikrinama, ar > 70 % iš jų yra gyvybingi, embrionų anomalijos minimalios ir juose matomas ląstelių dalijimasis.

BANDYMO PLANAS

Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

24. Rekomenduojama naudoti mažiausiai keturias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir tinkamus kontrolinius bandinius (įskaitant, jei reikia, tirpiklio kontrolinius bandinius). Apskritai patartina, kad skirtumas tarp koncentracijos verčių (skirtumo koeficientas) būtų ne didesnis kaip 3,2.

25. Atliekant šį bandymą reikėtų, kiek įmanoma, naudotis ankstesnių varliagyvių tyrimų rezultatais nustatant didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją, siekiant nesirinkti tokių koncentracijų, kurios yra pernelyg toksiškos. Nustatyti šią koncentracijos vertę gali padėti informacija, gauta, pavyzdžiui, iš kiekybinių medžiagos struktūros ir savybių ryšių tyrimų, pagal analogijos metodą ir iš ankstesnių varliagyvių tyrimų duomenų, kaip antai Varliagyvių metamorfozės tyrimo (bandymo metodas C.38) (25) ir Varlių embrionų teratogenezės tyrimo (*Xenopus*) (23) ir (arba) bandymų su žuvimis – tokių bandymų metodų kaip C.48, C.41 ir C.49 (26) (27) (28). Prieš atliekant LAGDA tyrimą galima atlikti intervalo nustatymo bandymą. Veikimą bandomąja medžiaga, siekiant nustatyti jos koncentracijos verčių intervalą, rekomenduojama pradėti per 24 valandas po apvaisinimo ir tęsti 7–14 dienų (arba, jei reikia, ilgiau), o bandomosios medžiagos koncentracijos vertės nustatomos tokios, kad skirtųsi ne daugiau kaip 10 kartų. Intervalo nustatymo bandymo rezultatai turėtų padėti nustatyti didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją per LAGDA bandymą. Įsidėmėtina, kad jei reikia naudoti tirpiklį, atliekant intervalo nustatymo tyrimą galima kartu nustatyti ir tirpiklio tinkamumą (t. y. ar jis gali turėti poveikį tyrimo rezultatui).

Kartotiniai bandiniai bandomosiose grupėse ir kontrolinėse grupėse

26. Turėtų būti naudojami ne mažiau kaip keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotinių bandinių indai ir ne mažiau kaip aštuoni kartotiniai bandiniai kontrolinėse grupėse (ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinis bandinys), t. y. kartotinių bandinių skaičius kontrolinėje grupėje ir bet kokio tirpiklio kontrolinėje grupėje turėtų būti dukart didesnis nei kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje, kad būtų užtikrinta reikiama statistinė galia. Kiekviename kartotiniame bandinyje turėtų būti ne daugiau kaip 20 gyvūnų. Minimalus naudojamų gyvūnų skaičius būtų 15 (5 gyvūnai, skirti NF 62 vystymosi stadijos poėminiui, ir 10 jauniklių), tačiau papildomų gyvūnų į kiekvieną kartotinį bandinį įdedama siekiant atsižvelgti į galimą gaištamumą, kad būtų išlaikytas būtinas skaičius – 15.

PROCEDŪRA

Tyrimo apžvalga

27. Tyrimas pradedamas naudojant naujai išnerštus (NF 8–10 vystymosi stadijų) embrionus ir tęsiamas vystantis jaunikliams. Gyvūnai kasdien patikrinami, ar nenugaišo ir ar nėra neįprasto elgesio požymių. Pasiekus NF 62 vystymosi stadiją paimamas lervų poėminis (iki 5 gyvūnų iš kiekvieno kartotinio bandinio) ir ištiriamos įvairios vertinamosios baigtys (1 lentelė). Po to, kai visi gyvūnai pasiekia NF 66 vystymosi stadiją, t. y. baigiasi metamorfozė (arba praeina 70 dienų nuo tyrimo pradžios, priklausomai nuo to, kas įvyksta anksčiau), numarinama dalis atsitiktine tvarka atrinktų gyvūnų (neimant poėminių), sumažinant jų skaičių (iki 10 kiekviename inde) (žr. 43 punktą), o likę gyvūnai toliau veikiami bandomąja medžiaga iki praeina 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėje grupėje. Baigiant bandymą (imant jauniklių ėminius) atliekami papildomi matavimai (1 lentelė).

Veikimo bandomąja chemine medžiaga sąlygos

28. Visi bandymo parametrai išsamiai išdėstyti 3 priedėlyje. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu turėtų būti kiekvieną dieną matuojamas bandymo tirpaluose ištirpęs deguonis, jų temperatūra ir pH. Vandens laidis, šarmingumas ir kietumas matuojami kartą per mėnesį. Matuojant vandens temperatūrą bandomuosiuose tirpaluose, skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių (per vieną dieną) neturėtų būti didesni nei 1,0 °C. Be to, matuojant bandomųjų tirpalų pH, skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 0,5.

29. Bandymo indus galima kasdien išvalyti sifonu, pašalinant nesuvartotą pašarą ir šalinimo produktus; reikia tai daryti atsargiai, kad nebūtų kryžminio užteršimo tarp indų. Reikia su gyvūnais elgtis atsargiai, kad jie patirtų kuo mažiau streso ir traumų, ypač kai jie perkeliami ir tvarkomi ir kai valomi akvariumai. Reikėtų vengti stresą keliančių sąlygų arba veiksmų, pvz., didelio ir (arba) nuolatinio triukšmo, akvariumų tapšnojimo, virpesių inde.

Veikimo bandomąja chemine medžiaga trukmė

30. Veikti bandomąja medžiaga pradedami naujai išneršti (NF 8–10 stadijų) embrionai ir tai tęsiama iki praeina dešimt savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija (≤ 45 dienos nuo tyrimo pradžios) kontrolinėje grupėje. Bendra LAGDA tyrimo trukmė yra 16 savaičių (daugiausia 17 savaičių).

Tyrimo pradžia

31. Pradedant tyrimą turėtų būti naudojami motininiai gyvūnai, kurie jau patikrinti ir įsitikinta, kad jų palikuonys gali būti genetiškai diferencijuojami pagal lytį (5 priedėlis). Po suaugusių gyvūnų neršto embrionai surenkami, apdorojami cisteinu, pašalinant gleivių dangą, ir atliekamas jų gyvybingumo atrankinis patikrinimas (23). Apdorojimas cisteinu palengvina embrionų tvarkymą per šį patikrinimą – jie nelimpa prie paviršių. Atrankinis patikrinimas atliekamas naudojant stereomikroskopą, negyvybingus embrionus pašalinant tinkamo dydžio pipete. Patartina bandymui naudoti vienos vados embrionus, kurių gyvybingumas didesnis nei 70 %. NF 8–10 vystymosi stadijos embrionai atsitiktine tvarka paskirstomi į cheminės medžiagos poveikio bandymo indus, kuriuose yra tinkamas tūris skiedimo vandens; galiausiai kiekviename inde turi būti po 20 embrionų. Per šį perkėlimą embrionai turėtų būti tvarkomi atsargiai, kad stresas būtų kuo mažesnis ir būtų išvengta sužalojimų. Praėjus 96 valandoms po apvaisinimo, buožgalviai turėtų būti pakilę aukštyn vandens sluoksnyje ir pradėję prikibti prie indo sienelių.

Šėrimo režimas

32. Pašaro ir šėrimo normos keitimas įvairiose *X. laevis* gyvenimo stadijose yra labai svarbus LAGDA protokolo aspektas. Besaikis šėrimas lervų stadijoje paprastai sukelia dažnesnę ir sunkesnę skoliozę (8 priedėlis) ir to reikėtų vengti. Ir priešingai, nepakankamas šėrimas lervų stadijoje lemia labai nevienodą kontrolinių gyvūnų vystymosi spartą, ir tai gali sumažinti statistinę galią ar iškreipti bandymo rezultatus. 4 priedėlyje pateiktas rekomenduojamas *X. laevis* lervų ir jauniklių šėrimo racionas ir šėrimo režimai pratekamosios sistemos sąlygomis, tačiau galima rinktis ir kitokias alternatyvas, jei bandomieji organizmai pakankamai gerai auga ir vystosi. Įsidėmėtina, kad jei matuojamos konkrečiai su endokrinine sistema susijusios vertinamosios baigtys, pašare neturėtų būti endokrininę sistemą veikiančių medžiagų, tokių kaip sojų miltai.

Lervų šėrimas

33. Rekomenduojamas lervų pašaras susideda iš upėtakių pradinių pašarų, granuliuotų *Spirulina* dumblių plokštelių ir auksinėms žuvelėms šerti skirtų dribsnių (pvz., *TetraFin*® dribsnių, gamintojas „Tetra“, Vokietija), suplaktų auginimo (arba skiedimo) vandenyje iki vientisos masės. Šiuo mišiniu šeriama tris kartus per dieną darbo dienomis ir kartą per dieną savaitgaliais. Buožgalviai taip pat šeriami gyvais sūriavandenių krevečių *Artemia* spp. 24 valandų amžiaus nauplijais dukart per dieną darbo dienomis ir kartą per dieną savaitgaliais, pradedant 8 dieną po apvaisinimo. Lervų šėrimas, kuris turėtų būti nuoseklus kiekviename bandymo inde, turėtų būti toks, kad bandomieji gyvūnai galėtų tinkamai augti ir vystytis, taigi būtų užtikrintas tyrimo rezultatų atkuriamumas ir perkeliamumas: 1) vidutinė (medianinė) trukmė iki NF 62 vystymosi stadijos kontrolinėse grupėse turėtų būti ≤ 45 dienos, ir 2) rekomenduojama vidutinė NF 62 stadijos gyvūnų masė kontrolinėse grupėse yra 1,0 ± 0,2 g.

Jauniklių šėrimas

34. Po to, kai baigiasi metamorfozė, šėrimo racioną sudaro aukščiausios rūšies grimztantis varlių pašaras, pvz., „Sinking Frog Food -3/32“ (gamintojas „Xenopus Express“, Florida, JAV) (4 priedėlis). Mažiems varliukams (ankstyvos stadijos jaunikliams) pašaro granulės trumpai malamos kavos malūnėliu, trintuvu ar sugrūdamos grūstuvėje, kad būtų mažesnės. Kai jaunikliai jau yra pakankamai dideli, kad suvartotų nesmulkintas granules, jų malti ar grūsti nebereikia. Gyvūnai turėtų būti šeriami kartą per parą. Jaunikliai turėtų būti šeriami taip, kad jų organizmai galėtų tinkamai augti ir vystytis: rekomenduojama kontrolinės grupės jauniklių vidutinė masė tuo metu, kai baigiamas tyrimas, yra 11,5 ± 3 g.

Cheminė analizė

35. Prieš pradedant tyrimą reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą (pvz., tirpumą, skaidumą ir lakumą) ir visus reikiamus analizės metodus, pvz., remiantis turima informacija arba žiniomis. Dozuojant bandomąją medžiagą per skiedimo vandenį, rekomenduojama prieš pradedant bandymą išanalizuoti bandymo tirpalus iš kiekvieno kartotinio bandinio indo, taip patikrinant sistemos veikimą. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu tinkamais intervalais nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, geriausia kas savaitę bent viename kiekvienos bandomosios grupės kartotiniame bandinyje, kas savaitę renkantis tikrinti vis kitą kartotinį bandinį toje pačioje bandomojoje grupėje. Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei per visą bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo tinkamai palaikoma ±20 % nominaliosios koncentracijos tikslumu, bandymo rezultatus galima pagrįsti nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis. Be to, išmatuotų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių variacijos koeficientas (VK) visu bandymo laikotarpiu kiekvienos koncentracijos bandomojoje grupėje turėtų būti 20 % arba mažesnis. Kai išmatuotosios koncentracijos nepatenka į 80–120 % nominaliosios koncentracijos verčių intervalą (pavyzdžiui, kai bandomos labai biologiškai skaidžios ar lengvai susigeriančios cheminės medžiagos), poveikio koncentracijos per pratekamosios sistemos bandymus turėtų būti nustatomos ir išreiškiamos pagal vidutinę koncentraciją (aritmetinį vidurkį).

