II

(Acte fără caracter legislativ)

REGULAMENTE

REGULAMENTUL (UE) 2019/1390 AL COMISIEI

din 31 iulie 2019

de modificare, în scopul adaptării la progresul tehnic, a anexei la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei [1], în special articolul 13 alineatul (2),

întrucât:

(1) Regulamentul (CE) nr. 440/2008 al Comisiei [2] conține metodele de testare pentru determinarea proprietăților fizico-chimice, a toxicității și a ecotoxicității substanțelor chimice, care trebuie aplicate în sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006.

(2) Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE), dezvoltă orientări referitoare la testare armonizate și convenite la nivel internațional pentru testarea substanțelor chimice în scopuri de reglementare. OCDE publică periodic orientări noi și revizuite referitoare la testare, ținând seama de progresul științific în acest domeniu.

(3) Pentru a ține seama de progresul tehnic și, ori de câte ori este posibil, în vederea reducerii numărului de animale utilizate în scopuri experimentale în conformitate cu articolul 13 alineatul (2) din Regulamentul (CE) nr. 1907/2006, în urma adoptării orientărilor relevante ale OCDE referitoare la testare, ar trebui stabilite două noi metode de testare pentru evaluarea ecotoxicității și nouă noi metode de testare pentru determinarea toxicității pentru sănătatea umană, iar șapte metode de testare ar trebui să fie actualizate. Unsprezece dintre aceste metode de testare se referă la teste *in vitro* pentru iritația/coroziunea cutanată și oculară, sensibilizarea pielii, genotoxicitate și efecte endocrine. Părțile interesate au fost consultate cu privire la propunerea de modificare.

[1] JO L 396, 30.12.2006, p. 1.

[2] Regulamentul (CE) nr. 440/2008 al Comisiei din 30 mai 2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) (JO L 142, 31.5.2008, p. 1).

(4) Prin urmare, Regulamentul (CE) nr. 440/2008 ar trebui modificat în consecință.

(5) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul comitetului instituit în temeiul articolului 133 din Regulamentul (CE) nr. 1907/2006,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 se modifică în conformitate cu anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 31 iulie 2019.

Pentru Comisie,
Președintele
Jean-Claude JUNCKER

ANEXĂ

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 se modifică după cum urmează:

(1) În partea B, capitolul B.4 se înlocuiește cu următorul text:

„B.4 **IRITAȚIE/COROZIUNE CUTANATĂ ACUTĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 404 (2015). Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic pentru a se asigura că acestea reflectă cele mai bune cunoștințe științifice disponibile. La revizuirea orientării 404 a OCDE privind testarea, s-a acordat o atenție deosebită posibilelor îmbunătățiri în ceea ce privește problemele de bunăstare animală și evaluării tuturor informațiilor existente privind substanța chimică de testat pentru a se evita testarea inutilă pe animale de laborator. Versiunea actualizată a Orientării nr. 404 a OCDE privind testarea (adoptată inițial în 1981, revizuită în 1992, 2002 și 2015) include o trimitere la documentul de orientare privind strategiile integrate pentru testare și evaluare (Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru iritație/coroziune cutanată (1), propunând o abordare modulară pentru testarea iritației și a coroziunii cutanate. IATA descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și (i) oferă îndrumări cu privire la modul de integrare și utilizare a datelor existente provenite din teste și care nu provin din teste pentru evaluarea potențialului de iritație cutanată și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (1). În plus, dacă este necesar, se recomandă în respectiva orientare să se opteze pentru aplicarea succesivă, și nu simultană, a celor trei plasturi la animalul de experiență în cadrul testului inițial *in vivo*.

2. Definiții pentru iritația și coroziunea cutanată sunt prezentate în apendicele la prezenta metodă de testare.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

3. În interesul acurateței științifice și al bunăstării animale, testele *in vivo* nu ar trebui să fie efectuate până când nu au fost evaluate toate datele disponibile relevante pentru o posibilă corosivitate/iritație cutanată a substanței chimice de testat în cadrul unei analize a valorii probante a datelor (WoE), astfel cum este prezentată în Documentul de orientare privind abordările integrate de testare și evaluare în ceea ce privește coroziunea și iritația cutanată, și anume, în cele trei părți ale prezentei orientări și în modulele aferente (1). Pe scurt, în partea 1, sunt abordate datele existente pe parcursul a șapte module care acoperă date umane, date *in vivo*, date *in vitro*, date privind proprietățile fizico-chimice (de exemplu, pH-ul, în special o aciditate sau alcalinitate puternică) și metode care nu implică testarea. În partea 2, este efectuată analiza bazată pe forța probantă a datelor (FPD). Dacă această analiză FPD este încă neconcludentă, partea 3 ar trebui să fie desfășurată cu efectuarea de teste suplimentare, începând cu metodele *in vitro*, iar testarea *in vivo* este utilizată ca soluție de ultimă instanță. Această analiză ar trebui așadar să reducă necesitatea efectuării unor teste *in vivo* de coroziune/iritație cutanată asupra substanțelor chimice de testat pentru care există deja dovezi suficiente din alte studii privind aceste două puncte finale.

PRINCIPIUL TESTULUI IN VIVO

4. Substanța chimică de testat se aplică într-o singură doză pe pielea unui animal de experiență; zonele netratate ale pielii animalului de experiență se utilizează ca martor. La intervale specificate se examinează și se punctează gradul de iritare/coroziune, care este descris în detaliu pentru a permite o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru evaluarea reversibilității sau ireversibilității efectelor observate.

5. Animalele care manifestă semne persistente de suferință și/sau dureri profunde în orice etapă a testului sunt eutanasiate, iar substanța chimică de testat se evaluează în consecință. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde fac obiectul unui document de orientare separat (2).

PREGĂTIREA PENTRU TESTUL IN VIVO

Selecția speciilor de animale

6. Se preferă utilizarea de exemplare adulte tinere și sănătoase de iepure albinos ca animale de laborator. Utilizarea altor specii ar trebui să fie justificată.

Pregătirea animalelor

7. Cu aproximativ 24 de ore înainte de test, se rade blana din regiunea dorsală de pe corpul animalelor. Se evită cu atenție jupuirea pielii și se utilizează exclusiv animalele cu pielea sănătoasă, intactă.

8. La unele sușe de iepuri, blana este mai deasă în unele zone, în anumite perioade ale anului. Astfel de zone în care crește o blană mai deasă nu ar trebui să fie utilizate ca zone de testare.

Condiții de adăpostire și hrănire

9. Animalele ar trebui să fie adăpostite individual. Temperatura incintei în care se află animalele de experiență ar trebui să fie de 20 °C (± 3 °C) pentru iepuri. Cu toate că umiditatea relativă ar trebui să fie de cel puțin 30 % și, de preferință, să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este de 5060 %. Spațiul ar trebui să fie iluminat artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă

PROCEDURA DE TESTARE

Aplicarea substanței chimice de testat

10. Substanța chimică de testat ar trebui să fie aplicată uniform pe o suprafață mică (aproximativ 6 cm^2) de piele și este menținută în contact cu pielea cu ajutorul unui bandaj de tifon și al unui plasture neiritant. În cazurile în care nu este posibilă aplicarea directă (de exemplu, lichide sau anumite paste), substanța chimică de testat ar trebui să fie aplicată mai întâi pe un bandaj de tifon, care este apoi aplicat pe piele. Se asigură un contact ușor între bandaj și piele cu ajutorul unui pansament semi-ocluziv pentru întreaga durată a perioadei de expunere. Dacă substanța chimică de testat este aplicată pe bandaj, aceasta se fixează pe piele astfel încât să existe un contact adecvat și o distribuție uniformă a substanței chimice de testat pe piele. Ar trebui să se împiedice accesul animalului la bandaj și ingerarea sau inhalarea substanței chimice de testat.

11. Substanțele chimice de testat lichide sunt utilizate, în general, în stare nediluată. La testarea substanțelor solide (care pot fi pulverizate, dacă se consideră necesar), substanța chimică de testat ar trebui să fie umezită cu cea mai redusă cantitate de apă (sau, dacă este necesar, cu un alt vehicul adecvat) suficient pentru a asigura un contact bun cu pielea. Atunci când se utilizează alte vehicule decât apa, o posibilă influență a vehiculului asupra iritației pielii provocate de substanța chimică de testat ar trebui să fie minimă, dacă există.

12. La sfârșitul perioadei de expunere, care este în mod normal de patru ore, substanța chimică de testat reziduală ar trebui să fie eliminată, atunci când este posibil, folosind apă sau un solvent adecvat fără a modifica răspunsul existent sau integritatea epidermei.

Nivelul dozei

13. Pe zona de testare se aplică o doză de 0,5 ml de lichid sau de 0,5 g de substanță solidă sau pastă.

Testul inițial (test *in vivo* de iritație/coroziune cutanată utilizând un animal)

14. Atunci când o substanță chimică de testat este considerată a fi corozivă, iritantă sau neclasificată pe baza unor analize ale forței probante a datelor sau a unor teste *in vitro* anterioare, în mod normal nu este necesară efectuarea de teste *in vivo* suplimentare. Însă, în cazurile în care se justifică obținerea unor date suplimentare, testul *in vivo* este efectuat inițial utilizând un animal și aplicând abordarea de mai jos. Se aplică animalului, secvențial, maximum trei plasturi pentru testare. Primul plasture se îndepărtează după trei minute. Dacă nu se observă o reacție cutanată gravă, se aplică un al doilea plasture într-o altă zonă, care este îndepărtat după o oră. Dacă în această etapă, observațiile arată că poate fi permisă prelungirea expunerii la patru ore, fără a cauza suferințe, se aplică un al treilea plasture, care se îndepărtează după patru ore și se punctează reacția.

15. Dacă se observă un efect coroziv după oricare dintre cele trei expuneri secvențiale, testul se încheie imediat. Dacă nu se observă un efect coroziv după îndepărtarea ultimului plasture, animalul se observă timp de 14 zile, cu excepția cazului în care coroziunea se manifestă mai devreme.

16. În cazurile în care se estimează că substanța chimică de testat nu este corozivă, dar ar putea fi iritantă, se aplică un singur plasture unui animal, timp de patru ore.

Test de confirmare (test de iritație cutanată *in vivo* pe animale suplimentare)

17. Dacă la testul inițial nu se observă efecte corozive, reacția de iritație sau negativă se confirmă prin testarea a maximum alte două animale, fiecare cu câte un plasture, cu o perioadă de expunere de patru ore. Dacă se observă un efect iritant la testul inițial, testul de confirmare poate fi efectuat secvențial sau prin expunerea simultană a celor două animale suplimentare. În cazul excepțional în care nu se efectuează testul inițial, două sau trei animale pot fi tratate cu câte un singur plasture, care se îndepărtează după patru ore. Dacă se utilizează două animale și ambele manifestă aceeași reacție, nu mai sunt necesare teste suplimentare. În caz contrar, se testează și al treilea animal. Este posibil să fie necesară evaluarea reacțiilor echivoce utilizând alte animale.

Perioada de observație

18. Durata perioadei de observare ar trebui să fie suficientă pentru evaluarea completă a reversibilității efectelor observate. Cu toate acestea, experimentul ar trebui să fie încheiat dacă animalul prezintă semne persistente de durere sau suferință profundă. Pentru a determina reversibilitatea efectelor, animalele ar trebui să fie observate timp de până la 14 zile de la îndepărtarea plasturilor. Dacă reversibilitatea intervine înainte de 14 zile, experimentul ar trebui încheiat în acel moment.

Observații clinice și punctarea reacțiilor cutanate

19. Ar trebui să se examineze semnele de eritem și edem la toate animalele și să se puncteze reacțiile la 60 de minute, iar apoi la 24, 48 și 72 de ore de la îndepărtarea plasturilor. Pentru testul inițial pe un singur animal, zona de testare se examinează, de asemenea, imediat după îndepărtarea plasturelui. Reacțiile cutanate se punctează și se înregistrează conform punctajelor din tabelul de mai jos. Dacă la 72 de ore se observă leziuni cutanate care nu pot fi identificate ca iritații sau coroziuni, este posibil să fie necesară observarea timp de 14 zile, pentru a determina reversibilitatea efectelor. În plus față de examinarea iritației, se descriu și se înregistrează toate efectele toxice locale, precum uscarea pielii, și orice efecte sistemice adverse (de exemplu, efecte manifestate prin semne clinice de toxicitate sau efecte asupra greutății corporale). Pentru clarificarea reacțiilor echivoce se efectuează un examen histopatologic.

20. Punctarea reacțiilor cutanate este neapărat subiectivă. Pentru a promova armonizarea punctării reacțiilor cutanate și pentru a veni în sprijinul laboratoarelor de testare și a persoanelor implicate în efectuarea și interpretarea observațiilor, personalul care efectuează observațiile trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la sistemul de punctaj utilizat (a se vedea tabelul de mai jos). Ar putea fi util un ghid ilustrat pentru punctarea iritațiilor dermice și a altor leziuni (3).

DATE ȘI RAPORTARE

21. Rezultatele studiului ar trebui să fie sintetizate în formă tabelară în raportul final al testului și să includă toate punctele menționate la punctul 24.

Evaluarea rezultatelor

22. Punctajele privind iritația cutanată ar trebui să fie evaluate în legătură cu natura și severitatea leziunilor, precum și cu reversibilitatea sau ireversibilitatea lor. Punctajele individuale nu reprezintă un standard absolut pentru proprietățile iritante ale unui material de testat, întrucât se evaluează și alte efecte ale materialului. În schimb, punctajele individuale ar trebui să fie considerate drept valori de referință, care trebuie să fie evaluate în legătură cu toate celelalte observații ale studiului.

23. Reversibilitatea leziunilor cutanate ar trebui să fie luată în considerare la evaluarea reacțiilor iritante. Atunci când reacții precum alopecia (zonă limitată), hiperkeratoza, hiperplazia și exfolierea persistă la sfârșitul perioadei de observare de 14 zile, substanța chimică de testat ar trebui să fie considerată drept iritantă.

Raportul testului

24. Raportul testului trebuie să includă următoarele informații:

Justificarea pentru testarea in vivo:

— analiza valorii probante a datelor prealabile testului, inclusiv a rezultatelor strategiei de testare secvențiale;

— descrierea datelor relevante disponibile din testele anterioare;

— date obținute în fiecare etapă a strategiei de testare;

— descrierea testelor *in vitro* efectuate, inclusiv detalii privind procedurile, rezultatele obținute cu substanțele de testat/de referință;

— analiza valorii probante a datelor pentru efectuarea studiului *in vivo*.

Substanța chimică de testat:

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanță multicomponentă, amestec și substanțe cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice (UVCB): în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Vehicul:

— identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;

— justificarea alegerii vehiculului.

Animal(e) de testare:

— specie/șușă utilizată, justificarea utilizării altui (altor) animal(e) decât iepurele albinos;

— numărul de animale din fiecare sex;

— greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului;

— vârsta la începutul studiului;

— sursa animalului (animalelor), condiții de adăpostire, regimul alimentar etc.

Condiții de testare:

— tehnica de pregătire a zonei de aplicare a plasturelui;

— detalii despre materialele folosite pentru plasture și despre tehnica aplicării plasturelui;

— detalii privind prepararea, aplicarea și îndepărtarea substanței chimice de testat.

Rezultate:

— tabel cu punctajele acordate pentru reacția de iritație/coroziune, pentru fiecare animal, în fiecare moment măsurat;

— descrierea tuturor leziunilor observate;

— descrierea narativă a naturii și gradului de iritație/coroziune observat și concluziile examenului histopatologic;

— descrierea altor efecte locale adverse (de exemplu, uscarea pielii) și a altor efecte sistemice apărute în plus față de iritația sau coroziunea cutanată.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/ Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, astfel cum a fost aprobat în cadrul celei de a 28-a reuniuni comune a Comitetului privind substanțele chimice (Chemicals Committee) și a Grupului de lucru privind substanțele chimice (Working Party on Chemicals), noiembrie 1998.

(3) OCDE (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, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Tabel

Punctarea Reacțiilor Cutanate

Formarea de eriteme și escare

Fără eritem	0
Eritem foarte redus (greu perceptibil)	1
Eritem bine definit	2
Eritem moderat spre sever	3
Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului	4

Maximum posibil: 4

Formarea de edeme

Fără edem	0
Edem foarte redus (greu perceptibil)	1
Edem redus (contururile zonei sunt bine definite prin proeminență clară)	2
Edem moderat (proeminență de aproximativ 1 mm)	3
Edem sever (proeminență mai mare de 1 mm și extindere dincolo de zona de expunere)	4

Maximum posibil: 4

Pentru clarificarea reacțiilor echivoce se poate proceda la un examen histopatologic.

Apendice

DEFINIȚII

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Iritație cutanată înseamnă producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la 4 ore.

Coroziune cutanată înseamnă producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile corozive sunt tipic exemplificate de ulcere, sângerare, cruste de sânge și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, prin decolorare datorată depigmentării pielii, zone complete de alopecie, precum și cicatrici. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat(ă) utilizând această metodă de testare

(2) În partea B, capitolul B.17 se înlocuiește cu următorul text:

„B.17 **TESTE *IN VITRO* DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE FOLOSIND GENELE HPRT ȘI XPRT**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 476 privind testarea (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic în contextul progreselor științifice, al necesităților fluctuante de reglementare și al bunăstării animalelor. Actuala versiune revizuită a MT B.17 reflectă aproape treizeci de ani de experiență în ceea ce privește acest test și, de asemenea, constituie rezultatul dezvoltării unei noi metode separate dedicate testelor *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere folosind gena timidin-kinază. MT B.17 face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (1).

2. Scopul testului *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere este detectarea mutațiilor genice induse de substanțe chimice. Liniile celulare utilizate în aceste teste măsoară mutațiile directe la genele reporter, în special la gena endogenă hipoxantin-guanină fosforibozil transferază (Hprt la celulele de rozătoare, HPRT la celulele umane; denumite colectiv gena Hprt și testul HPRT în cadrul prezentei metode de testare), precum și la transgena de xantin-guanină fosforibozil transferază (gpt) (denumit testul XPRT). Testele de mutație HPRT și XPRT permit detectarea diferitelor spectre de fenomene genetice. În plus față de mutațiile detectate prin testul HPRT (de exemplu, substituții ale perechilor de bază, decalări ale cadrului de citire, mici deleții și inserții), localizarea autozomică a transgenei gpt ar putea permite detectarea mutațiilor produse ca urmare a unor deleții semnificative și, eventual, a recombinării mitotice care nu este detectată prin testul HPRT, deoarece gena Hprt se află pe cromozomul X (2) (3) (4) (5) (6) (7). În prezent, XPRT este mai puțin utilizat decât testul HPRT în scopuri de reglementare.

3. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

4. Testele realizate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*.

5. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar conduce la rezultate pozitive artificiale (și anume, o posibilă interacțiune cu sistemul de testare), care nu sunt cauzate de interacțiunea directă dintre substanțele chimice de testat și materialul genetic al celulei; astfel de condiții includ modificări ale pH-ului sau ale osmolalității (8) (9) (10), interacțiunea cu componentele de mediu (11) (12) sau niveluri excesive ale citotoxicității (13). Citotoxicitatea care depășește nivelurile recomandate de citotoxicitate de vârf, astfel cum sunt definite la punctul 19, este considerată excesivă pentru testul HPRT.

6. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință de reglementare pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Celulele mutante deficiente în activitatea enzimei Hprt în cadrul testului HPRT sau în activitatea enzimei xprt în cadrul testului XPRT sunt rezistente la efectele citostatice ale substanței 6-tioguanină purină analogă (TG). Celulele care conțin enzima Hprt (în cadrul testului HPRT) sau gpt (în cadrul testului XPRT) sunt sensibile la TG, ceea ce produce inhibarea metabolismului celular și oprirea diviziunii celulare. Astfel, celulele mutante pot prolifera în prezența TG, în timp ce celulele normale, care conțin enzima Hprt (în cadrul testului HPRT) sau gpt (în cadrul testului XPRT), nu pot prolifera.

8. Celulele în suspensie sau culturile monostrat sunt expuse la substanța chimică de testat atât în prezența, cât și în absența unei surse exogene de activare metabolică (a se vedea punctul 14), pentru o perioadă adecvată de timp (3-6 ore) și apoi subcultivate pentru determinarea citotoxicității și pentru a permite expresia fenotipică înaintea selecției mutantului (14) (15) (16) (17). Citotoxicitatea este determinată prin supraviețuire relativă (RS), și anume, eficacitatea clonării măsurată imediat după tratament și ajustată pentru orice pierdere de celule în timpul tratamentului comparativ cu martorul negativ (punctul 18 și apendicele 2). Culturile tratate sunt menținute în mediul de cultură un timp suficient, caracteristic pentru fiecare tip de celulă, pentru a permite o expresie fenotipică aproape optimă a mutațiilor induse (de regulă, minim 7-9 zile). În urma manifestării fenotipice, frecvența mutanților se determină prin însămânțarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu ce conține agentul selectiv pentru a detecta coloniile mutante și într-un mediu fără agent selectiv pentru a determina eficacitatea clonării (viabilitatea). După un timp corespunzător de incubare, se numără coloniile. Frecvența mutanților se calculează pe baza numărului de colonii de mutanți, corectat prin eficacitatea clonării la momentul selecției mutantului.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Celule

9. Tipurile de celule utilizate pentru testele HPRT și XPRT ar trebui să aibă o sensibilitate demonstrată la mutageni chimici, o eficacitate de clonare mare, un cariotip stabil și o frecvență stabilă a celulelor mutante spontane. Cele mai frecvent utilizate celule pentru testul HPRT includ liniile CHO, CHL și V79 de celule de hamster chinezesc, celule de limfom de șoarece L5178Y și celule limfoblastoide umane TK6 (18) (19). Celulele AS52 derivate din CHO, care conțin transgena gpt (dar nu și gena Hprt) sunt utilizate pentru testul XPRT (20) (21); testul HPRT nu poate fi efectuat pe celule AS52, deoarece gena hprt a fost eliminată. Utilizarea altor linii celulare ar trebui să fie justificată și validată.

10. Liniile celulare ar trebui să fie controlate în mod regulat pentru verificarea stabilității numărului modal de cromozomi și a absenței contaminării cu micoplasmă (22) (23), iar, în cazul în care se constată contaminarea sau în cazul în care numărul modal de cromozomi s-a modificat, celulele nu se mai utilizează. Ar trebui să se stabilească durata normală a ciclului celular utilizată în laboratorul de testare, iar aceasta ar trebui să fie conformă cu caracteristicile celulare publicate. Frecvența celulei mutante spontane în stocul de celule mamă ar trebui să fie, de asemenea, verificată, iar stocul nu ar trebui utilizat în cazul în care frecvența mutanților nu este acceptabilă.

11. Înainte de utilizare în cadrul acestui test, este posibil să fie necesară curățarea culturilor de celule mutante preexistente, de exemplu, prin cultivare în mediul HAT pentru testul HPRT și în MPA pentru testul XPRT (5) (24) (a se vedea apendicele 1). Celulele curățate pot fi păstrate în mediu criogenic și apoi decongelate pentru a fi utilizate ca stocuri de lucru. Stocul de lucru proaspăt decongelat poate fi utilizat pentru testare după încheierea perioadelor normale de dublare. Atunci când este efectuat testul XPRT, cultura de rutină a celulelor AS52 ar trebui să utilizeze condiții care asigură menținerea transgenei gpt (20).

Condiții pentru medii și cultură

12. Ar trebui să fie asigurate condiții adecvate pentru mediul de cultură și incubare (vase de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO_2 și temperatura de incubare de 37 °C) pentru menținerea culturilor. Culturile de celule ar trebui să fie menținute întotdeauna în condiții care să asigure creșterea acestora în faza de dezvoltare logaritmică. Este deosebit de important să se aleagă condiții de medii și de cultură astfel încât să se asigure creșterea optimă a celulelor în perioada de manifestare și eficacitatea optimă a clonării atât pentru celulele mutante, cât și pentru cele nemutante.

Pregătirea culturilor

13. Liniile celulare se propagă din culturi stoc, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie ori în culturile monostrat să continue să crească exponențial în perioadele de tratament și manifestare (de exemplu, ar trebui să se evite confluența celulelor care cresc în monostrat).

Activare metabolică

14. Recurgerea la un sistem endogen de activare metabolică este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate endogenă metabolică inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent și care este recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, constă într-o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) sau un amestec de fenobarbital și β-naftoflavonă (29) (30) (31) (32). Utilizarea celui din urmă amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (33) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca și Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (29) (31). Fracția S9 este utilizată în general cu o concentrație cuprinsă între 1-2 % (v/v), dar poate fi majorată la 10 % (v/v) în mediul de testare final. Alegerea tipului și concentrației sistemului exogen de activare metabolică sau inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice testate (34) (35) (36).

Prepararea substanței chimice de testat

15. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui să fie preparate în solvenți adecvați și diluate, dacă este cazul, înainte de tratamentul aplicat celulelor (a se vedea punctul 16). Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Gazele sau substanțele chimice de testat volatile necesită o modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de vase de cultură închise ermetic (37) (38). Preparatele cu substanța chimică de testat ar trebui să fie realizate anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în ceea ce privește acceptabilitatea condițiilor de stocare.

CONDIȚII DE TESTARE

Solvenți

16. Solventul ar trebui ales pentru a optimiza solubilitatea substanțelor chimice de testat fără a afecta negativ desfășurarea testului, de exemplu, modificarea creșterii celulare, afectarea integrității substanței chimice de testat, reacția cu vasele de cultură, afectarea sistemului de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau a unui mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt, de exemplu, apa și dimetilsulfoxidul. În general, solvenții organici nu ar trebui să depășească 1 % (v/v) și solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu ar trebui să depășească 10 % (v/v) în mediul final de tratament. În cazul în care solvenții utilizați nu sunt bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora ar trebui să fie justificată prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanța chimică de testat și cu sistemul de testare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa unor astfel de date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1) pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau mutagene.