36. Skiedimo vandens ir pradinio tirpalo srautai turėtų būti tikrinami tinkamais intervalais (pvz., tris kartus per savaitę) visu veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu. Tais atvejais, kai cheminių medžiagų neįmanoma aptikti esant kai kurioms arba visoms nominaliosioms jų koncentracijos vertėms (pvz., dėl greito irimo ar susigėrimo bandymo induose arba dėl reikšmingo cheminės medžiagos kaupimosi veikiamų gyvūnų organizmuose), rekomenduojama atitinkamai pritaikyti bandymo tirpalo atnaujinimo dažnį kiekvienoje bandymo kameroje, kad bandymo koncentracijos būtų kuo pastovesnės.

Stebėjimai ir vertinamųjų baigčių matavimai

37. Vertinamosios baigtys, vertinamos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu, yra tos, kurios parodo toksiškumą, įskaitant gaištamumą, elgesio anomalijas, kaip antai klinikinius ligos požymius ir (arba) bendrąjį toksiškumą, ir augimo parametrai (ilgis ir masė), taip pat patologinės vertinamosios baigtys, kurios gali atitikti ir bendrąjį toksiškumą, ir endokrininius poveikio būdus per estrogenų, androgenų ar skydliaukės valdomus mechanizmus. Be to, baigiant tyrimą galima, jei norima, išmatuoti VTG koncentraciją kraujo plazmoje. Išmatuoti VTG gali būti naudinga siekiant suprasti tyrimo rezultatų ryšį su endokrininio poveikio mechanizmais, būdingais įtariamoms endokrininę sistemą ardančioms cheminėms medžiagoms. Vertinamosios baigtys ir matavimų laikas apibendrinti 1 lentelėje.

1 lentelė

LAGDA vertinamųjų baigčių apžvalga

Vertinamosios baigtys (*)	Kiekvieną dieną	Tarpinis ėminių ėmimas (lervų ėminiai)	Bandymo užbaigimas (jauniklių ėminiai)
Gaištamumas ir anomalijos	X		
Trukmė iki NF 62 stadijos		X	
Histo(pato)logija (skydliaukės)		X	
Morfometrija (augimas: masės ir ilgio duomenys)		X	X
Kepenų somatinis indeksas (LSI)			X
Genetinis / fenotipinis lyčių santykis			X
Histopatologija (lytinių liaukų, reprodukcinių latakų, inkstų ir kepenų)			X
Vitelogeninas (VTG) (nebūtinai)			X

(*) Visos vertinamosios baigtys statistiškai analizuojamos.

Gaištamumas ir kasdieniai stebėjimai

38. Visi bandymo indai turėtų būti kiekvieną dieną tikrinami, ar nėra nugaišusių gyvūnų, ir užrašomas jų skaičius kiekviename inde. Aptiktus negyvus gyvūnus reikėtų iškart pašalinti iš bandymo indo. Negyvi gyvūnai turėtų būti suklasifikuoti pagal vystymosi stadiją: ankstesnė nei NF 58 stadija (iki priekinių galūnių pasirodymo), NF 58–62 stadijos, NF 63–66 stadijos (nuo NF 62 stadijos iki visiško uodegos išnykimo) ar vėlesnė nei NF 66 stadija (po lervų stadijos pabaigos). Didesnis nei 20 % gaištamumas gali reikšti netinkamas bandymo sąlygas arba pernelyg toksišką bandomosios cheminės medžiagos poveikį. Gyvūnai paprastai yra jautriausi su cheminių medžiagų poveikiu nesusijusiems gaištamumo veiksniams per pirmas kelias vystymosi dienas po ikrų išneršimo ir per metamorfozės kulminaciją. Toks gaištamumas gali būti aiškus iš kontrolinių duomenų.

39. Be to, reikėtų užrašyti pastabas apie bet kokį pastebėtą neįprastą elgesį, aiškiai matomus vystymosi defektus (pvz., skoliozę) ar sužalojimus. Pastebėtus skoliozės atvejus reikėtų suskaičiuoti (dažnį) ir įvertinti balais pagal sunkumą (pvz., nežymi – N, minimali – 1, vidutinė – 2, sunki – 3; žr. 8 priedėlį). Reikėtų stengtis užtikrinti, kad vidutinės ir sunkios skoliozės dažnis būtų nedidelis (pvz., mažesnis nei 10 % kontrolinėse grupėse) per visą tyrimą, nors kai kontrolinėse grupėse yra daugiau anomalijų, tai ne visada yra pakankama priežastis nutraukti bandymą. Normaliam lervos stadijos gyvūnų elgesiui būdinga tai, kad jie kybo vandens sluoksnyje, uodegą laikydami aukščiau galvos, reguliariai ir ritmiškai judina uodegą, periodiškai pakyla į paviršių, judina žiaunų dangtelį ir reaguoja į dirgiklius. Nenormalaus elgesio požymiai būtų, pvz., plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštielninkas arba neįprastas plaukimas, retas pakilimas į paviršių ir nereagavimas į dirgiklius. Stebint gyvūnus po metamorfozės, kartu su minėtomis elgesio anomalijomis reikėtų užrašyti, kada labai skiriasi pašaro kiekių suvartojimas įvairiose bandomosiose grupėse. Prie didelių vystymosi defektų ir sužeidimų galima priskirti, be kita ko, morfologinius išsigimimus (pvz., galūnių deformaciją), kraujuojančias žaizdas, pilvo edemą ir bakterines arba grybelines infekcijas. Jei ant jauniklių galvų (už šnervių) yra žaizdų, tai gali būti požymis, kad drėgnumo lygis yra nepakankamas. Šie nustatomi požymiai yra kokybiniai ir juos reikėtų laikyti panašiais į klinikinius ligos ar streso požymius ir lyginti su kontroliniais gyvūnais. Jei šie reiškiniai yra dažnesni induose su chemine medžiaga negu kontroliniuose induose, reikėtų tai suprasti kaip aiškaus toksiškumo įrodymą.

Lervų poėminis

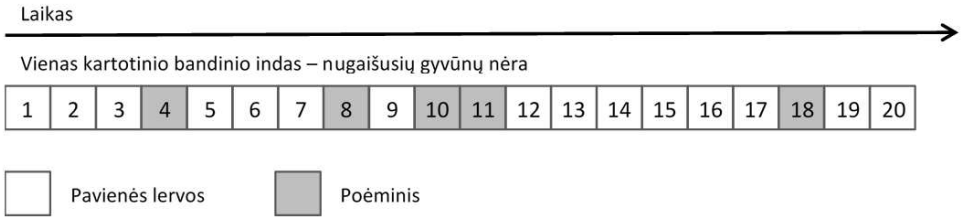
Lervų poėminių ėmimo eiga

40. NF 62 vystymosi stadiją pasiekę buožgalviai turėtų būti išimami iš indų ir panaudojami ėminiams, arba perkeliami, kad būtų galima pradėti kitą veikimo bandomąja medžiaga etapą naujame inde, arba fiziškai atskiriami nuo likusių buožgalvių tame pačiame inde naudojant pertvarą. Buožgalviai kasdien tikrinami ir užrašoma, kurią tyrimo dieną kiekvienas buožgalvis pasiekia NF 62 vystymosi stadiją. Pagrindinis skiriamasis bruožas, kuriuo grindžiamas šis vertinimas, yra galvos forma. Kai galva sumažėja tiek, kad apžiūrint atrodo maždaug tokio paties pločio kaip buožgalvio kūnas, o priekinės galūnės yra ties širdies viduriu, tas individas skaičiuojamas kaip pasiekęs NF 62 stadiją.

41. Tikslas yra paimti ėminiams iš viso penkis NF 62 stadijos buožgalvius iš kiekvieno kartotinio bandinio indo. Tai turėtų būti daroma visiškai atsitiktine tvarka, tačiau sprendimas dėl to priimamas iš anksto. Kartotinio bandymo indo galimas pavyzdys pateiktas **1 diagramoje**. Jei konkrečiame inde būtų 20 išgyvenusių buožgalvių, pirmajam individui pasiekus NF 62 stadiją, reikėtų atsitiktine tvarka pasirinkti penkis skaičius iš 1–20. 1-asis buožgalvis yra pirmasis NF 62 stadiją pasiekęs individas, o 20-asis buožgalvis – individas, kuris paskutinis pasiekė NF 62 stadiją tame inde. Panašiai ir kai inde yra 18 išgyvenusių lervų, reikėtų pasirinkti penkis atsitiktinius skaičius iš 1–18. Reikėtų atlikti šią atranką kiekviename kartotinio bandinio inde tada, kai pirmasis bandymui naudojamas individas pasiekia NF 62 stadiją. Jei imant NF 62 stadijos ėminius yra nugaišusių gyvūnų, likusius ėminius reikia iš naujo perskirstyti atsitiktine tvarka pagal tai, kiek yra likusių <NF 62 stadijos lervų ir kiek dar ėminių reikia paimti, kad iš to kartotinio bandinio būtų gauti iš viso penki ėminiai. Tą dieną, kai buožgalvis pasiekia NF 62 vystymosi stadiją, remiantis parengta ėminių ėmimo lentele, nustatoma, ar tą individą reikia panaudoti ėminiams, ar fiziškai atskirti nuo likusių buožgalvių tolesniam veikimui bandomąja medžiaga. Pateiktame pavyzdyje (1 diagrama) pirmasis individas, pasiekęs NF 62 stadiją (t. y. 1-asis langelis), fiziškai atskiriamas nuo kitų lervų, toliau veikiamas bandomąja medžiaga ir užrašoma, kurią tyrimo dieną tas individas pasiekė NF 62 stadiją. Vėliau 2-asis ir 3-iasis individai tvarkomi taip pat kaip ir 1-asis, o po to 4-asis individas paimamas ėminiams dėl augimo ir skydliaukės histologiniam tyrimui (pagal šį pavyzdį). Ši procedūra tęsiama iki tol, kol 20-asis individas perkeliamas kartu su likusiais NF 62 stadiją pasiekusiais individais arba paimamas ėminiams. Naudojama atrankos atsitiktine tvarka procedūra turi būti tokia, kad kiekvieno bandomojo organizmo išrinkimo tikimybė būtų vienoda. Tai galima pasiekti taikant bet kokį randomizavimo metodą, bet taip pat per NF 62 stadijos poėminių ėmimo laikotarpį kuriuo nors metu reikia kiekvieną buožgalvį pagauti tinklu.

1 diagrama

NF 62 stadijos ėminių ėmimo iš vieno kartotinio bandinio indo eiga (hipotetinis pavyzdys)



42. Iš lervų poėminio gaunamos šios vertinamosios baigtys: 1) trukmė iki NF 62 stadijos (t. y. kiek dienų praėjo nuo apvaisinimo iki pasiekta NF 62 stadija), 2) išorinės anomalijos, 3) morfometriniai parametrai (pvz., masė ir ilgis) ir 4) skydliaukės histologiniai duomenys.