Măsurarea citotoxicității și alegerea concentrațiilor de expunere

17. În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, ar trebui să se evite concentrațiile susceptibile de a produce răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 20), precipitate în mediul de cultură (a se vedea punctul 21) sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 5). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă a pH-ului mediului la momentul adăugării acesteia, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

18. Selecția concentrației este efectuată în funcție de citotoxicitate și pe baza altor considerente (a se vedea punctele 20-22). Chiar dacă evaluarea citotoxicității în cadrul unui test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, efectuarea unui test inițial nu este obligatorie. Chiar dacă se realizează o evaluare inițială a citotoxicității, măsurarea citotoxicității pentru fiecare cultură este totuși necesară în cadrul experimentului principal. Citotoxicitatea ar trebui să fie evaluată cu ajutorul RS, și anume, eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, pe baza numărului de celule, în comparație cu ajustarea eficacității clonării la martorii negativi (cărora li se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %) (a se vedea apendicele 2 pentru formulă).

19. Ar trebui să se evalueze cel puțin patru concentrații de testat (fără a include martorii cu solvent și cei pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Chiar dacă se recomandă utilizarea culturilor duplicat, se poate utiliza fie cultura duplicat, fie cultura tratată ca fiind unică în cadrul fiecărei concentrații testate. Rezultatele obținute în ceea ce privește culturile duplicate independente la o concentrație dată ar trebui să fie consemnate separat, însă pot fi grupate pentru analiza datelor (17). În cazul substanțelor chimice de testat cu citotoxicitate ușoară sau fără citotoxicitate, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. În prezența citotoxicității, concentrațiile de testat selectate ar trebui să acopere un interval de la concentrația care produce citotoxicitate până la concentrații la care există citotoxicitate moderată și ușoară sau la care nu există citotoxicitate. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante abrupte, iar pentru a acoperi întregul interval de valori de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația concentrație-răspuns, ar putea fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și mai mult de patru concentrații, în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 43). Utilizarea a peste patru concentrații poate fi deosebit de importantă atunci când se utilizează culturi unice.

20. În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație ar trebui să vizeze obținerea unei valori cuprinse între 20 și 10 % RS. Ar trebui să se acorde atenție atunci când se interpretează rezultate pozitive identificate doar la valori de până la 10 % RS (punctul 43).

21. În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă apare citototoxicitatea la un nivel peste concentrația minimă de insolubilitate, se recomandă testarea la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece pot rezulta efecte date de artefacte din precipitat. La concentrația care produce un precipitat, ar trebui să se acorde atenție pentru a se asigura faptul că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului. Ar putea fi utilă determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment.

22. În cazul în care se constată inexistența precipitatului sau o citotoxicitate limitată, concentrația maximă de testare ar trebui să corespundă cu 10 mM, 2 mg/ml sau 2 µl/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (39) (40). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produse cu reacție complexă sau materiale biologice [și anume, substanțele chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă (UVCB)] (41), extracte din mediu etc., este posibil să fie necesară o concentrație de vârf mai mare (de exemplu, 5 mg/ml), în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecăreia dintre componente. Cu toate acestea, ar trebui remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (42).

Martori

23. Pentru fiecare condiție experimentală ar trebui să se includă martori negativi testați concomitent (a se vedea punctul 16) constituiți doar dintr-un solvent în mediul de tratare și tratați în aceleași condiții precum culturile de tratare.

24. Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra abilitatea laboratorului de a identifica substanțe mutagene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică, după caz. Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. Pot fi utilizate substanțe martor pozitive alternative, dacă acest lucru este justificat. Întrucât testele *in vitro* pe celule de mamifere pentru toxicitate genetică sunt suficient de standardizate, pot fi efectuate teste folosind tratamente cu și fără activare metabolică exogenă, cu utilizarea unui singur martor pozitiv care necesită activare metabolică. În acest caz, acest răspuns al unicului martor pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și capacitatea de răspuns a sistemului de testare. Fiecare martor pozitiv ar trebui să fie utilizat la una sau mai multe concentrații prevăzute a genera creșteri reproductibile și detectabile față de cele de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare, iar răspunsul nu ar trebui să fie compromis de citotoxicitate care depășește limitele specificate în prezenta metodă de testare (a se vedea punctul 20).

Tabelul 1

Substanțe de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi

Condiția activării metabolice	Locus	Substanța și nr. CAS
Absența activării metabolice exogene	*Hprt*	Metan-sulfonat de etil [CAS nr. 62-50-0] Etil nitrozouree [CAS nr. 759-73-9] 4-nitrochinolină 1-oxid [CAS nr. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrină [CAS nr. 3930-19-6] Mitomicină C [CAS nr. 50-07-7]
Prezența activării metabolice exogene	*Hprt*	3-metilcolantren [CAS nr. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [CAS nr. 57-97-6] Benzopiren [CAS nr. 50-32-8]
	xprt	Benzopiren [CAS nr. 50-32-8]

PROCEDURA

Tratamentul cu substanța chimică de testat

25. Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța chimică de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. Timpul de expunere ar trebui să fie corespunzător (de obicei, un timp de 3 până la 6 ore este suficient).

26. Numărul minim de celule utilizate pentru fiecare cultură de testare (martor și tratată) în fiecare etapă a testului ar trebui să depindă de frecvența celulelor mutante spontane. Orientarea generală este să se trateze și să se treacă suficiente celule pentru a menține 10 celule mutante spontane în fiecare cultură în toate etapele testului (17). Frecvența celulelor mutante spontane se situează, în general, între 5 și 20 × 10-6. Pentru o frecvență spontană a celulelor mutante de 5 × 10-6 și pentru a menține un număr suficient de celule mutante spontane (10 sau mai multe) chiar și pentru culturile tratate la concentrații care provoacă 90 % citotoxicitate în timpul tratamentului (10 % RS), ar fi necesar să se trateze cel puțin 20 × 106 celule. În plus, în perioada de manifestare, trebuie cultivate un număr suficient de celule (dar niciodată sub 2 milioane) care să fie placate pentru selecția celulelor mutante (17).

Timpul de expresie fenotipică și măsurarea frecvenței celulelor mutante

27. După perioada de tratament, celulele sunt cultivate pentru a permite manifestarea fenotipului mutant. În general, minim 7-9 zile sunt suficiente pentru a permite manifestarea fenotipică aproape optimă a celulelor mutante nou induse Hprt și xprt (43) (44). În această perioadă, celulele sunt subcultivate în mod regulat pentru a le menține într-o creștere exponențială. După manifestarea fenotipică, celulele sunt replacate în mediu cu și fără agent selectiv (6tioguanină) pentru determinarea numărului de celule mutante și, respectiv, a eficacității clonării la momentul selecției. Această placare se poate realiza prin utilizarea de plăcuțe pentru culturi monostrat sau de plăci cu micro-godeuri pentru celule în suspensie. Pentru selectarea celulelor mutante, celulele ar trebui să fie placate la o densitate pentru a asigura recuperarea optimă a respectivelor celule mutante (și anume, pentru a se evita cooperarea metabolică) (17). Plăcile sunt incubate pentru o perioadă adecvată de timp pentru creșterea optimă a coloniilor (de exemplu, 7-12 zile) și coloniile sunt numărate. Frecvența celulelor mutante se calculează pe baza numărului de colonii de mutanți, corectat prin eficacitatea clonării la momentul selecției celulelor mutante (a se vedea apendicele 2 pentru formule).

Competența de laborator

28. Pentru a stabili o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acestuia pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul ar trebui să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțe pozitive de referință care acționează prin diferite mecanisme (cel puțin una cu și una fără activare metabolică, alese dintre substanțele enumerate în tabelul 1) și diferiți martori negativi (utilizând diferiți solvenți/diferite vehicule). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi ar trebui să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Acest lucru nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, celor care au o bază de date anterioară disponibilă, astfel cum este definit la punctele 30-33.

29. În absența și în prezența activării metabolice ar trebui să se examineze o selecție de substanțe martor pozitive (a se vedea tabelul 1 de la punctul 25), pentru a demonstra capacitatea de a detecta substanțele chimice mutagene, pentru a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică și pentru a demonstra caracterul adecvat al condițiilor de creștere a celulelor în timpul tratamentului, al manifestării fenotipice și al selecției celulelor mutante, precum și al procedurilor de punctare. Ar trebui să se aleagă o plajă de valori ale concentrațiilor substanțelor chimice selectate astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date anterioare privind martorii testați

30. Laboratorul ar trebui să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

31. La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel ar trebui să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori (22). Pe măsură ce se adaugă tot mai multe date experimentale la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel ar trebui să fie, în mod ideal, în limitele de control de 95 % ale respectivei distribuții (17) (45) (46).

32. Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului ar trebui să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele ar trebui să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X (47)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (46). Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot construi și utiliza datele istorice (și anume, criteriile de includere și excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (45).

33. Datele privind martorii negativi ar trebui să constea în frecvențe ale celulelor mutante dintr-o cultură unică sau, de preferință, din culturi duplicate, astfel cum este descris la punctul 23. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, în limitele de control de 95 % ale distribuției bazelor de date privind martorii negativi testați anterior ale laboratorului (17) (45) (46). În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitei de 95 % a martorilor, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea mai sus) și nu există nicio dovadă a unor erori tehnice sau umane.

34. Orice modificare a protocolului experimental ar trebui să fie luată în considerare în ceea ce privește consecvența acesteia cu bazele de date privind martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră ar trebui să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

35. Prezentarea rezultatelor ar trebui să includă toate datele necesare pentru calcularea citotoxicității (exprimată ca RS). Datele, atât pentru culturile tratate, cât și pentru cele martor, ar trebui să includă numărul de celule la sfârșitul tratamentului, numărul de celule placate imediat după tratament și numărul de colonii (sau numărul de godeuri fără colonii, în cazul metodei cu micro-godeuri). Valoarea RS pentru fiecare cultură ar trebui exprimată ca procent raportat la martorul tratat cu solvent testat în paralel (a se vedea apendicele 1 pentru definiții).

36. Prezentarea rezultatelor ar trebui să includă, de asemenea, toate datele necesare pentru calcularea frecvenței celulelor mutante. Datele pentru culturile tratate și cele martor ar trebui să includă: (1) numărul de celule placate cu și fără agent selectiv (în momentul în care celulele sunt placate pentru selecția celulelor mutante) și (2) numărul coloniilor numărate (sau numărul de godeuri fără colonii, în cazul metodei cu micro-godeuri) din plăcile cu și fără agent selectiv. Frecvența celulelor mutante se calculează pe baza numărului de colonii de mutanți (pe plăci cu agent selectiv), corectat prin eficacitatea clonării (pe plăcile fără agent selectiv). Frecvența celulelor mutante ar trebui să fie exprimată ca fiind numărul de celule mutante pe milion de celule viabile (a se vedea apendicele 1 pentru definiții).

37. Ar trebui să fie prezentate date pentru fiecare cultură în parte. În plus, toate datele ar trebui să fie sintetizate sub formă de tabel.

Criterii de acceptabilitate

38. Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

— Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru a fi adăugat în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 33.

— Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 24) ar trebui să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date privind martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.

— Două condiții experimentale (și anume, cu și fără activare metabolică) au fost testate, cu excepția cazului în care una a condus la rezultate pozitive (a se vedea punctul 25).

— Se pot analiza un număr adecvat de celule și concentrații (punctele 25, 26 și 19).

— Criteriile de selecție ale concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 20, 21 și 22.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

39. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care, în oricare dintre condițiile experimentale examinate:

— cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de concentrație,

— Oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 33).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, se consideră că substanța chimică de testat poate produce mutații ale genelor la celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (46) (48).

40. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar negativă dacă, în toate condițiile experimentale examinate:

— niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,

— toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 33).

Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi incapabilă de a provoca mutații ale genelor la celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare.

41. Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

42. În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv, astfel cum este descris mai sus sau pentru a ajuta la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele ar trebui să fie evaluate de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Ar putea fi util să se desfășoare un experiment repetat, eventual folosind condiții experimentale modificate [de exemplu, stabilirea unei distanțe între concentrații, alte condiții de activare metabolică (și anume, concentrația S9 sau originea S9)].

43. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative. Prin urmare, răspunsul substanței chimice de testat ar trebui să fie concluzionat ca fiind echivoc (interpretat cu aceeași probabilitate de a fi pozitiv sau negativ).

Raportul testului

44. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

— justificarea alegerii solventului;

— procentul de solvent în mediul final de cultură.

Celule:

Pentru culturile principale din laborator:

— tipul, sursa liniilor celulare;

— numărul de treceri, dacă există, precum și istoricul în laborator;

— caracteristicile cariotipului și/sau numărul modal de cromozomi;

— metode de întreținere a culturilor de celule;

— absența micoplasmei;

— perioade de dublare a celulelor.

Condiții de testare:

— justificarea selectării concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate;

— compoziția mediilor de cultură, concentrația de CO_2, nivelul de umiditate;

— concentrația substanței chimice de testat, exprimată în concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, µg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);

— concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;

— temperatura de incubare;

— timpul de incubare;

— durata tratamentului;

— densitatea celulară în timpul tratamentului;

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursa fracției S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația și volumul amestecului S9 și fracția S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale fracției S9);
substanțe martor pozitive și negative, concentrații finale pentru fiecare condiție de tratament;

— timpul de manifestare (inclusiv numărul de celule însămânțate, subculturile și programele de alimentare, dacă este cazul);

— identitatea agentului selectiv și a concentrației acestuia;

— criteriile pentru acceptarea testelor;

— metodele utilizate pentru numărarea celulelor viabile și mutante;

— metodele utilizate pentru măsurarea citotoxicității;

— orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;

— durata perioadelor de incubare după placare;

— criteriile conform cărora un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea și precipitarea.

Rezultate:

— numărul de celule tratate și numărul de celule subcultivate pentru fiecare cultură;

— măsurători ale citotoxicității și alte observații, dacă este cazul;

— semne de precipitare și ora determinării;

— numărul de celule placată în mediu selectiv și neselectiv;

— numărul de colonii în mediul neselectiv și numărul de colonii rezistente în mediu selectiv și frecvențele celulelor mutante aferente;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;

— datele anterioare privind martorii negativi (cu solvent) și cei pozitivi, cu intervale, valori medii și abateri standard, precum și intervale de încredere (de exemplu, 95 %) și numărul de date;

— analize statistice (pentru culturi individuale și duplicate grupate, dacă este cazul) și valori p, dacă există.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris.

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

(3) Chu E.H.Y. și 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. și 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. și 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. și 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, 235239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. și 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. și 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. și Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297305.

(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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. și 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. și 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, Programul Organizației Națiunilor Unite pentru Mediu (UNEP). Publicație disponibilă la adresa: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. și 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. și 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. și 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) OCDE (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 (Orientările nr. 473, 476 și 487 privind testarea). Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică.

(40) Brookmire L., Chen J.J. și 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. Publicație disponibilă la adresa: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. și 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. și 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. și Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OCDE (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety, Series on Testing and Assessment, (nr. 199), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O.și 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. și Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, a treia ediție, New York: John Wiley & Sons.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază: Substanțe chimice care cauzează substituția perechilor de bază în ADN.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Eficacitatea clonării: Procentul de celule placate la o densitate scăzută, care pot crește într-o colonie care poate fi numărată.

Concentrații: se referă la concentrații finale ale substanței chimice de testat în mediul de cultură.

Citotoxicitate: Pentru testele incluse în prezenta metodă de testare, citotoxicitatea este identificată ca fiind o reducere a supraviețuirii relative a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul specific).

Mutație directă: o mutație a genelor de la forma parentală la forma mutantă care generează o modificare sau o pierdere a activității enzimatice sau a funcției proteinei codificate.

Mutageni de decalare a cadrului de citire: substanțe chimice care provoacă adăugarea sau ștergerea uneia sau a mai multor perechi de bază din molecula de ADN.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv ruperi ale ADN-ului, aducții, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Mediul HAT: Mediu care conține hipoxantină, aminopterină și timidină, utilizate pentru curățarea celulelor mutante Hprt.

Recombinare mitotică: În timpul mitozei, recombinarea între cromatide omoloage, ceea ce ar putea conduce la inducerea unor rupturi duble ale șirului ADN sau la pierderea heterozigozității.

Mediul MPA: Mediu care conține xantină, adenină, timidină, aminopterină și acid micofenolic utilizat pentru curățarea genelor mutante Xprt.

Mutagen: produce o modificare ereditară a uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN la gene sau a structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Frecvența mutanților (FM): numărul de colonii de celule mutante observate împărțit la numărul de celule placate într-un mediu selectiv, corectat pentru eficacitatea (sau viabilitatea) clonării la momentul selecției.

Timpul de expresie fenotipică: Timpul după tratament, în care modificarea genetică se fixează în interiorul genomului și orice produse genetice preexistente sunt epuizate până la modificarea trăsăturii fenotipice.

Supraviețuire relativă (RS): RS este utilizat ca indicator al citotoxicității legate de tratament. RS constituie eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în comparație cu eficacitatea clonării la martorii negativi (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %).

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amestec S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metalică a enzimelor.

Martor tratat cu solvent: Termen general pentru a defini culturile martor care primesc doar solventul, care este utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Martor netratat: culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nici substanță chimică de testat, nici solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan și în același mod precum culturile care primesc substanța chimică de testat.

UVCB: substanțe chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă și materiale biologice

Apendicele 2

FORMULE PENTRU EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII ȘI A FRECVENȚEI GENELOR MUTANTE

Citotoxicitatea este evaluată prin supraviețuirea relativă, și anume, eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în comparație cu eficacitatea ajustată a clonării la martorii negativi (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %) (a se vedea formula RS de mai jos).

EC ajustată pentru o cultură tratată printr-o substanță chimică de testat se calculează ca:

$$\text{EC ajustată} = \frac{\text{Numărul de celule la sfârșitul tratamentului}}{\text{Numărul de celule la începutul tratamentului}}$$

RS ajustată pentru o cultură tratată cu o substanță chimică de testat se calculează după cum urmează:

$$\text{RS} = \frac{\text{EC ajustată în cultura tratată}}{\text{EC ajustată în martorul tratat cu solvent}} \times 100$$

Frecvența genelor mutante reprezintă eficacitatea clonării coloniilor de gene mutante în mediu selectiv împărțită la eficacitatea clonării în mediu neselectiv, măsurată pentru aceeași cultură la momentul selecției.

$$\text{Frecventa genelor mutante} = \frac{\text{Eficacitatea clonării coloniilor mutante în mediu selectiv}}{\text{Eficacitatea clonării în mediu selectiv}}$$

În cazul în care se utilizează plăci pentru eficacitatea clonării:

EC = Număr de colonii/Număr de celule placate.

Atunci când se utilizează plăci cu micro-godeuri pentru eficacitatea clonării:

Numărul de colonii per godeu pe plăcile cu micro-godeuri respectă o distribuție Poisson.

Eficacitatea clonării = -LnP (0)/Numărul celulelor placate per godeu

Unde -LnP(0) este numărul probabil de godeuri goale dintre godeurile însămânțate și este descris prin următoarea formulă

LnP(0) = -Ln (număr de godeuri goale/numărul de godeuri placate)

(3) În partea B, capitolul B.22 se înlocuiește cu următorul text:

„B.22 **TESTUL DE LETALITATE DOMINANTĂ LA ROZĂTOARE**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 478 privind testarea (TG) (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic în contextul progreselor științifice, al necesităților fluctuante de reglementare și al considerațiilor privind bunăstarea animalelor. Această versiune modificată a metodei de testare reflectă mai mult de 30 de ani de experiență în ceea ce privește acest test, precum și potențialul de a integra sau de a combina acest test cu alte teste de toxicitate, precum studiile privind dezvoltarea toxicității și toxicitatea pentru reproducere sau studiile de genotoxicitate; însă, din cauza limitărilor sale și a utilizării unui număr mare de animale, acest test nu este prevăzut a fi utilizat ca metodă primară, ci ca o metodă de testare suplimentară care poate fi utilizată doar în cazul în care nu există nicio alternativă la cerințele de reglementare. Combinarea testelor de toxicitate are potențialul de a cruța un număr mare de animale pentru a nu fi utilizate în testele de toxicitate. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (1).

2. Scopul testului de letalitate dominantă (LD) este de a verifica dacă substanțele chimice produc mutații ca urmare a aberațiilor cromozomiale din celulele germinale. În plus, testul de letalitate dominantă este relevant pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că aceștia pot să difere de la o specie la alta, factorii metabolismului *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare a ADN-ului sunt active și contribuie la răspunsuri. Inducerea unei mutații LD după expunerea la o substanță chimică de testat indică faptul că substanța chimică a afectat țesutul germinal al animalului de testare.

3. Mutațiile LD provoacă moartea embrionului sau a fetusului. Inducerea mutației LD după expunerea la o substanță chimică de testat indică faptul că substanța chimică a afectat celulele germinale ale animalului de testare.

4. Un test LD este util pentru confirmarea rezultatelor pozitive ale testelor pe baza punctelor finale somatice *in vivo* și constituie un punct final relevant pentru estimarea pericolelor pentru om și a riscului de boli genetice care se transmit pe linia germenilor. Însă, acest test necesită un număr mare de animale și utilizarea intensivă a forței de muncă; prin urmare, acesta este foarte costisitor și de lungă durată. Deoarece frecvența spontană a mutațiilor letale dominante este destul de mare, sensibilitatea testului pentru detectarea creșterilor mici ale frecvenței mutațiilor este, în general, limitată.

5. Definițiile termenilor cheie sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

6. Testul este desfășurat cel mai frecvent pe șoareci (2) (3) (4), însă pot fi adecvate și alte specii, cum ar fi șobolanii (5) (6) (7) (8), în unele cazuri, în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific. În general, LD-urile constituie rezultatul unor aberații cromozomiale brute (anomalii structurale și numerice) (9) (10) (11), dar mutațiile genetice nu pot fi excluse. O mutație LD este o mutație care se produce într-o celulă germinală în sine sau este fixată după fertilizare în embrionul timpuriu, care nu cauzează disfuncția gametelui, însă este letală pentru oul fertilizat sau embrionul aflat în dezvoltare.

7. Fiecare mascul este împerecheat în mod succesiv cu femele virgine la intervale de timp adecvate. Numărul de împerecheri în urma tratamentului depinde de scopul final al studiului LD (punctul 23) și ar trebui să se asigure evaluarea tuturor fazelor de maturare a celulelor germinale masculine pentru LD-uri (12).

8. În cazul în care există dovezi că substanța chimică testată sau metabolitul (metaboliții) acesteia nu va (vor) ajunge la testicul, utilizarea acestui test nu este adecvată.

PRINCIPIUL TESTULUI

9. În general, masculii sunt expuși la o substanță chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt împerechiați cu femele virgine netratate. Diferitele tipuri de celule germinale pot fi testate prin utilizarea intervalelor de împerechere succesive. După împerechere, femelele sunt eutanasiate după o perioadă corespunzătoare de timp, iar uterele acestora sunt examinate pentru determinarea numărului de implanturi și de embrioni vii și morți. Mortalitatea dominantă a unei substanțe chimice de testat este determinată prin compararea implanturilor vii pentru o femelă din grupul tratat cu implanturile vii pentru o femelă din grupul martor tratat cu vehicul/solvent. Creșterea numărului de ovule implantate moarte per femelă în lotul tratat comparativ cu cele per femelă din grupul martor reflectă pierderea după implantare indusă de substanța chimică de testat. Pierderea după implantare se calculează prin determinarea raportului dintre implanturile moarte și cele totale la grupul tratat comparativ cu raportul dintre implanturile moarte și cele totale la grupul martor. Pierderea înainte de implantare poate fi estimată prin compararea numărului de corpora lutea minus implanturile totale sau numărul total de implanturi per femelă în grupul tratat și cel martor.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

10. Competența în cadrul acestui test ar trebui să fie stabilită prin demonstrarea capacității de a reproduce frecvențele letale dominante din datele publicate [de exemplu, (13) (14) (15) (16) (17) (18)] cu substanțe martor pozitive (inclusiv răspunsuri slabe), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1, precum și cu martori tratați cu vehicule, și prin obținerea de frecvențe ale martorilor negativi care constituie un interval de date consecvente acceptabile (a se vedea referințele de mai sus) sau cu distribuția anterioară a martorilor în cadrul laboratorului respectiv, dacă există.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Selecția speciilor de animale

11. Ar trebui să se utilizeze sușe de laborator utilizate în mod curent de la animale mature din punct de vedere sexul și sănătoase. De regulă, se utilizează șoareci, însă șobolanii ar putea fi, de asemenea, adecvați. Orice altă specie adecvată de mamifere poate fi utilizată, în cazul în care se furnizează justificarea științifică în raport.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

12. În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C (±3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul ar trebui să fie iluminat artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată de substanță chimică de testat în cazul alegerii acestei căi de administrare. Înainte de tratament sau de împerechere, rozătoarele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici (maximum cinci) de același sex, în cazul în care nu se preconizează sau se observă vreun comportament agresiv, de preferat în cuști solide, cu o îmbogățire adecvată a mediului. Animalele pot fi adăpostite individual, dacă acest lucru se justifică din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

13. Masculii și femelele sănătoase și mature din punct de vedere sexual se distribuie în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Animalele se identifică în mod individual prin utilizarea unei metode umane, minim invazive (de exemplu, prin aplicarea de inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea degetului sau a urechii) și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate amplasării cuștii. Se evită contaminarea încrucișată între martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Prepararea dozelor

14. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui dizolvate sau suspendate în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau amestecate în hrană sau în apa potabilă înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. În cazul expunerilor la inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Ar trebui să se utilizeze preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al depozitării și definesc condițiile de depozitare corespunzătoare.

Condiții de testare

Solvent/vehicul

15. Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la volumele de dozare utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea unei reacții chimice cu substanța chimică de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora ar trebui să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Printre exemplele de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit se numără apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb.

Martori pozitivi

16. Ar trebui să se utilizeze întotdeauna, concomitent, animale ca martori pozitivi, cu excepția cazului în care laboratorul a demonstrat competență în efectuarea testului și a utilizat în mod curent testul în ultimii ani (de exemplu, în ultimii 5 ani). Însă nu este necesar să se trateze animalele care sunt martori pozitivi pe aceeași cale ca și animalele care primesc substanța chimică de testat sau să se eșantioneze toate intervalele de împerechere. Ar trebui să se cunoască faptul că substanțele martor pozitive produc LD-uri în condițiile utilizate pentru test. Cu excepția tratamentului, animalele din grupurile martor ar trebui tratate în mod identic cu cele din grupurile tratate.