Humaniškas buožgalvių numarinimas

43. Imant poėminį, NF 62 stadijos buožgalviai (5 individai iš kiekvieno kartotinio bandinio) turėtų būti numarinami 30 minučių panardinant į anestetiko tirpalo (pvz., MS-222, trikaino metansulfonato, CAS.886-86-2, 0,3 % tirpalo) tinkamą kiekį (pvz., 500 ml). MS-222 tirpalas turėtų būti paruoštas naudojant buferį – natrio hidrokarbonatą, kad pH būtų apie 7,0, nes MS-222 tirpalas be buferio yra rūgštus ir dirginantis varlių odą, todėl prastai įsigeria ir sukelia nereikalingą papildomą stresą organizmams.

44. Naudojant tinklinį graibštelį, buožgalvis išimamas iš bandymo kameros ir perkeliamas (įleidžiamas) į numarinimo tirpalą. Gyvūnas yra tinkamai numarintas ir paruoštas skrodimui, kai nebereaguoja į išorinius dirgiklius, pavyzdžiui, į užpakalinės galūnės suspaudimą žnyplelėmis.

Morfometriniai parametrai (masė ir ilgis)

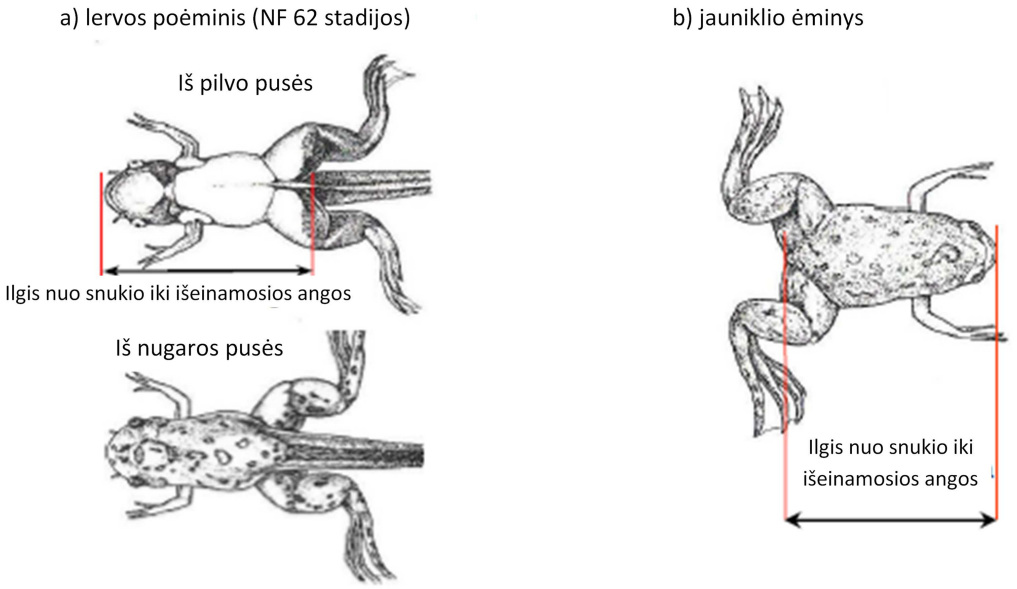
45. Kiekvieno buožgalvio šlapio kūno masę (miligramo tikslumu) ir ilgį nuo snukio iki išeinamosios angos (0,1 mm tikslumu) reikėtų išmatuoti iškart po to, kai jis nebereaguoja po anestetiko poveikio (2a diagrama). Galima, naudojant vaizdo analizės programinę įrangą, ilgį nuo snukio iki išeinamosios angos išmatuoti iš nuotraukos. Prieš sveriant buožgalvius reikėtų juos nusausinti sugeriamuoju popieriumi, pašalinant likusio vandens perteklių. Po kūno dydžio (masės ir ilgio nuo snukio iki išeinamosios angos) matavimų reikėtų užrašyti arba pažymėti bet kokias dideles morfologines anomalijas ir (arba) klinikinius toksiškumo požymius, tokius kaip skoliozė (žr. 8 priedėlį), petechijos ir kraujavimas, ir rekomenduojama tai užrašyti skaitmeniniuose dokumentuose. Petechijos yra mažos raudonos arba purpurinės kraujosruvos odos kapiliaruose.

Audinio paėmimas ir užfiksavimas

46. Lervų poėminio skydliaukės paimamos histologiniam tyrimui. Apatinė kūno dalis žemiau priekinių galūnių atskiriama ir pašalinama. Taip sutrumpinta skerdena užfiksuojama Davidson'o fiksatoriumi. Fiksatoriaus tūris inde turėtų būti bent 10 kartų didesnis nei apytikris audinių tūris. Fiksatorių reikėtų tinkamai maišyti arba palaikyti jo cirkuliaciją, kad reikiami audiniai būtų tinkamai užfiksuoti. Visi audiniai laikomi Davidson'o fiksatoriaus tirpale mažiausiai 48 valandas, bet ne ilgiau kaip 96 valandas, o tada nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir laikomi 10 % neutraliame buferizuotame formalino tirpale (1) (29).

Skydliaukės histologinis tyrimas

47. Kiekviename lervų poėminyje (iš fiksuotų audinių) histologiškai įvertinamos skydliaukės, t. y. atliekama diagnostika ir poveikio stiprumo laipsnio nustatymas (29) (30).



2 diagrama. Gairės vertinant ilgį nuo snukio iki išeinamosios angos per LAGDA tyrimą: a) NF 62 stadijos ir b) ir jauniklių varlių. NF 62 stadijos (a) skiriamieji bruožai: galva tokio paties pločio kaip kūnas, uoslės nervo ilgis trumpesnis negu uodžiamojo stormens skersmuo (vaizdas iš nugaros pusės), o priekinės galūnės yra ties širdimi (vaizdas iš pilvo pusės). Vaizdai pritaikyti iš Nieuwkoop ir Faber (1994). **Lervų veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pabaiga**

48. Atsižvelgiant į pradinį buožgalvių skaičių, tikėtina, kad bus nedidelė procentinė dalis individų, kurie normaliai nesivystys ir nebaigs metamorfozės (NF 66 stadijos) tinkamu laiku. Veikimas bandomąja medžiaga lervų stadijoje turėtų trukti ne ilgiau kaip 70 dienų. Bet kokie šio laikotarpio pabaigoje likę buožgalviai turėtų būti numarinti (žr. 43 punktą), išmatuota jų šlapio kūno masė ir ilgis nuo snukio iki išeinamosios angos, nustatyta vystymosi stadija pagal Nieuwkoop ir Faber (1994) ir užrašytos pastabos apie bet kokias vystymosi anomalijas.

Gyvūnų skaičiaus sumažinimas po NF 66 stadijos

49. Nuo NF 66 stadijos (visiško uodegos išnykimo) iki bandymo pabaigos kiekviename bandymo inde turėtų būti toliau laikoma 10 individų. Todėl po to, kai visi gyvūnai pasiekia NF 66 stadiją, arba po 70 dienų (priklausomai nuo to, kas įvyksta anksčiau), jų skaičių reikėtų sumažinti. Gyvūnai po NF 66 stadijos, kurie nebus toliau naudojami bandymui, turėtų būti atrinkti atsitiktine tvarka.

50. Gyvūnai, nepasirinkti tolesniam veikimui bandomąja medžiaga, yra numarinami (žr. 43 skirsnį). Atliekamas kiekvieno gyvūno vystymosi stadijos nustatymas, šlapio kūno masės ir ilgio nuo snukio iki išeinamosios angos (2b diagrama) matavimai ir bendras skrodimas. Pažymima fenotipinė lytis (pagal lytinių liaukų morfologiją) – patelė, patinas ar neaiški lytis.

Jauniklių ėminių ėmimas

Jauniklių ėminių ėmimo eiga

51. Likę gyvūnai skiedimo vandens (ir (arba) tirpiklio, jei tinka) kontrolinėje grupėje toliau veikiami bandomąja medžiaga iki praeina 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija. Veikimo laikotarpio pabaigoje likę gyvūnai (ne daugiau kaip 10 varlių iš kiekvieno kartotinio bandinio) numarinami ir išmatuojamos arba įvertinamos ir užrašomos įvairios vertinamosios baigtys: 1) morfometriniai parametrai (masė ir ilgis), 2) fenotipinis / genotipinis lyčių santykis, 3) kepenų masė (kepenų somatinis indeksas), 4) histopatologija (lytinių liaukų, reprodukcinių latakų, kepenų ir inkstų) ir (nebūtinai) 5) VTG kraujo plazmoje.

Humaniškas varlių numarinimas

52. Ėminiams imami jaunikliai (varlės po metamorfozės) numarinami anestetiko injekcija (pvz., 10 % MS-222 tinkamame fosfatiniame buferiniame tirpale) į pilvo ertmę. Varlių ėminius galima imti po to, kai jos nebereaguoja į dirgiklius (paprastai praėjus apie 2 min. po injekcijos, jei naudojama 10 % MS-222 dozė yra 0,01 ml/g varlės kūno masės). Nors jaunikles varles būtų galima panardinti į didesnės koncentracijos anestetiko (MS-222) tirpalą, iš patirties žinoma, kad šiuo metodu jų anestezavimas trunka ilgiau ir tokios trukmės gali nepakakti, kad būtų galima paimti ėminius. Injekcija yra efektyvus ir greitas numarinimas prieš ėminių ėmimą. Ėminių nereikėtų pradėti imti tol, kol neįsitikinta, kad varlės nebereaguoja į dirgiklius, taigi yra negyvos. Jei yra požymių, kad varlės patiria didelių kančių (kurios yra labai didelės ir galima patikimai prognozuoti žūtį), ir jos laikomos gaištančiomis, reikėtų tuos gyvūnus anestezuoti ir numarinti, o per duomenų analizę traktuoti kaip nugaišusius gyvūnus. Kai varlės numarinamos dėl liguistumo, reikėtų tai užrašyti ir pranešti ataskaitoje. Priklausomai nuo to, kuriame tyrimo etape varlė numarinama, galima pasilikti ją histopatologinei analizei (užfiksuoti varlę, kad būtų galima atlikti tyrimą dėl galimos histopatologijos).

Morfometriniai parametrai (masė ir ilgis)

53. Šlapio kūno masės ir ilgio nuo snukio iki išeinamosios angos (2b diagrama) matavimai yra tokie patys kaip aprašytieji lervų poėminio matavimai.

VTG nustatymas kraujo plazmoje (nebūtinas)

54. VTG yra visuotinai pripažintas estrogeninių cheminių medžiagų poveikio biologinis žymuo. Atliekant LAGDA tyrimą galima išmatuoti VTG plazmoje iš jauniklių ėminių (tai gali būti ypač aktualu, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga yra estrogenas).

55. Numarintų jauniklių užpakalinės galūnės nupjaunamos ir kraujas paimamas heparinizuotu kapiliariniu vamzdeliu (nors gali būti tinkami ir alternatyvūs kraujo paėmimo metodai, tokie kaip širdies punkcija). Kraujas išleidžiamas į mikrocentrifugos mėgintuvėlį (pvz., 1,5 ml tūrio) ir centrifuguojant gaunama plazma. Plazmos ėminiai iki VTG nustatymo turėtų būti laikomi −70 °C arba žemesnėje temperatūroje. VTG koncentraciją plazmoje galima matuoti imunofermentinės analizės (IFA, angl. ELISA) metodu (6 priedėlis) arba alternatyviu metodu, tokiu kaip masės spektrometrija (31). Patartina dėl didesnio jautrumo rinktis konkrečios rūšies antikūnus.

Genetinės lyties nustatymas

56. Kiekvienos jauniklės varlės genetinė lytis įvertinama pagal požymius, nustatytus Yoshimoto *et al.* (11). Siekiant nustatyti genetinę lytį, vienos per skrodimą pašalintos užpakalinės galūnės dalis (ar visa galūnė) ar bet koks kitas audinys paimamas ir laikomas mikrocentrifugos mėgintuvėlyje (varlių audinių ėminius galima imti iš bet kurio audinio). Audinį galima laikyti −20 °C ar žemesnėje temperatūroje iki deoksiribonukleorūgšties (DNR) išskyrimo. DNR iš audinių galima išskirti naudojant rinkinius, kuriuos galima nusipirkti, o atitinkamo žymens buvimas arba nebuvimas analizuojamas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu (5 priedėlis). Apskritai kontrolinių gyvūnų histologinės lyties ir genotipo atitiktis tuo metu, kai imami jauniklių ėminiai, kontrolinėse grupėse yra didesnė nei 95 %.

Audinių paėmimas ir fiksavimas histopatologiniam tyrimui

57. Per galutinį ėminių ėmimą histologinei analizei paimamos lytinės liaukos, reprodukciniai latakai, inkstai ir kepenys. Atveriama pilvo ertmė, kepenys išskrodžiamos ir pasveriamos. Tada iš apatinės pilvo dalies atsargiai išimami virškinamojo trakto organai (pvz., skrandis, žarnynas), atidengiant lytines liaukas, inkstus ir reprodukcinius latakus. Bet kokios lytinių liaukų makroskopinės morfologinės anomalijos turėtų būti užrašytos. Galiausiai reikėtų pašalinti užpakalines galūnes, jei jos dar nepašalintos imant kraują. Surinktos kepenys ir skerdena su joje *in situ* paliktomis lytinėmis liaukomis turėtų būti iškart įdedamos į Davidson'o fiksatorių. Fiksatoriaus tūris inde turėtų būti bent 10 kartų didesnis nei apytikris audinių tūris. Visi audiniai laikomi Davidson'o fiksatoriaus tirpale mažiausiai 48 valandas, bet ne ilgiau kaip 96 valandas, o tada nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir laikomi 10 % neutraliame buferizuotame formalino tirpale (1) (29).

Histopatologinis tyrimas

58. Kiekvienas jauniklio ėminys įvertinamas histologiškai, ar nėra patologijų lytinėse liaukose, reprodukciniuose latakuose, inkstuose ir kepenų audinyje, t. y. atliekama diagnostika ir poveikio stiprumo laipsnio nustatymas (32). Per šį vertinimą taip pat sužinomas lytinių liaukų fenotipas (pvz., kiaušidės, sėklidės ar hermafroditiniai organai) ir šie stebėjimai kartu su individų genetiniais lyties nustatymais gali būti naudojami apskaičiuojant fenotipinį / genotipinį lyčių santykį.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Statistinė analizė

59. Atliekant LAGDA tyrimą gaunami trijų formų duomenys, kurie turi būti statistiškai analizuojami: 1) kiekybiniai tolydieji duomenys (masė, ilgis nuo snukio iki išeinamosios angos, kepenų somatinis indeksas, VTG), 2) laiko iki įvykio duomenys, vertinant vystymosi spartą (t. y. dienomis nuo tyrimo pradžios iki NF 62 stadijos), ir 3) rangų skalės duomenys, pateikiami kaip poveikio stiprumo balai ar vystymosi stadijos, nustatytos histopatologiniais vertinimais.

60. Rekomenduojama taip parengti bandymo planą ir pasirinkti statistinį kriterijų, kad būtų galima pakankamai patikimai nustatyti biologiškai svarbius vertinamųjų baigčių pokyčius, kai ataskaitoje reikia pateikti NOEC ar ECx. Statistines duomenų analizes (apskritai atliekamas kartotinių bandinių vidurkių pagrindu) patartina atlikti pagal procedūras, aprašytas dokumente dėl ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės dabartinių metodų (taikymo gairėse) (33). Šio bandymo metodo 7 priedėlyje pateikta rekomenduojama statistinės analizės sprendimų schema ir rekomendacijos, kaip apdoroti duomenis ir kaip pasirinkti tinkamiausią LAGDA naudoti statistinį kriterijų ar modelį.

61. Jauniklių ėminių duomenys (pvz., augimo duomenys, kepenų somatinis indeksas) turėtų būti analizuojami atskirai pagal genotipinę lytį, nes nustatoma visų varlių genotipinė lytis.

Aktualūs duomenų analizės aspektai

Reikalavimų neatitinkančių kartotinių bandinių ir bandomųjų grupių naudojimas

62. Kai kurie kartotiniai bandiniai ir bandomosios grupės gali nebeatitikti reikalavimų dėl per didelio gaištamumo, kurio priežastis yra aiškus toksiškumas, liga ar techninė klaida. Jei kuri nors bandomoji grupė nebeatitinka reikalavimų dėl ligos ar techninės klaidos, turėtų būti likę trys analizei tinkamos reikalavimus atitinkančios bandomosios grupės su trimis reikalavimus atitinkančiais kartotiniais bandiniais. Jei aiškus toksiškumas paveikia didelės dozės bandomąją grupę arba grupes, patartina, kad būtų galima pateikti analizei bent trijų dozių bandomąsias grupes su trimis reikalavimus atitinkančiais kartotiniais bandiniais (laikantis didžiausios toleruojamos koncentracijos (angl. *Maximum Tolerated Concentration*, MTC) metodo pagal EBPO bandymų gaires (34)). Kiti aiškaus toksiškumo požymiai kartu su gaištamumu gali būti poveikis elgsenai (pvz., plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštielninkas arba neįprastas plaukimas, retas pakilimas į paviršių), morfologiniai pažeidimai (pvz., kraujuojančios žaizdos, pilvo edema) arba įprastų maitinimosi reakcijų slopinimas, kokybiniu atžvilgiu lyginant su kontroliniais gyvūnais.

Tirpiklio kontrolinis bandinys

63. Baigus bandymą turėtų būti įvertintas galimas tirpiklio (jei jis naudojamas) poveikis. Tai daroma atliekant tirpiklio kontrolinės grupės ir skiedimo vandens kontrolinės grupės statistinį palyginimą. Svarbiausios vertinamosios baigtys, į kurias reikia atsižvelgti atliekant šią analizę, yra augimo parametrai (masė ir ilgis), nes jie gali būti paveikti bendrojo toksiškumo. Jei nustatoma statistiškai reikšmingų šių vertinamųjų baigčių skirtumų tarp skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių grupių, reikėtų, vadovaujantis profesine nuovoka, nuspręsti, ar tai kenkia bandymo tinkamumui. Jei abi kontrolinės grupės skiriasi, cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes reikėtų palyginti su tirpiklio kontroline grupe, nebent būtų žinoma, kad geriau atlikti palyginimą su skiedimo vandens kontroline grupe. Jei nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp abiejų kontrolinių grupių, rekomenduojama bandomosios cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes palyginti su jungtinėmis (tirpiklio ir skiedimo vandens) kontrolinėmis grupėmis, nebent būtų žinoma, kad geriau lyginti tik su skiedimo vandens ar tik su tirpiklio kontroline grupe.

Bandymo ataskaita

64. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės.

— Vienkomponentė medžiaga:

fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės;

cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt. (įskaitant bendrosios organinės anglies kiekį, jei tinka).

— Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

kuo išsamesnis apibūdinimas: cheminė tapatybė (žr. pirmiau), kiekybinė sudėtis ir svarbios sudedamųjų dalių fizikinės ir cheminės savybės.

Bandomųjų gyvūnų rūšys:

— mokslinis pavadinimas, padermė (jei žinoma), gavimo šaltinis ir apvaisintų ikrų surinkimo metodas bei vėlesnis apdorojimas;

— skoliozės dažnis ankstesniuose kontroliniuose bandiniuose iš tos naudojamos pradinės kultūros.

Bandymo sąlygos:

— apšvietimo laikotarpis (-iai);

— bandymo planas (pvz., kamerų dydis, medžiaga ir vandens tūris, bandymo kamerų ir kartotinių bandinių skaičius, bandomųjų organizmų skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje);

— pradinių tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpiklį ir jo koncentraciją, kai jis naudojamas);

— bandomosios cheminės medžiagos dozavimo metodas (pvz., siurbliai, skiedimo sistemos);

— regeneravimo našumas pagal šį metodą ir ir nominaliosios bandymui naudojamos koncentracijos vertės, kiekybinio nustatymo riba, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai bandymo induose bei metodas, pagal kurį jie nustatyti, taip pat įrodymas, kad tie matavimai parodo bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas realiame tirpale;

— skiedimo vandens savybės: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, bendras chloro kiekis (jei matuojamas), bendras jodo kiekis, bendroji organinė anglis (jei matuojama), suspenduotos kietosios dalelės (jei matuojamos), bandymo terpės druskingumas (jei matuojamas) ir bet kokie kiti atlikti matavimai;

— nominaliosios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai;

— bandymų induose esančio vandens kokybė, pH, kietumas, temperatūra (matuojama kasdien) ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie šėrimą (pvz., pašarų rūšis, šaltinis, duodamas kiekis ir dažnis).

Rezultatai:

— įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka tinkamumo kriterijus;

— šie kontrolinės grupės (ir tirpiklio kontrolinės grupės, kai ji naudojama) bei bandomųjų grupių duomenys: gaištamumas ir pastebėtos anomalijos, trukmė iki NF 62 stadijos, skydliaukės histologinis vertinimas (tik lervų bandinio), augimas (masė ir ilgis), kepenų somatinis indeksas (tik jauniklių bandinio), genetinis / fenotipinis lyčių santykis (tik jauniklių bandinio), lytinių liaukų, reprodukcinių latakų ir kepenų histopatologinio vertinimo rezultatai (tik jauniklių bandinio) ir VTG kraujo plazmoje (tik jauniklių bandinio, jei nustatomas);

— statistinės analizės metodas ir duomenų apdorojimas (taikytas statistinis kriterijus ar modelis);

— nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) vertinant kiekvieną atsaką;

— mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) vertinant kiekvieną atsaką ($\alpha = 0{,}05$); kiekvieno vertinto atsako ECx vertė, jei taikoma, ir pasikliautinieji intervalai (pvz., 95 %), taip pat jos apskaičiavimui naudoto priderinto modelio grafikas, koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės krypties koeficientas, regresijos modelio formulė, įvertinti modelio parametrai ir jų standartinės paklaidos;

— bet koks nukrypimas nuo bandymo metodo, nukrypimai nuo priimtinumo kriterijų ir apsvarstytas galimas to poveikis bandymo rezultatui.

65. Teikiant vertinamųjų baigčių matavimų rezultatus turėtų būti pateiktos vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai (jei įmanoma, tiek kartotinio bandinio, tiek koncentracijos pagrindu).

66. Turėtų būti apskaičiuota vidutinė (medianinė) trukmė iki NF 62 vystymosi stadijos kontrolinėse grupėse, kuri turėtų būti pateikta kaip kartotinių bandinių medianinių verčių ir jų standartinio nuokrypio vidurkis. Taip pat bandomosiose grupėse turėtų būti apskaičiuota kiekvienos bandomosios grupės medianinė vertė ir pateikta kaip kartotinių bandinių medianinių verčių ir jų standartinio nuokrypio vidurkis.

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 P. D. 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 A. W., Kosian P. A., Korte J. J., Holcombe G. W., Woodis K. and Degitz S. J. (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 A. W., Korte J. J., Woodis K. K., Bennett B. A., Ostazeski S. and Degitz S. J. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

(13) Tobias M. L., Tomasson J. and Kelley D. B. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.