17. Dozele substanțelor martor pozitive ar trebui să fie selectate astfel încât să producă efecte reduse sau moderate care evaluează în mod critic performanța și sensibilitatea testului, dar care produc în mod consecvent efecte de letalitate dominantă pozitive. Tabelul 1 include exemple de substanțe martor pozitive și dozele adecvate.

Tabelul 1

Exemple de substanțe martor pozitive

Substanță [nr. CAS] (nr. de referință)	Interval de dozare eficace (mg/kg) (specii de rozătoare)	Timp de administrare (zile)
Trietilenmelamină [51-18-3] (15)	0,25 (șoareci)	1
Ciclofosfamidă [50-18-0] (19)	50-150 (șoareci)	5
Ciclofosfamidă [50-18-0] (5)	25-100 (șobolani)	1
Metansulfonat de etil [62-50-0] (13)	100-300 (șoareci)	5
Acrilamidă monomerică [79-06-1] (17)	50 (șoareci)	5
Clorambucil [305-03-3] (14)	25 (șoareci)	1

Martori negativi

18. Animalele martori negativi, tratați doar cu solvent sau vehicul, dar altfel tratați în același mod precum grupurile de tratament, ar trebui să fie incluse în fiecare moment de eșantionare (20). În absența unor date anterioare sau publicate referitoare la martori care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă LD-uri sau alte efecte vătămătoare, animalele martor netratate ar trebui să fie, de asemenea, incluse pentru fiecare moment de eșantionare, pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu vehicul.

PROCEDURA

Număr de animale

19. Masculii sunt împerecheați în mod secvențial la intervale adecvate prestabilite (de exemplu, intervale săptămânale, punctele 21 și 23), de preferat, cu o femelă virgină. Numărul de masculi per grup ar trebui să fie prestabilit pentru a fi suficient (în combinație cu numărul de femele împerecheate în fiecare interval de împerechere) pentru a furniza puterea statistică necesară pentru a detecta cel puțin o dublare a frecvenței LD (punctul 44).

20. Numărul de femele dintr-un interval de împerechere ar trebui să fie prestabilit, de asemenea, prin calcule ale puterii statistice pentru a permite identificarea a cel puțin unei dublări a frecvenței LD (și anume, un număr suficient de femele gestante care să furnizeze cel puțin 400 de implanturi totale) (20) (21) (22) (23) și pentru a preconiza cel puțin un implant mort pe unitate de analiză (de exemplu, grup de împerechere per doză) (24).

Perioada de administrare și intervale de împerechere

21. Numărul de intervale de împerechere după tratament este reglementat de programul de tratament și ar trebui să asigure evaluarea tuturor fazelor de maturare a celulelor germinale masculine pentru inducția DL (12) (25). Pentru un singur tratament cu maxim cinci doze administrate zilnic, ar trebui să existe 8 (șoarece) sau 10 (șobolan) împerecheri la intervale săptămânale după ultimul tratament. În cazul administrării mai multor doze, numărul de intervale de împerechere poate fi redus proporțional cu creșterea duratei perioadei de administrare, însă cu menținerea obiectivului de evaluare a tuturor fazelor spermatogenezei (de exemplu, după o expunere de 28 de zile, numai 4 împerecheri săptămânale sunt suficiente pentru a evalua toate fazele spermatogenezei la șoarece). Toate programele de tratament și de împerechere ar trebui să fie justificate din punct de vedere științific.

22. Femelele ar trebui să rămână cu masculii cel puțin pe durata unui ciclu estral (de exemplu, o săptămână acoperă un ciclu estral atât la șoareci, cât și la șobolani). Femelele care nu sau împerecheat într-un interval de o săptămână pot fi folosite pentru un interval de împerechere ulterior. În mod alternativ, până la împerechere, astfel cum este stabilit prin prezența spermei în vagin sau prin prezența unui dop vaginal.

23. Regimul de expunere și de împerechere utilizat depinde de obiectivul final al studiului LD. Dacă obiectivul este de a determina dacă o anumită substanță chimică induce mutații LD *per se*, atunci metoda acceptată ar fi să se expună o întreagă rundă de spermatogeneză (de exemplu, 7 săptămâni la șoarece, 5-7 tratamente pe săptămână) și să se realizeze împerecherea o dată, la sfârșit. Însă, dacă obiectivul este de a identifica tipul de celule germinale sensibile pentru inducerea LD, se preferă o expunere de o zi sau de 5 zile, urmată de împerecherea săptămânală.

Niveluri de dozare

24. În cazul în care este realizat un studiu preliminar de stabilire a dozelor deoarece nu există date adecvate disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta ar trebui să fie realizat în același laborator, utilizând aceeași specie, suș, sex și regim de tratament precum cele care urmează să fie utilizate în studiul principal (26). Obiectivul studiului este de a identifica doza maximă tolerată (DMT), definită drept doza cea mai mare care va fi tolerată fără dovezi de toxicitate care să limiteze studiul, în funcție de durata perioadei de studiu [de exemplu, comportament sau reacții anormale, reducerea ușoară a greutății corporale sau citotoxicitatea sistemului hematopoietic), dar nu decesul sau semne de durere, suferință sau stres care să necesite eutanasiere (27)].

25. De asemenea, DMT nu trebuie să afecteze negativ reușita împerecherii (21).

26. Substanțele chimice de testat cu activitate biologică specifică la doze netoxice mici (cum ar fi hormonii și mitogenii) și substanțele chimice care prezintă saturarea proprietăților toxicocinetice pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui să fie evaluate de la caz la caz.

27. Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet ar trebui să includă un grup martor negativ și minim trei niveluri de dozare separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mult de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate în cadrul unui studiu de stabilire a plajei sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o singură administrare ar trebui să fie de 2 000 mg/kg corp. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT ar trebui să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate ar trebui, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau nu provoacă toxicitate. Pentru substanțele chimice netoxice, doza-limită pentru o perioadă de administrare de cel puțin 14 de zile este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, iar pentru perioade de administrare de mai puțin de 14 zile, doza-limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

28. La conceperea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, se pot alege căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea subcutanată, intravenoasă, locală, orală (prin gavaj) sau implantarea, dacă se justifică. În orice caz, calea ar trebui să fie aleasă astfel încât să se asigure expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injecția intraperitoneală nu se recomandă, în mod normal, deoarece nu este o cale prevăzută pentru expunerea umană și ar trebui să fie utilizată doar cu justificări științifice specifice. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și împerechere, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (punctul 31). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură priză depinde de dimensiunea animalului de testare. De regulă, volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza maxim 2 ml/100 g. Se justifică utilizarea unor volume mai mari decât această valoare (dacă legislația privind bunăstarea animalelor permite acest lucru). Variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant în raport cu greutatea corporală la toate nivelurile de dozare.

Observații

29. Se recomandă emiterea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. În perioada de administrare a dozei, ar trebui să fie observate toate animalele, cel puțin de două ori pe zi, pentru a se determina morbiditatea și mortalitatea. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul studiului și cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor asupra dozelor repetate, precum și la momentul eutanasierii. Consumul de hrană ar trebui să fie măsurat cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, ar trebui să se măsoare consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă ar trebui să fie eutanasiate înainte de finalizarea perioadei de testare (27).

Colectarea și prelucrarea țesuturilor

30. Femelele sunt eutanasiate în a doua jumătate a perioadei de sarcină, în ziua de gestație (ZG) 13 la șoareci și în ZG 14-15 la șobolani. Se examinează uterele pentru identificarea efectelor de letalitate dominantă în vederea determinării numărului de implanturi, de embrioni vii și morți și de corpi galbeni.

31. Coarnele uterine și ovarele sunt expuse pentru numărarea corpurilor galbene, iar fetușii sunt îndepărtați, numărați și cântăriți. Ar trebui să se examineze cu atenție uterele pentru identificarea de resorbții mascate de fetușii vii și să se asigure enumerarea tuturor resorbțiilor. Mortalitatea fetală este înregistrată. Se înregistrează, de asemenea, numărul de femele impregnate cu succes și numărul total de implantații, pierderile anterioare implantării și mortalitatea post-implantare (inclusiv resorbțiile timpurii sau târzii). În plus, fetușii vizibili pot fi conservați în fixator Bouin timp de cel puțin două săptămâni, iar apoi examinați pentru identificarea de malformații externe majore (28) pentru a furniza informații suplimentare cu privire la efectele de reproducere și de dezvoltare ale agentului de testat.

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

32. Datele ar trebui să fie prezentate în format tabelar pentru indicarea numărului de masculi împerecheați, de femele gestante și de femele negestante. Rezultatele fiecărei împerecheri, inclusiv identitatea fiecărui mascul și a fiecărei femele, ar trebui să fie consemnate individual. Pentru fiecare femelă ar trebui să se specifice intervalul de împerechere, nivelul dozei pentru masculii tratați și numărul implanturilor vii și al implanturilor moarte.

33. Pierderile din faza de post-implantare se calculează prin determinarea raportului dintre implanturile moarte și cele totale la grupul tratat comparativ cu raportul dintre implanturile moarte și cele totale la grupul martor tratat cu vehicul/solvent.

34. Pierderile din faza de pre-implantare sunt calculate ca o diferență între numărul de corpuri galbene și numărul de implanturi sau ca o reducere a numărului mediu de implanturi per femelă în comparație cu împerecherile martor. În cazul în care se estimează pierderile din faza de pre-implantare, acestea ar trebui să fie consemnate.

35. Factorul de letalitate dominantă este estimat ca fiind: (decese post-implantare/implantări totale per femelă) × 100.

36. Ar trebui să se raporteze datele cu privire la toxicitate și semne clinice în conformitate cu punctul 29.

Criterii de acceptabilitate

37. Următoarele criterii determină acceptabilitatea unui test.

— Martorul negativ testat în paralel este în concordanță cu normele publicate referitoare la datele privind martorii negativi testați anterior și datele anterioare ale laboratorului privind martorii, dacă sunt disponibile (a se vedea punctele 10 și 18).

— Martorii pozitivi testați în paralel induc răspunsuri consecvente cu normele publicate pentru datele privind martorii pozitivi testați anterior sau cu baza de date a laboratorului privind martorii pozitivi testați anterior, dacă sunt disponibile, și produc o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 17 și 18).

— A fost analizat un număr adecvat de implanturi și doze totale (punctul 20).

— Criteriile pentru selecția dozei de vârf sunt în concordanță cu cele descrise la punctele 24 și 27.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

38. Pentru a furniza date suficiente pentru analiza doză-răspuns, ar trebui să se analizeze cel puțin trei grupuri de doze tratate.

39. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

— cel puțin una dintre dozele de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— creșterea este legată de doză în cel puțin o stare experimentală (de exemplu, un interval săptămânal de împerechere) atunci când evaluarea are loc în cadrul unui test corespunzător; și,

— oricare dintre aceste rezultate se situează în afara intervalului acceptabil de date privind martorul negativ, sau a distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată capabilă să inducă mutații de letalitate dominantă la celulele germinale ale animalelor de testare. În punctul 44 sunt prezentate recomandări privind cele mai adecvate metode statistice (44); alte abordări statistice recomandate pot fi găsite, de asemenea, în referințele bibliografice (20) (21) (22) (24) (29). Testele statistice utilizate ar trebui să considere animalul ca fiind unitatea experimentală.

40. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care:

— niciuna dintre dozele de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— nu există o creștere legată de doză în nicio condiție experimentală; și

— toate rezultatele se situează în intervalul acceptabil de date privind martorul negativ sau de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată incapabilă să inducă mutații de letalitate dominantă la celulele germinale ale animalelor de testare.

41. În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

42. În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru a contribui la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat (de exemplu, o creștere ușoară sau la limită), datele ar trebui evaluate în cadrul unei expertize și/sau al unor investigații suplimentare, folosind datele experimentale existente, cum ar fi analiza problemei dacă rezultatul pozitiv se situează în afara intervalului acceptabil al datelor privind martorii negativi sau al datelor istorice privind martorii negativi din laborator (30).

43. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, se va concluziona că acesta este echivoc.

44. Testele statistice utilizate ar trebui să considere masculul ca fiind unitatea experimentală. Deși este posibil ca datele privind numărarea (de exemplu, numărul implanturilor pe femelă) să fie distribuite conform distribuției Poisson și/sau proporțiile (de exemplu, proporția implanturilor moarte) să fie distribuite binomial, aceste date sunt deseori dispersate excesiv (31). În consecință, analiza statistică ar trebui să recurgă mai întâi la un test pentru identificarea dispersiei deficitare-excesive utilizând teste de variantă, cum ar fi testul de variantă binomială al lui Cochran (32) sau testul C(α) al lui Tarone pentru dispersie binominală excesivă (31) (33). În cazul în care nu se detectează nicio abatere de la dispersia binomială, pot fi testate tendințele proporțiilor la diferite niveluri de doze prin testul Cochran-Armitage al tendințelor (34) și se pot testa comparațiile pe perechi cu grupul martor prin testul Fisher al exactității (35). De asemenea, în cazul în care nu se detectează nicio abatere de la dispersia Poisson, tendințele numărătorilor pot fi testate folosind regresia Poisson (36), iar comparațiile pe perechi cu grupul martor pot fi testate în contextul modelului Poisson, utilizând contraste pe perechi (36). În cazul în care se detectează o dispersie deficitară sau excesivă semnificativă, se recomandă metodele care nu sunt bazate pe parametri (23) (31). Printre acestea se numără testele bazate pe clasificare, cum ar fi testul Jonckheere-Terpstra pentru tendință (37) și testele Mann-Whitney (38) pentru comparații pe perechi cu grupul martor tratat cu vehicul/solvent, cât și testele de permutație, re-eșantionare sau de tip bootstrap pentru comparații ale tendințelor și pe perechi cu grupul martor (31) (39).