(14) Qin Z. F., Qin X. F., Yang L., Li H. T., Zhao X. R. and Xu X. B. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.

(15) Porter K. L., Olmstead A. W., Kumsher D. M., Dennis W. E., Sprando R. L., Holcombe G. W., Korte J. J., Lindberg-Livingston A. and Degitz S. J. (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) Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo bandymas.

(18) Šio priedo C.29 skyrius. Lengvas biologinis skaidumas. CO_2 sandariuose induose (viršerdvės bandymas).

(19) Kahl M. D., Russom C. L., DeFoe D. L. and Hammermeister D. E. (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M., Åkerman G., Jahnke A., Mayer P., McLachlan M. S. (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 T. H., Shillabeer N., Winter M. J. and Pickford D. B. (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 B. T. (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) Šio priedo C.38 skyrius. Varliagyvių metamorfozės tyrimas.

(26) Šio priedo C.48 skyrius. Trumpalaikis žuvų reprodukcijos tyrimas.

(27) Šio priedo C.41 skyrius. Žuvų lytinio vystymosi bandymas.

(28) Šio priedo C.49 skyrius. Ūmaus toksiškumo žuvų embrionams (FET) bandymas.

(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 K. C., Wolfe M., Braunbeck T., Iguchi T., Ohta Y., Tooi O., Touart L., Wolf D. C. and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415-424.

(31) Luna L. G. 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 T. H., Bögi C., Winter M. J., Owens J. W., 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197-202.

1 priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Apikalinė vertinamoji baigtis– tokia vertinamoji baigtis, kai patiriamas poveikis populiacijos lygiu.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

IFA (angl. ELISA)– imunofermentinė analizė.

ECx– (x % poveikio sukelianti koncentracija) – koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per tam tikrą veikimo bandomąja medžiaga laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC50 yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, per tam tikrą nustatytą jos ekspozicijos laikotarpį padaro poveikį bandymo vertinamajai baigčiai pusėje (50 %) paveiktos populiacijos.

d. p. a.– dienos po apvaisinimo.

Pratekamosios sistemos bandymas– toks bandymas, kai per bandymo sistemą visu bandomosios medžiagos poveikio laikotarpiu teka nuolatinis bandymo tirpalų srautas.

HPG ašis– pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

IUPAC– Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC)– mažiausia bandomoji cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebėtas statistiškai reikšmingas jos poveikis (esant $p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe. Tačiau visų LOEC viršijančių bandomosios medžiagos koncentracijų kenksmingas poveikis turėtų būti lygus LOEC poveikiui arba už jį didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, reikėtų išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė. Rekomendacijų pateikta 7 priedėlyje.

Vidutinė mirtina koncentracija (LC50)– bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant, kaip įvertinta, per visą bandymą žūsta 50 % bandomųjų organizmų.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC)– bandomosios medžiagos koncentracija, kiek mažesnė už LOEC, kuri, palyginti su kontroline grupe, per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$).

SMILES– supaprastinto molekulių pateikimo linijine forma specifikacija (angl. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Bandomoji cheminė medžiaga– taikant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

UVCB– nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

VTG– vitelogeninas, fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris paprastai gaminamas visų kiaušinius dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

2 priedėlis

KAI KURIOS SKIEDIMUI TINKAMO VANDENS CHEMINĖS SAVYBĖS

Medžiaga	Ribinė koncentracija
Kietosios dalelės	5 mg/l
Bendroji organinė anglis	2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
Bendras chloro kiekis	10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	25 ng/l
Aliuminis	1 µg/l
Arsenas	1 µg/l
Chromas	1 µg/l
Kobaltas	1 µg/l
Varis	1 µg/l
Geležis	1 µg/l
švinas	1 µg/l
Nikelis	1 µg/l
Cinkas	1 µg/l
Kadmis	100 ng/l
Gyvsidabris	100 ng/l
Sidabras	100 ng/l

3 priedėlis

LAGDA BANDYMO SĄLYGOS

1.	Bandomoji rūšis	*Xenopus laevis*
2.	Bandymo tipas	Pratekamosios srovės
3.	Vandens temperatūra	Nominalioji temperatūra yra 21 °C. Vidutinė temperatūra per visą bandymą yra 21 ± 1 °C (skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 1,0 °C)
4.	Apšvietimo kokybė	Liuminescencinės (plataus spektro) lempos, 600–2 000 lux (liumenų/m^2) ties vandens paviršiumi
5.	Apšvietimo laikotarpis	12 val. šviesos, 12 val. tamsos
6.	Bandymo tirpalo tūris ir bandymo indas (akvariumas)	4–10 l (minimalus vandens gylis 10–15 cm) Stiklinis ar nerūdijančiojo plieno indas
7.	Bandymo tirpalų tūrio keitimas	Nuolatinis, užtikrinant ir reikiamų biologinių sąlygų palaikymą, ir cheminės medžiagos veikimą (pvz., visas indo tūris pakeičiamas 5 kartus per parą)
8.	Bandomųjų organizmų amžius bandymo pradžioje	Neuwkoop ir Faber (NF) 8–10 vystymosi stadijos
9.	Organizmų skaičius kartotiniame bandinyje	20 gyvūnų (embrionų) kiekviename inde (kartotiniame bandinyje) pradedant veikimą bandomąja medžiaga ir 10 gyvūnų (jauniklių) kiekviename inde (kartotiniame bandinyje) po NF 66 stadijos iki veikimo bandomąja medžiaga pabaigos
10.	Bandomųjų grupių skaičius	Ne mažiau kaip 4 bandomosios cheminės medžiagos dozių bandomosios grupės ir tinkama kontrolinė grupė arba grupės
11.	Kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje	4 kartotiniai bandiniai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir 8 kartotiniai bandiniai kontrolinėje grupėje arba grupėse
12.	Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija veikiamų organizmų skaičius	Ne mažiau kaip 80 gyvūnų kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir ne mažiau kaip 160 gyvūnų kontrolinėje grupėje arba grupėse
13.	Skiedimo vanduo	Bet koks vanduo, kuriame gali normaliai augti ir vystytis *X. laevis* (pvz., šaltinio vanduo ar per aktyvintąsias anglis filtruotas vandentiekio vanduo)
14.	Aeravimas	Nebūtinas, tačiau gali reikėti aeruoti akvariumus, jei ištirpusio deguonies kiekiai nesiekia rekomenduojamų ribų ir maksimaliai padidinamas bandomojo tirpalo srautas.
15.	Bandymo tirpale ištirpęs deguonis	Ištirpęs deguonis: ≥40 % oro soties vertės arba ≥3,5 mg/l

16. Bandymo tirpalo pH	6,5–8,5 (skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 0,5)
17. Bandymo tirpalo kietumas ir šarmingumas	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Šėrimo režimas	(Žr. 4 priedėlį)
19. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis	Nuo NF 8–10 vystymosi stadijos iki 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 stadija vandens ir (arba) tirpiklio kontrolinėje grupėje (ilgiausiai 17 savaičių)
20. Biologinės vertinamosios baigtys	Gaištamumas (ir išvaizdos anomalijos), trukmė iki NF 62 stadijos (lervų ėminio), skydliaukės histologinis vertinimas (lervų ėminio), augimas (masė ir ilgis), kepenų somatinis indeksas (jauniklių ėminio), genetinis / fenotipinis lyčių santykis (jauniklių ėminio), lytinių liaukų, reprodukcinių latakų, inkstų ir kepenų histopatologija (jauniklių ėminio) ir vitelogeninas kraujo plazmoje (jauniklių ėminio, nebūtinai)
21. Bandymo tinkamumo kriterijai	Ištirpęs deguonis turėtų sudaryti >40 % oro soties vertės; vidutinė vandens temperatūra turėtų būti 21 ± 1 °C, o skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių turėtų būti <1,0 °C; bandomojo tirpalo pH turėtų būti tarp 6,5 ir 8,5; gaištamumas kontrolinėje grupėje turėtų būti ≤20 % kiekviename kartotiniame bandinyje, o vidutinė trukmė iki NF 62 stadijos kontrolinėje grupėje turėtų būti ≤45 dienos; bandomųjų organizmų vidutinė masė NF 62 stadijoje ir užbaigus tyrimą kontroliniuose bandiniuose ir tirpiklio kontroliniuose bandiniuose (jei jie naudojami) turėtų siekti atitinkamai 1,0 ± 0,2 ir 11,5 ± 3 g; turėtų būti gauta įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai palaikomos vidutinių išmatuotų verčių ±20 % tikslumu.

4 priedėlis

ŠĖRIMO REŽIMAS

Reikėtų pažymėti, kad nors rekomenduojamas šis šėrimo režimas, galima rinktis ir kitokias alternatyvas, jei bandomųjų organizmų augimo ir vystymosi sparta yra tinkama.

Lervų šėrimas

Lervų šėrimo raciono paruošimas

A. 1:1 (tūrio) upėtakių pradinio pašaro: dumblių / *TetraFin*® (ar lygiaverčio):

1. upėtakių pradinis pašaras: maišytuvu dideliu greičiu per 20 sekundžių suplakama 50 g upėtakių pradinio pašaro (smulkių granulių arba miltelių) su 300 ml tinkamo filtruoto vandens;

2. dumblių / *TetraFin*® (ar lygiavertis) mišinys: maišytuvu dideliu greičiu per 40 sekundžių suplakama 12 g spirulinų dumblių granulių su 500 ml filtruoto vandens, suplakama 12 g *Tetrafin*® (arba lygiaverčio pašaro) su 500 ml filtruoto vandens ir šie mišiniai sujungiami, kad susidarytų 1 l mišinio, kuriame būtų 12 g/l spirulinų ir 12 g/l *Tetrafin*® (ar lygiaverčio pašaro);

3. sujungiama po vienodą tūrį sumaišyto upėtakių pradinio pašaro su dumblių ir *TetraFin*® (ar lygiaverčio pašaro) mišiniu.

B. Sūriavandenės krevetės

15 ml sūriavandenių krevečių kiaušinėlių inkubuojama 1 l sūraus vandens (paruošiamo dedant 20 ml NaCl į 1 l dejonizuoto vandens) iki išsiritimo. Po aeravimo 24 valandas kambario temperatūroje, nuolatinio apšvietimo sąlygomis, surenkamos sūriavandenės krevetės. Sustabdžius aeravimą jos trumpą laiką (30 min.) palaikomos, kad nusėstų ant dugno. Į indo paviršių iškilusios cistos nupilamos ir išmetamos, o krevetės perkošiamos per tinkamus filtrus ir įpilama filtruoto vandens, kad susidarytų 30 ml tūris.

Šėrimo protokolas

1 lentelėje pateiktos gairės dėl pašaro, naudojamo lervų stadijos gyvūnams šerti veikimo bandomąja medžiaga etape, rūšies ir kiekio. Gyvūnai turėtų būti šeriami tris kartus per dieną nuo pirmadienio iki penktadienio ir kartą per dieną savaitgaliais.

1 lentelė.

X. *laevis* lervų šėrimo režimas pratekamosios sistemos sąlygomis

Laikas (*) (po apvaisinimo)	Upėtakių pradinis pašaras: dumbliai / *TetraFin*® *(ar lygiavertis)*		Sūriavandenės krevetės	
	Darbo dienomis (3 kartus per dieną)	Savaitgaliais (kartą per dieną)	Darbo dienomis (du kartus per dieną)	Savaitgaliais (kartą per dieną)
4–14 dienos (0–1 savaitės)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (nuo 8 iki 15 dienos) 1 ml (nuo 16 dienos)	0,5 ml (nuo 8 iki 15 dienos) 1 ml (nuo 16 dienos)
2 savaitė	0,67 ml	2,4 ml		
3 savaitė	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4 savaitė	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

5 savaitė	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6 savaitė	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7 savaitė	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8–10 savaitės	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) 0 diena yra ta diena, kurią atliekama hCG injekcija.