45. Un test LD pozitiv oferă dovezi privind genotoxicitatea substanței chimice de testat la celulele germinale ale masculilor tratați din specia de testat.

46. Analizarea problemei dacă valorile observate se situează în interiorul sau în afara intervalului martor istoric poate oferi îndrumări la evaluarea semnificației biologice a răspunsului (40).

Raport testului

47. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Sinteză.

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunosc;

— prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau a inhalărilor;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale), atunci când sunt realizate.

Animale de testare:

— specia/sușa utilizată și o justificare a alegerii acestora;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— metoda de identificare unică a animalelor;

— pentru studii pe termen scurt: greutatea corporală a fiecărui mascul la începutul și la sfârșitul testului; pentru studii cu o durată mai mare de o săptămână: greutatea corporală individuală pe parcursul studiului și consumul de hrană. Ar trebui să fie inclus intervalul de greutate, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

— date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

— datele din studiul de stabilire a intervalului dozelor;

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— detalii privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— justificarea căii de administrare;

— metodele de măsurare a toxicității pentru animale, inclusiv, după caz, analize histopatologice sau hematologice și frecvența cu care s-au efectuat observațiile și cu care s-a măsurat greutatea corporală a animalelor;

— metode prin care se verifică dacă substanța chimică de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— detalii privind îmbogățirea mediului din captivitate;

— descrierea amănunțită a schemelor de tratament și de eșantionare și justificările alegerilor;

— metoda de analgezie;

— metoda de eutanasiere;

— proceduri pentru izolarea și păstrarea țesuturilor;

— sursa și numărul lotului pentru toate trusele și reactivii (după caz);

— metodele de enumerare a LD-urilor;

— programul de împerechere;

— metodele folosite pentru confirmarea împerecherii;

— momentul eutanasierii;

— criteriile de punctare a efectelor LD, inclusiv a corpurilor galbene, a implantărilor, a resorbțiilor și a pierderilor dinaintea implantării, a implanturilor vii și moarte.

Rezultate:

— starea animalelor înainte și pe toată durata perioadei de testare, inclusiv semne de toxicitate;

— greutatea corporală masculină în timpul tratamentului și al perioadelor de împerechere;

— numărul de femele împerecheate;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— date concomitente și istorice privind martorii negativi cu intervale, valori medii și deviații standard;

— date concomitente privind martorii pozitivi;

— date sub formă de tabel pentru fiecare femelă gravidă, inclusiv: număr de corpuri galbene; număr de embrioni implantați; numărul de resorbții și pierderi înainte de implantare; număr de implanturi vii; număr de implanturi moarte; greutăți ale fetusului;

— datele de mai sus sintetizate pentru fiecare perioadă de împerechere și doză, cu frecvențele de letalitate dominantă;

— analize statistice și metode aplicate.

Discutarea rezultatelor.

Concluzie.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, în Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235334, 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. și Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Elaborat de către grupul de lucru „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. și 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. și Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. și 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. și 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. și 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. și Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. și 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. și 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. și 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. și Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. și 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. și 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. și Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. și Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. și 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. și 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. și 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. și Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. și 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. și 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. și 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) OCDE (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, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J și 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. și Thybaud V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. și 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. În *Encyclopedia of* Statistical Sciences, volumul 9, Kotz S. și Johnson N. L. (Eds.), pp. 334336. 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. și Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, a patra ediție, capitolele 14 și 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.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

Corp(uri) galben(e): structura hormonală secretoare formată pe ovar, în locul în care un folicul a eliberat oul. Numărul de corpuri galbene din ovare corespunde numărului de ouă care au fost produse.

Mutație cu letalitate dominantă: o mutație care apare într-o celulă germinală sau este fixată după fertilizare și care provoacă moartea embrionului sau a fătului.

Rată de fertilitate: numărul de femele gestante împerecheate pe numărul de femele împerecheate.

Interval de împerechere: intervalul de timp dintre sfârșitul expunerii și împerecherea masculilor tratați. Prin controlarea acestui interval se pot evalua efectele chimice asupra diferitelor tipuri de celule germinale. La împerecherea șoarecilor în săptămânile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 și 8, după sfârșitul expunerii, măsoară efectele produse la nivelul spermei, al spermatidelor condensate, al spermatidelor rotunde, al spermatocitelor pachitene, al spermatocitelor timpurii, al spermatocitelor diferențiate, cu diferențierea între spermatogonie și spermatogonia celulele stem.

Pierdere pre-implantare: diferența dintre numărul de implanturi și numărul de corpuri galbene. Acesta poate fi estimat, de asemenea, prin compararea implanturilor totale per femelă în grupul tratat și cel martor.

Pierdere post-implantare: raportul dintre implanturile moarte din grupul tratat comparativ cu raportul dintre implanturile moarte și cele totale la grupul martor.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice

Apendicele 2

DURATA SPERMATOGENEZEI LA MAMIFERE

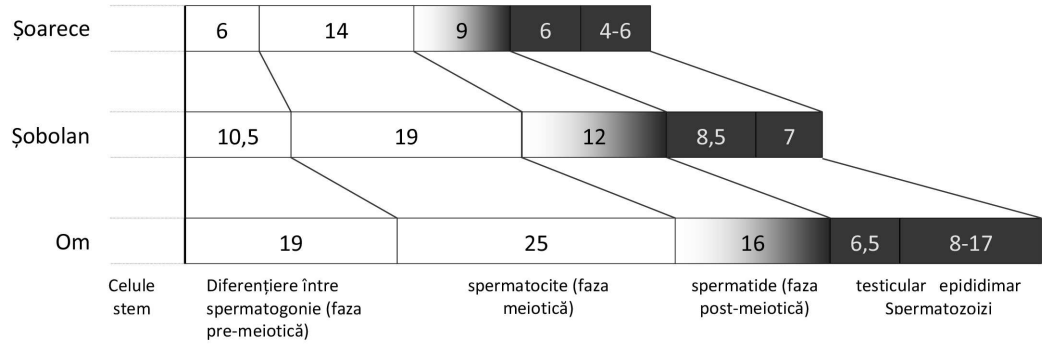


Fig. 1: Compararea duratei (în zile) a dezvoltării celulelor germinale masculine la șoareci, șobolani și la om. Repararea ADN-ului nu are loc în perioadele marcate prin nuanțare.

Mai sus este prezentată o schemă a spermatogenezei la șoarece, șobolan și om (preluată de la Adler, 1996). Printre spermatogoniile nediferențiate se numără: A-unice; A-perechi; și spermatogonii A-aliniate (Hess și de Franca, 2008). Spermatogonia A-unică este considerată a fi adevăratele celule stem; prin urmare, pentru evaluarea efectelor asupra celulelor stem, ar trebui să treacă cel puțin 49 zile (la șoarece) de la ultima injecție a substanței chimice de testat și împerechere.

Referințe

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

(4) În partea B, capitolul B.23 se înlocuiește cu următorul text:

„B.23 **TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE SPERMATOGONII DE MAMIFERE**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 483 privind testarea (TG) (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic în contextul progreselor științifice, al necesităților fluctuante de reglementare și al considerațiilor privind bunăstarea animalelor. Această versiune modificată a metodei de testare mulți ani de experiență în ceea ce privește acest test, precum și potențialul de a integra sau de a combina acest test cu alte studii de toxicitate sau de genotoxicitate; Combinarea studiilor de toxicitate are potențialul de a reduce numărul de animale utilizate în testele de toxicitate. Această metodă de testare face parte dintr-o serie de metode de testare cu privire la toxicologia genetică. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (1).

2. Scopul testului *in vivo* de aberație cromozomială pe spermatogonii de mamifere constă în identificarea acelor substanțe chimice care produc aberații cromozomiale ale structurii în celulele spermatogoniale ale mamiferelor (2) (3) (4). În plus, acest test este relevant pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că aceștia pot să difere de la o specie la alta, factorii metabolismului *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare a ADN-ului sunt active și contribuie la răspunsuri. Această metodă de testare nu este concepută pentru a măsura anomaliile numerice; testul nu este utilizat în mod obișnuit în acest scop.

3. Acest test măsoară aberațiile cromozomiale structurale (tipul cromozom și cromatidă) la împărțirea celulelor germinale spermatogoniale și, prin urmare, se preconizează că va prezice inducția mutațiilor ereditare la aceste celule germinale.

4. Definițiile principalilor termeni sunt prevăzute în apendice.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. De regulă, se utilizează rozătoare în cadrul acestui test, însă, în unele cazuri, ar putea fi adecvată și utilizarea altor specii, dacă acest lucru este justificat din punct de vedere științific. Preparatele citogenetice standard din testiculele rozătoarelor produc metafaze mitotice (spermatogonii) și meiotice (spermatocite). Metafazele mitotice și meiotice sunt identificate pe baza morfologiei cromozomilor (4). Prezentul test citogenetic *in vivo* permite detectarea aberațiilor cromozomiale din mitozele spermatogoniale. Alte celule-țintă nu fac obiectul prezentei metode de testare.

6. Pentru detectarea aberațiilor de tip cromatidă din celulele spermatogoniale, ar trebui să se examineze prima diviziune celulară mitotică după tratament, înainte ca aceste aberații să fie transformate în aberații de tip cromozomial în cadrul diviziunilor celulare ulterioare. Informații suplimentare pot fi obținute din spermatocitele tratate prin analiza cromozomilor meiotici pentru aberații cromozomiale structurale în metafaza I și II a diachinezei.

7. În testicul există un număr de generații de spermatogonii (5), iar aceste tipuri diferite de celule germinale pot avea un spectru de sensibilitate la tratamentul chimic. Astfel, aberațiile detectate reprezintă un răspuns agregat al populațiilor de celule spermatogoniale tratate. Majoritatea celulelor mitotice din preparatele pentru testicul sunt spermatogonii B, care au un ciclu celular de aproximativ 26 h (3).

8. În cazul în care există dovezi că substanța chimică testată sau metabolitul (metaboliții) acesteia nu va (vor) ajunge la testicul, utilizarea acestui test nu este adecvată.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

9. În general, animalele sunt expuse la substanța chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt eutanasiate la momentul corespunzător după tratament. Înainte de eutanasiere, animalele sunt tratate cu un agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colchicină sau Colcemid®). Apoi, din celulele germinale, se realizează preparate cromozomiale care se colorează, iar celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

10. Competența în cadrul acestui test ar trebui să fie stabilită prin demonstrarea capacității de a reproduce rezultatele preconizate pentru frecvențele aberațiilor cromozomiale structurale la spermatogonii cu substanțe martor pozitive (inclusiv răspunsuri slabe), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1, și obținerea de frecvențe ale martorului negativ care sunt consecvente cu o gamă acceptabilă de date despre martori din literatura publicată [de exemplu: (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)] sau distribuția istorică a martorilor din laborator, dacă există.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Selecția speciilor de animale

11. Ar trebui să se utilizeze sușe de laborator utilizate în mod curent, alegându-se animale adulte, tinere, sănătoase. De regulă, se utilizează șoareci masculi; însă, se pot utiliza masculi și din alte specii de mamifere adecvate, în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific și pentru a permite efectuarea acestui test în comun cu o altă metodă de testare. Justificarea științifică pentru utilizarea altor specii decât rozătoare ar trebui prezentată în raport.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

12. În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C (±3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință,70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul ar trebui să fie iluminat artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată de substanță chimică de testat în cazul alegerii acestei căi de administrare. Rozătoarele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici (maximum cinci), în cazul în care nu se preconizează vreun comportament agresiv, de preferat în cuști solide la sol, cu o îmbogățire adecvată a mediului. Animalele pot fi adăpostite individual, dacă acest lucru se justifică din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

13. Masculii adulți, tineri și sănătoși (cu vârsta de 8-12 săptămâni la începutul tratamentului) sunt utilizați, de regulă, și repartizați aleatoriu în grupurile de control și de tratament. Animalele se identifică în mod individual prin utilizarea unei metode umane, minim invazive (de exemplu, prin aplicarea de inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea urechii sau a degetului) și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate amplasării cuștii. Ar trebui să se evite contaminarea încrucișată între martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă și să nu depășească ± 20 %.

Prepararea dozelor

14. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui dizolvate sau suspendate în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau amestecate în hrană sau în apa potabilă înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. În cazul expunerilor la inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Ar trebui să se utilizeze preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al depozitării și definesc condițiile de depozitare corespunzătoare.

Condiții de testare - Solvent/vehicul

15. Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozajele utilizate și nu ar trebui să reacționeze chimic cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora ar trebui să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent/vehicul apos. Printre exemplele de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit se numără apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb. În absența unor date anterioare sau publicate cu privire la martori care să ateste faptul că nicio aberație cromozomială de structură și alte efecte vătămătoare nu sunt induse de un anumit solvent/vehicul atipic, se efectuează un studiu inițial pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu solvent/vehicul.