Perėjimas nuo lervų prie jauniklių šėrimo raciono

Kai lervos baigia metamorfozę, pereinama prie jauniklių šėrimo raciono, kaip paaiškinta toliau. Šiame pereinamajame etape lervų šėrimo racioną reikėtų mažinti, didinant jauniklių raciono dalį. Tai galima pasiekti proporcingai mažinant lervų pašaro dalį ir proporcingai didinant jauniklių pašaro dalį, kai kiekviena penkių buožgalvių grupė pasiekia NF 62 stadiją ir artėja metamorfozės pabaiga NF 66 stadijoje.

Jauniklių šėrimas

Jauniklių šėrimo racionas

Kai baigiasi metamorfozė (66 stadija), pakeičiamas šėrimo režimas, pereinant prie aukščiausios rūšies grimztančio varlių pašaro 3/32 colio dydžio granulėmis (*Xenopus Express*™, Florida, JAV) arba lygiaverčio pašaro, ir šeriama tik juo.

Grūstų granulių paruošimas lervoms, pereinančioms į jauniklio stadiją

Grimztančio varlių pašaro granulės trumpai pasmulkinamos kavos malūnėliu, maišytuvu arba grūstuvėje, maždaug 1/3 sumažinant granulių dydį. Per ilgai smulkinti, kol pašaras virs miltais, nepatartina.

Šėrimo protokolas

2 lentelėje pateiktos gairės dėl pašaro, naudojamo jauniklių ir suaugusių gyvūnų gyvenimo stadijose, rūšies ir kiekio. Gyvūnai turėtų būti šeriami kartą per parą. Reikėtų pažymėti, kad vykstant gyvūnų metamorfozei, jie turėtų ir toliau gauti dalį sūriavandenių krevečių pašaro, iki >95 % gyvūnų baigs metamorfozę.

Gyvūnai neturėtų būti šeriami tą dieną, kurią baigiamas bandymas, kad pašaras nepaveiktų masės matavimų.

2 lentelė.

X. *laevis* jauniklių šėrimo režimas pratekamosios sistemos sąlygomis. Pažymėtina, kad gyvūnai iki metamorfozės, įskaitant tuos, kurių metamorfozė vėluoja dėl cheminės medžiagos veikimo, negali ėsti nesmulkintų granulių.

Laikas (savaitės po vidutinės (medianinės) metamorfozės dienos)	Susmulkintų granulių (mg kiekvienam varlės jaunikliui)	Nesmulkintų granulių (mg kiekvienam varlės jaunikliui)
Kai gyvūnai baigia metamorfozę	25	0
0–1 savaitės	25	28
2–3 savaitės	0	110
4–5 savaitės	0	165
6–9 savaitės	0	220

(*) savaitės pirmoji diena yra vidutinė (medianinė) kontrolinių gyvūnų metamorfozės diena.

5 priedėlis

GENETINĖS LYTIES NUSTATYMAS (SKIRSTYMAS PAGAL GENETINĘ LYTĮ)

Xenopus laevis rūšies gyvūnų skirstymo pagal genetinę lytį metodas pagrįstas Yoshimoto *et al*. (2008). Išsamiai aprašytas genotipo nustatymo procedūras, jei reikia, galima gauti iš šio leidinio. Alternatyvūs metodai (pvz., didelio našumo qPGR) gali būti naudojami, jei laikomi tinkamais.

X. laevis *pradmenys*

DM-W žymuo

Tiesioginis:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Atvirkštinis:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Teigiamas kontrolinis bandinys

Tiesioginis:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Atvirkštinis:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNR gryninimas

DNR iš raumens ar odos audinio išgryninamas naudojant, pvz., „Qiagen" rinkinį „DNeasy Blood and Tissue Kit" (cat # 69 506) ar panašų produktą pagal jo naudojimo instrukcijas. DNR galima eliuuoti iš nugarkaulio naudojant mažiau buferinio tirpalo, gaunant labiau koncentruotus pavyzdžius, jei manoma, kad tai reikalinga pagal PGR metodą. Atminkite, kad DNR yra gana stabili, todėl reikėtų stengtis vengti kryžminio užteršimo, dėl kurio patinai galėtų būti klaidingai palaikyti patelėmis, ar atvirkščiai.

Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

1 lentelėje pateiktas ėminių ėmimo protokolas naudojant preparatą JumpStart^{TM}*Taq* (gamintojas „Sigma").

1 lentelė.

Ėminių ėmimo protokolas naudojant „Sigma" JumpStart^{TM}*Taq*

Pagrindinis mišinys	1x (µl)	[galutinis]
VBN (*)	11	—
10X buferis	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (po 10mM)	0,4	200 µM
Žymens tiesiog. pradmuo (8 µM)	0,8	0,3 µM
Žymens atvirkšt. pradmuo (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrolinis tiesiog. pradmuo (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrolinis atvirkšt. pradmuo (8 µM)	0,8	0,3 µM

Pagrindinis mišinys	1x (µl)	[galutinis]
JumpStart™*Taq*	0,4	0,05 vnt./µl
DNR matrica	1,0	~200 pg/µl

(*) Vanduo be nukleazės
Pastaba. Rengdami pagrindinius mišinius, jų paruoškite daugiau, atsižvelgdami į bet kokį galimą nuostolį imant pipete (pvz., 25x turėtų būti naudojama tik 24 reakcijoms).

Reakcija:

Pagr. mišinys	19,0 µl
Matrica	1,0 µl
Iš viso	20,0 µl

Apdorojimo termocikleriu pobūdis:

1 etapas.	94 °C	1 min.
2 etapas.	94 °C	30 s
3 etapas.	60 °C	30 s
4 etapas.	72 °C	1 min.
5 etapas.	Pereiti prie 2 etapo.	35 ciklai
6 etapas.	72 °C	1 min.
7 etapas.	4 °C	laikymas

PGR produktai gali būti iškart apdorojami gelyje arba laikomi 4 °C temperatūroje.

Agarozės gelio elektroforezė (3 %) (pavyzdinis protokolas)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ledinė acto rūgštis	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Įpilti vandens iki 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 agarozė

3 dalys *NuSieve*™ GTG™ agarozės

1 dalis „Fisher“ mažos elektroendoosmozės (EEO) agarozės

Metodas

1. Paruošiamas 3 % gelis dedant 1,2 g agarozės mišinio į 43 ml 1X TAE. Gautas mišinys pamaišomas sukant indą, kad išsisklaidytų dideli gumulai.

2. Agarozės mišinys kaitinamas mikrobangų krosnelėje, kol visiškai ištirpsta (vengti užvirimo). Šiek tiek ataušinamas.

3. Įdedama 1,0 µL etidžio bromido (10 mg/ml). Mišinys pamaišomas sukant kolbą. Įsidėmėtina, kad etidžio bromidas yra mutagenas, todėl, kiek techniškai įmanoma, šiame etape reikėtų rinktis kitas medžiagas, siekiant sumažinti riziką darbuotojų sveikatai ([2]).

4. Gelis įpilamas į formą, į kurią įdėtos šukutės, ir visiškai atvėsinamas.

5. Gelis dedamas į aparatą ir padengiamas 1X TAE.

6. Pridedama 1 µl 6x įkrovos dažų kiekvienam 10 µl PGR produkto.

7. Ėminiai pipete perkeliami į plokštelės duobutes.

8. ~20 min. veikiama pastovios 160 voltų įtampos srove.

1 diagramoje pateiktas agarozės gelio atvaizdas, kuriame matyti juostinės žymės, būdingos vyriškos ir moteriškos lyties individams.



1 diagrama. Agarozės gelio atvaizdas, kuriame matyti juostinės žymės, būdingos vyriškos lyties (♂) individui (viena juosta ~203 bp: DMRT1), ir moteriškos lyties (♀) individui (dvi juostos ~259 bp: DM-W ir 203 bp: DMRT1).

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]) Pagal 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2004/37/EB dėl darbuotojų apsaugos nuo rizikos, susijusios su kancerogenų arba mutagenų poveikiu darbe (šeštoji atskira direktyva, kaip numatyta Direktyvos 89/391/EEB 16 straipsnio 1 dalyje) (OL L 158, 2004 4 30, p. 50), 4 straipsnio 1 dalį.

6 priedėlis

VITELOGENINO MATAVIMAS

Vitelogenino (VTG) matavimas atliekamas taikant imunofermentinės analizės (IFA, angl. ELISA) metodą, kuris iš pradžių buvo sukurtas juodųjų drūtagalvių rainių VTG matuoti (Parks *et al.*, 1999). Šiuo metu *X. laevis* antikūnų neįmanoma įsigyti iš komercinių tiekėjų. Tačiau kadangi turima daug informacijos apie šį baltymą ir yra galimybė naudotis ekonomiškai efektyvios komercinės antikūnų gamybos paslaugomis, galima pagrįstai tikėtis, kad laboratorijos gebės lengvai sukurti IFA metodą šiam matavimui atlikti (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) taip pat pateikė šio tyrimo, pritaikyto *X. tropicalis* VTG matavimui atlikti, apibūdinimą, kaip parodyta toliau. Pagal šį metodą naudojamas antikūnas, paruoštas *X. tropicalis* VTG, tačiau yra žinoma, kad jis tinka ir *X. laevis* VTG. Pažymėtina, kad galima taikyti ir nekonkurencinės IFA metodus ir kad juos taikant aptikimo ribos gali būti žemesnės negu pagal toliau aprašytą metodą.

Medžiagos ir reagentai

— Preadsorbuotas 1-ojo antikūno (Ab) serumas

— 1 dalis anti-*X. tropicalis* VTG 1-ojo Ab serumo sumaišoma su 2 dalimis kontrolinių patinų kraujo plazmos ir paliekama kambario temperatūroje apie 75 minutes, tada padedama ant ledo 30 min, centrifuguojama >20000 *g* 1 val. 4 °C temperatūroje, pašalinamas supernatantas, suskirstoma alikvotinėmis dalimis ir laikoma −20 °C temperatūroje.

— 2-asis antikūnas

— Ožkos anti-triušio IgG-HRP konjugatas (pvz., Bio-Rad 172-1019)

— VTG standartinis preparatas

— Išgrynintas *X. laevis* VTG, 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidinas) (pvz., KPL 50-76-00; arba Sigma T0440)

— Normalusis ožkos serumas (NGS)(pvz., *Chemicon*® S26 – 100 ml)

— 96 duobučių EIA polistireno mikrotitravimo plokštelės (pvz., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— 37 °C hibridizavimo krosnelė (arba greito nusistovėjimo oro inkubatorius) plokštelėms, vandens vonelė mėgintuvėliams

— Kita įprasta laboratorinė įranga, cheminės medžiagos ir reikmenys.

Receptūra

Padengimo buferinis tirpalas (50 mM karbonatinis buferinis tirpalas, pH 9.6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
vanduo	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfato, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
vanduo	810 ml

Plovimo buferinis tirpalas (PBST):

10X PBS	100 ml
vanduo	900 ml

Nustatoma 7,3 pH vertė įdedant 1 M HCl, tada įdedama 0,5 ml „Tween-20“

Tyrimo buferinis tirpalas:

Normalusis ožkos serumas (NGS)	3,75 ml
Plovimo buferinis tirpalas	146,25 ml

Ėminių ėmimas

Kraujas paimamas heparinizuotu mikrohermatokrito vamzdeliu ir padedamas ant ledo. Po centrifugavimo 3 minutes vamzdelis įpjaunamas, atveriamas ir plazma išleidžiama į 0,6 ml tūrio mikrocentrifugos mėgintuvėlius, į kuriuos dėta 0,13 vnt. liofilizuoto aprotinino (šie mėgintuvėliai paruošiami iš anksto, įdedant tinkamą kiekį aprotinino, užšaldant ir liofilizuojant greituoju vakuuminiu džiovintuvu, žemoje temperatūroje, kol išdžiūsta). Plazma iki analizės laikoma −80 °C temperatūroje.

Vienos plokštelės procedūra

Plokštelės padengimas

20 µl išgryninto VTG sumaišoma su 22 ml karbonatinio buferinio tirpalo (galutinis kiekis 3 µg/ml). Po 200 µl šio mišinio įpilama į kiekvieną naudojamos 96 duobučių mikrotitravimo plokštelės duobutę. Plokštelė uždengiama lipniąja plėvele ir paliekama inkubuotis 37 °C temperatūroje 2 valandas (arba 4 °C temperatūroje per naktį).

Plokštelės blokavimas

Blokavimo tirpalas ruošiamas įpilant 2 ml normaliojo ožkos serumo (NGS) į 38 ml karbonatinio buferinio tirpalo. Dengiamasis tirpalas pašalinamas ir plokštelė purtoma, kol išdžiūsta. Į kiekvieną duobutę įpilama 350 µl blokavimo tirpalo. Uždengiama lipniąja plėvele ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 2 valandas (arba 4 °C temperatūroje per naktį).

Standartinių preparatų paruošimas

5,8 µl išgryninto VTG standartinio preparato sumaišoma su 1,5 ml tyrimo buferinio tirpalo 12x75 mm borosilikatiniame vienkartiniame stiklo mėgintuvėlyje. Taip gaunamas 12 760 ng/ml mišinys. Tada atliekamas serijinis skiedimas įpilant 750 µl pirmiau atskiesto mišinio į 750 µl tyrimo buferinio tirpalo, gaunant galutines koncentracijas 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ir 50 ng/ml.

Ėminių paruošimas

Iš pradžių plazma praskiedžiama tyrimo buferiniu tirpalu santykiu 1:300 (pvz., sumaišant 1 µl plazmos su 299 µl tyrimo buferinio tirpalo). Jei tikimasi gauti didelį VTG kiekį, gali reikėti atskiesti papildomai arba daugiau. Reikia stengtis, kad B/B_o išliktų standartų intervale. Kai ėminiuose nėra reikšmingo VTG kiekio, pvz., kontrolinių patinų ir patelių (kurie visi yra nesubrendę), naudojamas skiedimas santykiu 1:30. Mažiau atskiestuose ėminiuose gali pasireikšti nepageidaujamas matricos efektas.

Papildomai rekomenduojama kiekvienoje plokštelėje ištirti teigiamą kontrolinį ėminį. Jis paimamas iš jungtinio plazmos ėminio, kuriame yra dideli susidariusio VTG kiekiai. Šis jungtinis ėminys iš pradžių atskiedžiamas NGS, padalijamas alikvotinėmis dalimis ir laikomas −80 °C temperatūroje. Kiekvienai plokštelei skirta alikvotinė dalis atitirpinama, papildomai praskiedžiama tyrimo buferiniu tirpalu ir apdorojama panašiai kaip bandinys.

Inkubavimas naudojant 1-ąjį antikūną

1-asis antikūnas (Ab) paruošiamas 1:2000 santykiu praskiedžiant preadsorbuotą 1-ojo Ab serumą tyrimo buferiniu tirpalu (pvz., jo 8 µl dedama į 16 ml tyrimo buferinio tirpalo). 300 µl 1-ojo Ab tirpalo sumaišoma su 300 µl ėminio / standartinio preparato stikliniame mėgintuvėlyje. B_o mėgintuvėlyje panašiai paruošiama 300 µl tyrimo buferinio tirpalo su 300 µl antikūno. Be to, reikėtų paruošti NSB (angl. *non-specific binding* – nespecifinio surišimo) mėgintuvėlį naudojant tik 600 µl tyrimo buferinio tirpalo, t. y. be antikūno (Ab). Mėgintuvėliai uždengiami laboratorine plėvele ir nestipriai suplakami. Inkubuojama 1 valandą 37 °C temperatūros vandens vonelėje.

Plokštelės plovimas

Prieš pat baigiant 1-ąjį Ab inkubavimą, plokštelė nuplaunama. Tai daroma iškratant jos turinį ir ją nusausinant sugeriamuoju popieriumi. Tada duobutės pripildomos 350 µl plovimo tirpalo, jis išpilamas ir plokštelė nusausinama sugeriamuoju popieriumi. Galima naudoti daugiakanalę automatinę pipetę arba plokštelių plautuvą. Plovimo etapas pakartojamas dar du kartus – iš viso trys plovimai.

Plokštelės įkrovimas

Po to, kai plokštelė nuplaunama, mėgintuvėliai išimami iš vandens vonelės ir nestipriai suplakami. Po 200 µl iš kiekvieno ėminio, standartinio preparato, B_o ir NSB mėgintuvėlio įpilama į kartotines plokštelės duobutes. Plokštelė uždengiama lipniąja plėvele ir paliekama inkubuotis 1 valandą 37 °C temperatūroje.

Inkubavimas naudojant 2-ąjį antikūną

Pirmesnio etapo inkubavimo pabaigoje plokštelė turėtų būti vėl tris kartus nuplauta, kaip aprašyta pirmiau. Atskiestas 2-asis antikūnas (Ab) paruošiamas sumaišant 2,5 µl 2-ojo Ab su 50 ml tyrimo buferinio tirpalo. 200 µl atskiesto 2-ojo Ab įpilama į kiekvieną duobutę, sandariai uždengiama, kaip aprašyta pirmiau, ir inkubuojama 1 valandą 37 °C temperatūroje.

Substrato dėjimas

Baigus inkubavimą su 2-uoju Ab, plokštelė tris kartus nuplaunama, kaip aprašyta pirmiau. Tada į kiekvieną duobutę įdedama 100 µl TMB substrato. Palaikoma 10 minučių, kad įvyktų reakcija (patartina saugoti nuo ryškios šviesos). Reakcija sustabdoma įpilant 100 µl 1 M fosforo rūgšties. Tai pakeičia spalvą iš mėlynos į ryškiai geltoną. Sugerties geba matuojama 450 nm ilgio bangomis, naudojant plokštelių skaitytuvą.

Apskaičiuojama B/Bo vertė

Vidutinė NSB vertė atimama iš visų išmatuotų verčių. Kiekvieno ėminio ir standartinio preparato B/B_o apskaičiuojama dalijant sugerties vertę (B) iš vidutinės B_o ėminio sugerties.

Gaunama standartinė kreivė ir nustatomi nežinomi kiekiai

Standartinė kreivė gaunama naudojantis kokia nors pagalbine kompiuterine grafikų kūrimo įranga (pvz., *Slidewrite*™ ar *Sigma Plot*®), kuria ekstrapoliuojamas kiekis iš ėminio B/B_o, remiantis standartinių preparatų B/B_o. Paprastai šis dydis pavaizduojamas logaritminėje skalėje, o kreivė yra sigmoidinio pavidalo. Tačiau kai naudojami siauro intervalo standartiniai preparatai, ji gali atrodyti kaip tiesė. Iš ėminių nustatyti kiekiai patikslinami pagal skiedimo koeficientą ir ataskaitoje užrašomi kaip plazmos VTG/ml (miligramais).

Minimalių aptikimo ribų (MDL) nustatymas

Dažnai, ypač tiriant normalius patinus, nėra aišku, kaip ataskaitoje pateikti mažų verčių rezultatus. Šiais atvejais turėtų būti naudojamos 95 % pasikliautinumo ribos siekiant nustatyti, ar atitinkamą vertę reikėtų nurodyti kaip nulį, ar kaip kokį nors kitą skaičių. Jei ėminio rezultatas yra nulinio standarto (B_o) pasikliautinajame intervale, pranešamas rezultatas turėtų būti 0. Minimalus aptikimo lygis yra mažiausia standartinė vertė, kuri nuolat skiriasi nuo nulinio standarto; t. y. abu pasikliautinieji intervalai nesutampa. Bet kokio ėminio rezultato, kuris atitinka ar viršija minimalaus aptikimo lygio pasikliautinumo ribą, apskaičiuotoji vertė pranešama ataskaitoje. Jei ėminio vertė yra tarp nulinio standarto ir minimalaus aptikimo lygio pasikliovimo intervalų, ataskaitoje reikėtų nurodyti, kad to ėminio vertė yra lygi pusei minimalaus aptikimo lygio.

LITERATŪRA

Olmstead A. W., Korte J. J., Woodis K. K., Bennett B. A., Ostazeski S., Degitz S. J. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks L. G., Cheek A. O., Denslow N. D., Heppell S. A., McLachlan J. A., LeBlanc G. A., Sullivan C. V. 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 priedėlis

STATISTINĖ ANALIZĖ

Per LAGDA bandymą gaunami trijų formų duomenys statistinei analizei: 1) kiekybiniai tolydieji duomenys, 2) laiko iki įvykio duomenys, vertinant vystymosi spartą (trukmė iki NF 62 stadijos), ir 3) rangų skalės duomenys, pateikiami kaip poveikio stiprumo balai ar vystymosi stadijos, nustatytos histopatologiniais vertinimais. 1 diagramoje parodyta rekomenduojama LAGDA statistinės analizės sprendimų schema. Be to, toliau pateikta nuorodų į leidinius, kuriais gali reikėti remtis atliekant LAGDA matavimų statistinę analizę. Kaip parodyta analizės sprendimų schemoje, gaištamumo, augimo (masės ir ilgio) ir kepenų somatinio indekso (LSI) matavimų rezultatai turėtų būti analizuojami „kitų vertinamųjų baigčių“ dalyje.

Tolydieji duomenys

Pirmiausia turėtų būti patikrintas tolydžiųjų vertinamųjų baigčių duomenų monotoniškumas, atliekant duomenų rangų transformaciją, pritaikant ANOVA modelį ir palyginant tiesinius ir kvadratinius kontrastus. Jei duomenys yra monotoniški, reikėtų taikyti žingsnio žemyn Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų kartotinių bandinių medianinėms vertėms ir paskesnių analizių atlikti nereikia. Duomenims, kurie yra normaliai pasiskirstę su vienalytėmis dispersijomis, tinkama alternatyva yra žingsnio žemyn Williams'o kriterijus. Jei duomenys yra nemonotoniški (kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis – nereikšmingas), jie turėtų būti analizuojami naudojant mišraus poveikio ANOVA modelį. Tada reikėtų įvertinti duomenų normalumą (geriausia taikant Shapiro-Wilk'o arba Anderson-Darling'o kriterijų) ir dispersijos vienalytiškumą (geriausia taikant Levene'o kriterijų). Abu kriterijai taikomi pagal mišraus poveikio ANOVA modelį gautoms liekanoms. Vietoj šių formalių normalumo ir dispersijos vienalytiškumo kriterijų taikymo galima remtis ekspertų nuomone, nors pirmenybė teiktina formaliems kriterijams. Jei duomenys yra normaliai pasiskirstę su vienalyte dispersija, tai atitinka mišraus poveikio ANOVA prielaidas ir reikšmingas dozės poveikis nustatomas pagal Dunnett'o kriterijų. Kai nustatomas nenormalumas ar dispersijos nevienalytiškumas, tai neatitinka Dunnett'o kriterijaus prielaidų ir siekiama atlikti normalizuojančią, dispersiją stabilizuojančią transformaciją. Jei tokios transformacijos nerandama, tuomet reikšmingas dozės poveikis nustatomas pagal Dunn'o kriterijų. Kai tik įmanoma, reikėtų taikyti vienpusį kriterijų, o ne dvipusį kriterijų, tačiau norint nustatyti, kas tinka konkrečiai vertinamajai baigčiai, reikia ekspertų vertinimo.

Gaištamumas

Turėtų būti analizuojami viso bandymo laikotarpio gaištamumo duomenys, kurie turėtų būti išreikšti kaip bet kuriame konkrečiame inde žuvusių gyvūnų dalis. Tų buožgalvių, kurie nebaigia metamorfozės per nustatytą laikotarpį, lervų poėminio kohortoje esančių buožgalvių, tų jauniklių varlių, kurios numarinamos mažinant gyvūnų skaičių, ir bet kokių gyvūnų, kurie žūsta dėl bandymo vykdytojo klaidos, duomenys turėtų būti laikomi atmetamais duomenimis ir neįtraukiami į vardiklį apskaičiuojant procentinius dydžius. Prieš bet kokias statistines analizes turėtų būti atlikta gaištamumo proporcijų kvadratinės šaknies arksinuso transformacija. Alternatyva yra naudoti žingsnio žemyn Cochran-Armitage'o kriterijų, galbūt su Rao-Scott'o pataisa, kai yra per didelė dispersija.

Masė ir ilgis (augimo duomenys)

Patinai ir patelės metamorfozės metu nėra lytiškai dimorfiški, todėl lervų poėminio augimo duomenys turėtų būti analizuojami neatsižvelgiant į lytį. Tačiau jauniklių augimo duomenys turėtų būti analizuojami atskirai pagal genetinę lytį. Gali reikėti atlikti šių vertinamųjų baigčių logaritiminę transformaciją, nes dydžio duomenims neretai yra būdingas lognormalumas.

Kepenų somatinis indeksas (LSI)

Kepenų masės duomenys turėtų būti normalizuojami kaip viso kūno masės proporcijos (t. y. LSI) ir analizuojami atskirai pagal genetinę lytį.

Trukmė iki NF 62 vystymosi stadijos

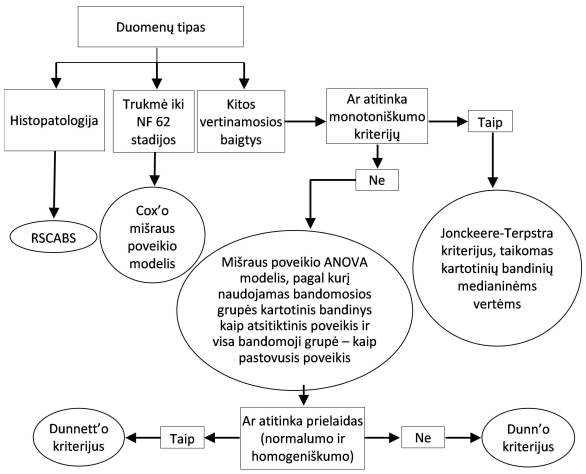
Laiko iki metamorfozės duomenys turėtų būti traktuojami kaip laiko iki įvykio duomenys, ir bet kokių nugaišusių gyvūnų ar individų, kurie nepasiekė NF 62 stadijos per 70 dienų, duomenys traktuojami kaip „iš dešinės“ (dešinėje grafiko pusėje) atmetami duomenys (t. y. tikroji vertė yra didesnė nei 70 dienų, tačiau tyrimas baigiamas prieš tai, kai gyvūnai pasiekia NF 62 stadiją per 70 dienų). Bandymo užbaigimo data turėtų būti nustatyta pagal medianinę trukmę iki NF 62 stadijos metamorfozės užbaigimo skiedimo vandens kontroliniuose bandiniuose. Medianinė trukmė iki metamorfozės užbaigimo galėtų būti nustatoma pagal Kaplan-Meier'io produkto-ribos įvertinius (angl. *product-limit estimators*). Ši vertinamoji baigtis turėtų būti analizuojama naudojant mišraus poveikio Cox'o proporcinių pavojų modelį, pagal kurį atsižvelgiama į tyrimo kartotinių bandinių struktūrą.

Histopatologiniai duomenys (poveikio stiprumo balai ir vystymosi stadijos)

Histopatologiniai duomenys pateikiami poveikio stiprumo balų arba vystymosi stadijų forma. RSCABS kriterijus (angl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices* – Rao-Scott'o patikslintas Cochran-Armitage'o žingsnio žemyn trendo kriterijus) taikomas kiekvienam poveikio lygiui vertinant histopatologinį atsaką (Green *et al.*, 2014). Pagal Rao-Scott'o pataisą taikant šį kriterijų įtraukiamas bandymo planas su kartotinių bandinių indais. Pagal „pjūvių" (angl. *by Slices*) procedūrą įtraukiama biologinė prielaida, kad poveikis didėja didinant dozes arba koncentracijas, o kartu toliau naudojami bandomųjų individų vertinimai balais ir atskleidžiamas bet kokio nustatyto poveikio dydis. Pagal RSCABS procedūrą ne tik nustatoma, kurios bandomosios grupės statistiškai skiriasi nuo kontrolinių grupių (t. y., jų patologijos didesnės negu kontrolinių gyvūnų), bet ir nustatoma, kuriam poveikio dydžio balui esant atsiranda šis skirtumas, taip suteikiant labai reikalingą kontekstą analizei. Lytinių liaukų ir reprodukcinių latakų vystymosi stadijos nustatymo atveju reikėtų papildomai apdoroti duomenis, nes pagal RSCABS kriterijų daroma prielaida, kad poveikis didėja kartu su doze. Stebimas poveikis galėtų būti vystymosi vėlavimas arba paspartėjimas. Todėl vystymosi stadijų duomenys turėtų būti analizuojami tokie, kokie pranešti, kad būtų galima nustatyti vystymosi paspartėjimą, o tada prieš antrą analizę duomenys rankiniu būdu pertvarkomi taip, kad būtų galima nustatyti vystymosi vėlavimą.

1 diagrama.

LAGDA duomenų statistinės analizės sprendimų schema



Literatūra

Green J. W., Springer T. A., Saulnier A. N., Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1 108-1 116.

8 priedėlis

SKOLIOZĖS ATVEJŲ DAŽNIO STEBĖSENOS IR MAŽINIMO ASPEKTAI

Idiopatinė skoliozė, paprastai pasireiškianti kaip *Xenopus laevis* buožgalvių sulenkta uodega, gali sunkinti bandomųjų populiacijų morfologinius ir elgesio stebėjimus. Reikėtų stengtis, kad skoliozės atvejų būtų kuo mažiau arba visai nebūtų tiek pradinės kultūros auginimo, tiek bandymo sąlygomis. Rekomenduojama, kad per galutinį bandymą vidutinės ar sunkios skoliozės dažnis būtų mažesnis nei 10 %, siekiant padidinti patikimumą, kad atliekant šį bandymą galima nustatyti su bandomosios medžiagos doze susijusį poveikį kitais atžvilgiais sveikų varliagyvių lervų vystymuisi.

Atliekant kasdienius stebėjimus per galutinį bandymą turėtų būti užrašomas ir skoliozės dažnis (individų skaičius), ir jos sunkumas, kai jos atvejų yra. Reikėtų aprašyti anomalijos pobūdį – jos vietą (pvz., iki išeinamosios angos ar po jos) ir išlinkio kryptį (pvz., šoninis ar nugaros-pilvo ašies išlinkimas). Jos sunkumą galima žymėti taip:

nežymi (N) – išlinkio nėra;

maža (1) *nedidelis,*– šoninis išlinkis po išeinamosios angos; matomas tik gyvūnui esant ramybės būsenos;

vidutinė (2) *šoninis*– išlinkis po išeinamosios angos; matomas visada, bet judėti netrukdo;

sunki (3) *šoninis*– išlinkis prieš išeinamąją angą; ARBA bet koks išlinkis, kuris trukdo judėti; ARBA bet koks nugaros-pilvo ašies išlinkis.

JAV aplinkos apsaugos agentūros FIFRA mokslinė patariamoji grupė (FIFRA SAP 2013) peržiūrėjo skoliozės suvestinius duomenis iš penkiolikos varliagyvių metamorfozės tyrimų naudojant *X. laevis* (nuo NF 51 iki 60 ir vėlesnių stadijų) ir pateikė bendrų rekomendacijų, kaip mažinti šios anomalijos paplitimą bandomųjų gyvūnų populiacijose. Šios rekomendacijos yra svarbios LAGDA, nors šis bandymas apima ilgesnį vystymosi laikotarpį.

Ankstesnio neršto sėkmingumo duomenys

Apskritai veislinėms poroms turėtų būti naudojami kokybiški, sveiki suaugę gyvūnai; pašalinant veislines poras, kurių palikuonims pasireiškia skoliozė, laikui bėgant galima iki minimumo sumažinti jos atvejų dažnį. Konkrečiai gali būti naudinga stengtis kuo mažiau naudoti sugautų laukinių veislinių gyvūnų. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis per LAGDA bandymą pradedamas naudojant NF 8–10 stadijų embrionus, ir bandymo pradžioje praktiškai neįmanoma nustatyti, ar kuriems nors individams pasireikš skoliozė. Taigi, stebint bandymui naudojamų gyvūnų skoliozės dažnį, kartu reikėtų turėti užrašytus ankstesnės vados rodiklių (įskaitant skoliozės paplitimą tarp bet kokių lervų, kurioms leista vystytis) duomenis. Gali būti naudinga toliau stebėti kiekvienos vados dalį, nenaudojamą konkrečiam tyrimui, ir ataskaitoje pranešti apie tuos stebėjimus (FIFRA SAP 2013).

Vandens kokybė

Svarbu užtikrinti tinkamą tiek pradinei laboratorinių gyvūnų kultūrai, tiek per bandymą naudojamo vandens kokybę. Kartu su vandens kokybės kriterijais, reguliariai vertinamais per toksiškumo vandens organizmams bandymus, gali būti naudinga stebėti, ar netrūksta kokių nors maistinių medžiagų (pvz., vitamino C, kalcio, fosforo), ir tuos trūkumus ištaisyti, taip pat tikrinti, ar nėra per didelių seleno ir vario kiekių – pranešta, kad jie sukelia įvairių laipsnių skoliozę laboratorijoje auginamoms *Rana* sp. ir *Xenopus* sp. varlėms (Marshall *et al.* (1980); Leibovitz *et al.* (1992); Martinez *et al.* (1992); kaip pranešta FIFRA SAP 2013). Naudojant tinkamą šėrimo režimą (žr. 4 priedėlį) ir reguliariai valant rezervuarus pagerėja bendra vandens kokybė ir bandomųjų gyvūnų sveikatos būklė.

Šėrimo racionas

4 priedėlyje pateikta konkrečių rekomendacijų dėl šėrimo raciono, kuris yra sėkmingai naudojamas per LAGDA bandymą. Rekomenduojama patikrinti pašaro šaltinius, ar juose nėra biologinių toksinų, herbicidų ir kitų pesticidų, kurie, kaip žinoma, sukelia *X. laevis* ar kitų vandens gyvūnų skoliozę (Schlenk ir Jenkins, 2013). Pavyzdžiui, tam tikrų cholinesterazės inhibitorių poveikis siejamas su žuvų (Schultz *et al.,* 1985) ir varlių skolioze (Bacchetta *et al.,* 2008).

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.“