Martori pozitivi

16. Ar trebui să se utilizeze întotdeauna, concomitent, animale ca martori pozitivi, cu excepția cazului în care laboratorul a demonstrat competență în efectuarea testului și a utilizat în mod curent testul în ultimii ani (de exemplu, în ultimii 5 ani). În cazul în care nu este inclus un grup de martori pozitivi testați în paralel, în fiecare experiment ar trebui să fie incluși martori examinați (lame fixate și necolorate). Acestea pot fi obținute prin includerea în sistemul de punctare a probelor de referință adecvate ale studiului care au fost obținute și păstrate dintr-un experiment separat pe martor pozitiv realizat periodic (de exemplu, la 6-18 luni) în laboratorul în care este efectuat testul; de exemplu, în timpul testării competențelor și, ulterior, în mod regulat, după caz.

17. Substanțele chimice martor pozitive ar trebui să producă în mod fiabil o creștere detectabilă a frecvențelor celulelor cu aberații cromozomiale structurale peste nivelurile spontane. Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a releva imediat examinatorului identitatea probelor codate. Tabelul 1 include exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Tabelul 1

Exemple de substanțe martor pozitive

Substanțe [nr. CAS] (nr. de referință)
Ciclofosfamidă (monohidrat) [nr. CAS 50-18-0 (nr. CAS 6055-19-2)] (9)
Ciclohexilamină [nr. CAS 108-91-8] (7)
Mitomicină C [CAS nr. 50-07-7] (6)
Acrilamidă monomerică [79-06-1] (10)
Trietilenmelamină [nr. CAS 51-18-3]

Martori negativi

18. Animalele martori negativi, tratați doar cu solvent sau vehicul, dar altfel tratați în același mod precum grupurile de tratament, ar trebui să fie incluse în fiecare eșantionare. În absența unor date anterioare sau publicate referitoare la martori care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă aberații cromozomiale sau alte efecte vătămătoare, animalele martor netratate ar trebui să fie, de asemenea, incluse pentru fiecare moment de eșantionare, pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu vehicul.

PROCEDURA

Număr de animale

19. Dimensiunile grupului la începutul studiului ar trebui să fie stabilite cu scopul de a oferi minim 5 masculi pentru fiecare grup. Acest număr de animale pe grup este considerat a fi suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată (adică, în general, poate detecta cel puțin o dublare a frecvenței aberațiilor cromozomiale atunci când nivelul martorului negativ este de 1,0 % sau mai mare, cu o probabilitate de 80 % la un nivel de semnificație de 0,05) (3) (11). Ca o orientare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu efectuat la două eșantionări cu trei grupuri de dozaj și un grup martor negativ testat în paralel, la care se adaugă un grup martor pozitiv (fiecare grup alcătuit din cinci animale pe grup) ar necesita 45 de animale.

Schema de tratament

20. Substanțele chimice de testat sunt administrate, de obicei, o singură dată (și anume, un singur tratament); ar putea fi utilizate alte regimuri de dozaj, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.

21. La grupa cu dozajul maxim, se utilizează două eșantionări după tratament. Întrucât timpul necesar pentru absorbția și metabolizarea substanței (substanțelor) chimice de testat, precum și acțiunea acesteia (acestora) asupra cineticii ciclului celular poate avea efecte asupra timpului optim pentru detectarea aberației cromozomiale, se utilizează o eșantionare târzie la aproximativ 24 și 48 de ore după tratament. Pentru doze diferite de cea mai mare doză, se stabilește un interval de eșantionare timpurie de 24 de ore (cel mult egal cu durata ciclului celular la spermatogonii B și, astfel, optimizând probabilitatea de a puncta primele metafazate de după tratament) după tratament, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul un alt interval de eșantionare ca fiind mai adecvat și justificat.

22. Se pot utiliza și alte eșantionări. De exemplu, în cazul substanțelor chimice care exercită efecte independente S, pot fi adecvate intervale de eșantionare timpurii (și anume, mai mici de 24 de ore).

23. Se poate aplica un regim de tratament cu repetarea dozei, cum ar fi concomitent cu un test asupra unui alt punct final care utilizează o perioadă de administrare de 28 de zile (de exemplu, TM B.58); însă, ar fi necesare grupuri de animale suplimentare pentru încadrarea unor intervale de eșantionare diferite. În consecință, caracterul adecvat al unui astfel de program trebuie justificat științific de la caz la caz.

24. Înainte de eutanasiere, se procedează la injectarea intraperitoneală a animalelor cu o doză corespunzătoare de substanță chimică de inhibare a metafazei (de exemplu Colcemid® sau colchicină). Eșantionarea animalelor este efectuată apoi la un interval corespunzător. În cazul șoarecilor și al șobolanilor, acest interval este de aproximativ 3-5 ore.

Doze

25. În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor din cauza faptului că nu există date deja disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta este realizat în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă și regim de tratament care urmează să fie utilizate în studiul principal, în conformitate cu recomandările pentru realizarea de studii de stabilire a dozelor (12). Studiul ar trebui să aibă ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită ca doza care induce efecte toxice ușoare în raport cu durata perioadei de studiu (de exemplu, un comportament sau reacții anormale sau scăderea ușoară a greutății corporale sau citotoxicitate în sistemul hematopoietic), dar nu decesul sau semne de durere, suferință sau stres care necesită eutanasierea animalelor (13).

26. Doza maximă poate fi definită ca fiind doza care produce anumite semne de toxicitate la celulele spermatogoniale (de exemplu, o diminuare a proporției de mitoze spermatogoniale în raport cu prima și a doua metafază meiotică). Reducerea respectivă nu ar trebui să fie mai mare de 50 %.

27. Substanțele chimice de testat cu activitate biologică specifică la doze netoxice mici (cum ar fi hormonii și mitogenii) și substanțele chimice care prezintă saturarea proprietăților toxicocinetice pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui să fie evaluate de la caz la caz.

28. Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet ar trebui să includă un grup martor negativ (punctul 18) și minim trei niveluri de dozare separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mare de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate într-un studiu de stabilire a dozelor sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o singură administrare este de 2 000 mg/kg corp. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT ar trebui să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate ar trebui, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau la care nu provoacă toxicitate. În cazul în care se observă toxicitate în țesutul țintă (și anume, în testicule) la toate dozele testate, se recomandă realizarea unui studiu suplimentar la doze netoxice. Studiile care au drept scop caracterizarea pe deplin a informațiilor cantitative doză-răspuns pot necesita grupuri suplimentare de dozare. Pentru anumite tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) reglementate prin cerințe specifice, aceste limite pot varia. În cazul în care substanța chimică de testat produce toxicitate, ar trebui să fie selectată doza-limită plus două doze mai mici (astfel cum este descris mai sus). Doza-limită pentru o perioadă de administrare de cel puțin 14 de zile este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, iar pentru perioade de administrare mai mici de 14 zile, doza-limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

29. La conceperea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea sau implantarea pot fi alese ca fiind justificate. În orice caz, calea ar trebui să fie aleasă astfel încât să se asigure expunerea adecvată a țesutului-țintă. Injectarea intraperitoneală nu se recomandă, în mod normal, decât dacă aceasta este justificată din punct de vedere științific, întrucât aceasta nu este, de regulă, o cale relevantă de expunere umană din punct de vedere fiziologic. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și eșantionare, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (a se vedea punctul 33). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură priză depinde de dimensiunea animalului de testare. De regulă, volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza maxim 2 ml/100 g greutate corporală. Se justifică utilizarea unor volume mai mari decât această valoare (dacă legislația privind bunăstarea animalelor permite acest lucru). Variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant în raport cu greutatea corporală la toate nivelurile de dozare.

Observații

30. Se recomandă emiterea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. Toate animalele ar trebui să fie examinate cel puțin de două ori pe zi pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul studiului, cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor cu doză repetată și la eutanasiere. În cadrul studiilor cu o durată de cel puțin o săptămână, ar trebui să se măsoare consumul de hrană cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, ar trebui să se măsoare consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă ar trebui să fie eutanasiate înainte de finalizarea perioadei de testare (13).

Prepararea cromozomilor

31. Imediat după eutanasiere, se obțin suspensii de celule germinale din unul sau ambele testicule, care sunt expuse la o soluție hipotonică și se fixează conform protocoalelor instituite [de exemplu, (2) (14) (15)]. Celulele sunt apoi răspândite pe lamele și colorate (16) (17). Toate lamelele ar trebui să fie codificate, astfel încât identitatea lor să nu fie disponibilă factorului de punctare.

Analiză

32. Pentru fiecare animal ar trebui să fie punctate cel puțin 200 de metafaze bine stabilite (3) (11). În cazul în care frecvența martorilor negativi anteriori este < 1 %, ar trebui punctate peste 200 de celule/animal pentru a crește puterea statistică (3). Ar trebui utilizate metode de colorare care să permită identificarea centromerului.

33. Aberațiile de tip cromatidian și cromozomial ar trebui să fie înregistrate separat și clasificate în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi). Lacunele ar trebui înregistrate, dar nu luate în considerare atunci când se stabilește dacă o substanță chimică induce creșterea semnificativă a incidenței celulelor cu aberații cromozomiale. Procedurile utilizate în laborator ar trebui să asigure efectuarea analizei aberațiilor cromozomiale de către factori de punctare bine instruiți. Recunoscând faptul că metodele de preparare a lamelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri nu mai mic de $2n \pm 2$, unde n este numărul haploid de cromozomi pentru specia respectivă.

34. Deși scopul testului este de a detecta aberațiile cromozomiale structurale, este important să se înregistreze frecvențele celulelor poliploide și ale celulelor cu cromozomi endoreduplicați atunci când se observă astfel de evenimente (a se vedea punctul 44).

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

35. Datele pentru fiecare animal ar trebui să fie prezentate sub formă de tabel. Pentru fiecare animal, ar trebui să se evalueze numărul de celule cu (o) aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale) și numărul de aberații cromozomiale per celulă. Ar trebui să se întocmească separat o listă cu aberațiile de tip cromatidian și cromozomial clasificate în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi), specificând numărul și frecvența acestora pentru culturile experimentale și cele martor. Lacunele sunt înregistrate separat. Se raportează frecvența lacunelor, dar, în general, aceasta nu se include în analiza frecvenței totale a aberațiilor cromozomiale structurale. Dacă se observă, se raportează procentul poliploidiei și al celulelor cu cromozomi endoreduplicați.

36. Ar trebui să se raporteze datele cu privire la toxicitate și semne clinice în conformitate cu punctul 30.

Criterii de acceptabilitate

37. Următoarele criterii determină acceptabilitatea unui test.

— Martorul negativ testat în paralel este în concordanță cu normele publicate referitoare la datele privind martorii negativi testați anterior, care sunt preconizate, în general, a fi > 0 % și ≤ 1,5 % celule cu aberații cromozomiale, și datele anterioare ale laboratorului privind martorii, dacă sunt disponibile (a se vedea punctele 10 și 18).

— Martorii pozitivi testați în paralel induc răspunsuri consecvente cu normele publicate pentru datele privind martorii pozitivi testați anterior sau cu baza de date a laboratorului privind martorii pozitivi testați anterior, dacă sunt disponibile, și produc o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 17 și 18).

— Analizarea unui număr adecvat de celule și doze (a se vedea punctele 28 și 32).

— Criteriile pentru selecția dozei de vârf sunt în concordanță cu cele descrise la punctele 25 și 26.

38. Dacă se observă atât mitoză, cât și meioză, ar trebui să se stabilească rata mitozelor spermatogoniale în prima și a doua metafază meiotică, ca măsură a citotoxicității pentru toate animalele tratate și cele martor negative dintr-un eșantion total de 100 de celule divizoare pe animal. Dacă se constată doar mitoză, ar trebui să se determine indexul mitotic în cel puțin 1 000 de celule pentru fiecare animal.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

39. Pentru a furniza date suficiente pentru analiza doză-răspuns, ar trebui să se analizeze cel puțin trei grupuri de doze tratate.

40. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

— cel puțin una dintre dozele de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— creșterea este legată de doză cel puțin în cadrul unui interval de eșantionare; și,

— oricare dintre aceste rezultate se situează în afara intervalului acceptabil de date privind martorul negativ, sau a distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată capabilă să inducă aberații cromozomiale la celulele spermatogoniale ale animalelor de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (11) (18). Testele statistice utilizate ar trebui să considere animalul ca fiind unitatea experimentală.

41. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care:

— niciuna dintre dozele de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— nu există o creștere legată de doză în nicio condiție experimentală; și,

— toate rezultatele se situează în intervalul acceptabil de date privind martorul negativ sau de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată incapabilă să inducă aberații cromozomiale la celulele spermatogoniale ale animalelor de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (11) (18). Un rezultat negativ nu exclude posibilitatea ca substanța chimică să inducă aberații cromozomiale în faze de dezvoltare ulterioare nestudiate, sau mutații genetice.

42. În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

43. În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru a contribui la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat (de exemplu, o creștere ușoară sau la limită), datele ar trebui evaluate în cadrul unei expertize și/sau al unor investigații suplimentare, folosind datele experimentale existente, cum ar fi analiza problemei dacă rezultatul pozitiv se situează în afara intervalului acceptabil al datelor privind martorii negativi sau al datelor istorice privind martorii negativi din laborator (19).

44. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, se va concluziona că acesta este echivoc.

45. O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanța chimică de testat are potențialul de a inhiba procesele mitotice și să producă aberații cromozomiale numerice (20). O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanța chimică de testat are potențialul de a inhiba evoluția ciclului celular (21) (22), care reprezintă un mecanism de inducere a modificărilor cromozomiale numerice diferit de inhibarea procesele mitotice (a se vedea punctul 2). Prin urmare, incidența celulelor poliploide și a celulelor cu cromozomi endoreduplicați ar trebui să se înregistreze separat.

Raportul testului

46. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Sinteză.

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul;

— prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau a inhalărilor;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitate, omogenitate, concentrații nominale), atunci când sunt realizate.

Animale de testare:

— specia/sușă utilizată și justificarea utilizării;

— numărul și vârsta animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— metoda de identificare unică a animalelor

— pentru studii pe termen scurt: greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului; pentru studii cu o durată mai mare de o săptămână: greutatea corporală individuală pe parcursul studiului și consumul de hrană. Ar trebui să fie inclus intervalul de greutate, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

— date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

— datele din studiul de stabilire a dozelor, dacă s-a realizat;

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— justificarea căii de administrare;

— detalii privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— justificarea momentelor de sacrificare;

— metodele de măsurare a toxicității pentru animale, inclusiv, după caz, analize histopatologice sau hematologice și frecvența cu care s-au efectuat observațiile și cu care s-a măsurat greutatea corporală a animalelor;

— metode prin care se verifică dacă substanța chimică de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— descrierea amănunțită a schemelor de tratament și de eșantionare și justificările alegerilor;

— metoda de eutanasiere;

— metoda de analgezie (atunci când se utilizează);

— proceduri pentru izolarea țesuturilor;

— identitatea substanței chimice de inhibare a metafazei, concentrația acesteia și durata tratamentului;

— metodele de preparare a lamelor;

— criteriile pentru examinarea aberațiilor;

— numărul de celule analizate per animal;

— criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultate:

— starea animalelor înainte și pe toată durata perioadei de testare, inclusiv semne de toxicitate;

— greutățile corporale și ale organelor la sacrificare (dacă sunt utilizate tratamente multiple, greutățile corporale luate în timpul regimului de tratament);

— semnele de toxicitate;

— indexul mitotic;

— proporția de celule spermatogoniale în mitoză în prima și a doua metafază meiotică sau alte dovezi ale expunerii la țesutul țintă;

— tipul și numărul aberațiilor, consemnate separat pentru fiecare animal;

— numărul total de aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;

— numărul de celule cu aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— analizele statistice și metodele aplicate;

— datele privind martorii negativi studiați în paralel;

— datele istorice privind martorii negativi cu intervale, valori medii, abateri standard și un interval de încredere de 95 % (dacă există) sau datele istorice privind martorii negativi publicate, care sunt utilizate pentru acceptabilitatea rezultatelor testului;

— date concomitente privind martorii pozitivi;

— variațiile ploidiei, dacă există, inclusiv frecvența celulelor poliploide și/sau enderoduplicate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. În: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt și 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. și 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. și de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. În: 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. În: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. și Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

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

(8) Cattanach, B.M. și 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. și 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. și 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) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

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

(15) Hsu, T.C., Elder, F. și 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. și 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. și Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, în: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Partea I revizuită. 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. și Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays În: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Raport, Partea 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. și Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. și 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. și 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.

Apendice

DEFINIȚII

Aneuploidie: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Centromer: regiune (regiuni) dintr-un cromozom care, în timpul diviziunii celulare, este (sunt) legată(e) de fibrele fusului, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

Diversitatea cromozomilor: diversitatea formelor cromozomiale (de exemplu, metacentrică, acrocentrică etc.) și dimensiuni.

Aberație de tip cromatidic: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura cromatidelor singure sau prin ruptura și alipirea între cromatide.

Aberație de tip cromozomial: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura sau ruptura și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

Clastogen: orice substanță chimică care cauzează aberații cromozomiale structurale la populații de celule sau organisme.

Deficiență: leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidelor.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv rupturi, deleții, aducții, modificări și legături nucleotidice, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Indice mitotic (MI): raportul dintre numărul de celule în metafază și numărul total de celule observate într-o populație celulară; indică gradul de proliferare a populației respective.

Mitoză: divizarea nucleului celular, împărțită în general în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

Mutagen: produce o modificare ereditară a uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN la gene sau a structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Anomalie numerică: modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru animalele utilizate.

Poliploidie: multiplicare a numărului de cromozomi haploizi (*n*), alta decât diploidia (și anume 3*n*, 4*n* ș.a.m.d.).

Aberație structurală: modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanțe chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă și materiale biologice

(5) În partea B, capitolul B.40 se înlocuiește cu următorul text:

„B.40 **COROZIUNE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODA DE TESTARE PRIVIND REZISTENȚA ELECTRICĂ TRANSCUTANATĂ (RET)**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 430 (2015). Corodarea pielii înseamnă producerea de leziuni ireversibile ale pielii, care se manifestă ca o necroză vizibilă ce pătrunde în epidermă, ajungând în dermă, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare B.40 actualizată asigură o procedură *in vitro* care permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive și corozive în conformitate cu GHS al ONU (1) și cu Regulamentul CLP.

2. Evaluarea corozivității cutanate a implicat, de regulă, utilizarea animalelor de laborator (MT B.4, echivalentă cu Orientarea nr. 404 a OCDE adoptată inițial în 1981 și revizuită în 1992, 2002 și 2015) (2). În plus față de MT B.40, au fost validate și adoptate alte metode de testare *in vitro* pentru testarea potențialului de coroziune cutanată ale substanțelor chimice ca MT B.40bis (echivalentă cu Orientarea TG nr. 431 a OCDE) (3) și MT B.65 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 435 a OCDE) (4), care pot, de asemenea, să identifice subcategorii de produse chimice corozive atunci când este necesar. Au fost adoptate mai multe metode de testare *in vitro* validate ca MT B.46 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 439) a OCDE (5), pentru testarea iritației cutanate. Un document de orientare privind metodele integrate de testare și evaluare al OCDE (Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru coroziunea și iritația cutanată descrie mai multe module care grupează diverse surse de informații și instrumente de analiză și oferă îndrumări cu privire la (i) modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanate și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (6).

3. Prezenta metodă de testare abordează coroziunea cutanată având drept punct final sănătatea umană. Aceasta se bazează pe metoda de testare a rezistenței electrice transcutanate (RET) pe piele de șobolan, care utilizează discuri de piele pentru identificarea substanțelor corozive prin capacitatea lor de a produce o pierdere a integrității normale a stratului cornos și a funcției de barieră. Orientarea OCDE aferentă privind testarea a fost adoptată inițial în 2004 și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA.

4. Pentru a evalua testele de coroziune cutanată *in vitro* în scopuri de reglementare, au fost realizate studii de prevalidare (7), urmate de un studiu de validare formală a metodei de testare a RET pe piele de șobolan pentru evaluarea coroziunii cutanate (8) (9) (10) (11). Rezultatul acestor studii a condus la recomandarea că metoda de testare a RET (desemnată drept metoda de referință validată – MRV) ar putea fi utilizată în scopuri de reglementare pentru evaluarea corozivității cutanate *in vivo* (12) (13) (14).

5. Înainte să se poată utiliza în scopuri de reglementare o metodă de testare RET *in vitro* similară sau modificată propusă pentru coroziunea cutanată, alta decât MRV, ar trebui să se stabilească fiabilitatea, relevanța (precizia) și limitările acesteia pentru scopul propus al acesteia pentru a asigura similaritatea acesteia cu MRV în conformitate cu cerințele standardelor de performanță (PS) (15). Sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE va fi garantat numai după revizuirea și includerea în orientarea OCDE aferentă privind testarea a oricăror metode de testare noi sau actualizate propuse în urma standardelor de performanță.

DEFINIȚII

6. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendice.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Un studiu de validare (10) și alte studii publicate (16) (17) au raportat că metoda de testare a RET pe piele de șobolan este în măsură să facă diferența între substanțele cunoscute ca fiind corozive și cele necorozive pentru piele, cu o sensibilitate totală de 94 % (51/54) și specificitate de 71 % (48/68), pentru o bază de date cu 122 de substanțe.

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

8. Această metodă de testare abordează coroziunea cutanată *in vitro*. Aceasta permite identificarea substanțelor chimice necorozive și corozive, în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP. O limitare a acestei metode de testare, astfel cum s-a demonstrat prin studiile de validare (8) (9) (10) (11), este aceea că aceasta nu permite subclasificarea substanțelor și amestecurilor corosive, în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP. Cadrul de reglementare aplicabil va determina modul în care va fi utilizată această metodă de testare. Deși această metodă de testare nu oferă informații adecvate privind iritația cutanată, ar trebui remarcat faptul că MT B.46 abordează în mod specific efectul iritației cutanate *in vitro*asupra sănătății (5). Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte documentul de orientare al OCDE privind IATA (6).

9. În cadrul procesului de validare a acestei metode de testare a fost testată o gamă largă de substanțe chimice reprezentând în principal substanțe, iar baza de date empirice a studiului de validare a ajuns să cuprindă 60 de substanțe chimice în total dintr-o gamă largă de clase de substanțe chimice (8) (9). Pe baza datelor generale disponibile, metoda de testare este aplicabilă pentru o gamă largă de clase de substanțe chimice și stări fizice, inclusiv lichide, semisolide, solide și ceruri. Însă, întrucât pentru anumite stări fizice nu sunt disponibile elemente de testare cu date de referință adecvate, ar trebui remarcat faptul că, în timpul validării, au fost evaluate un număr comparativ redus de ceruri și substanțe solide corozive. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind lipsa de aplicabilitate a metodei de testare la o anumită categorie de substanțe, metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie de substanțe. În plus, se presupune că această metodă de testare este aplicabilă pentru amestecuri ca o extindere a aplicabilității sale la substanțe. Însă, datorită faptului că amestecurile acoperă un spectru larg de categorii și compoziții și că, în prezent, sunt disponibile doar informații limitate privind testarea amestecurilor, în cazurile în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la o categorie specifică de amestecuri (de exemplu, în urma unei strategii propuse de Eskes *et al*., 2012) (18), metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie specifică de amestecuri. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul studiilor de validare (8) (9). Deși se poate concepe faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul metodei de testare RET, actuala metodă de testare nu permite testarea gazelor și a aerosolilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

10. Substanța chimică de testat este aplicată timp de maxim 24 de ore pe suprafețele epidermice ale discurilor de piele într-un sistem de testare cu două compartimente, în care discurile de piele funcționează ca separație între compartimente. Discurile de piele sunt prelevate de la șobolani cu vârste cuprinse între 28 și 30 de zile, care au fost eutanasiați. Substanțele chimice corozive sunt identificate după capacitatea lor de a produce o pierdere a integrității normale a stratului cornos și a funcției de barieră, care este măsurată ca o micșorare a RET sub nivelul de prag (16) (a se vedea punctul 32). Pentru testarea RET a pielii de șobolan a fost aleasă o valoare-limită de 5 kΩ, pe baza numeroaselor date referitoare la o gamă largă de substanțe, în care marea majoritate a valorilor au fost în mod clar cu mult peste (deseori > 10 kΩ) sau cu mult sub (deseori < 3 kΩ) această valoare (16). În general, substanțele chimice de testat care sunt necorozive pentru animale, dar sunt iritante sau neiritante, nu reduc RET sub această valoare-limită. Mai mult decât atât, utilizarea altor preparate de piele sau a altor echipamente poate modifica valoarea-limită, necesitând o validare ulterioară.

11. În procedura de testare este introdusă o etapă de fixare a unui colorant pentru testarea în vederea confirmării rezultatelor pozitive ale RET care prezintă valori apropiate de 5 kΩ. Această etapă de fixare a unui colorant determină dacă creșterea permeabilității ionice are loc datorită distrugerii fizice a stratului cornos. Metoda RET, în care s-a utilizat piele de șobolan, s-a demonstrat a fi anticipativă pentru coroziunea *in vivo* la iepure, evaluată prin MT B.4 (2).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

12. Înainte de utilizarea sistematică a metodei de testare a RET pe piele de șobolan, care respectă această metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin clasificarea corectă a celor douăsprezece substanțe de verificare recomandate în tabelul 1. În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (16)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare ([1])

Substanță	NR CAS	Clasa chimică ([3])	GHS al ONU/CLP Cat. bazată pe rezultate *in vivo* ([4])	MRV Cat. bazată pe rezultate *in vitro*	Stare fizică	pH ([5])
Substanțe corozive *in vivo*						
N,N'-Dimetil dipropilentriamină	10563-29-8	bază organică	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diaminopropan	78-90-0	bază organică	1A	6 × C	L	8,3
Acid sulfuric (10 %)	7664-93-9	acid anorganic	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
Hidroxid de potasiu (10 % soluție apoasă)	1310-58-3	bază anorganică	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Acid octanoic (caprilic)	124-07-2	acid organic	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terț-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Substanțe necorozive *in vivo*						
Acid izostearic	2724-58-5	acid organic	NC	6 × NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	bază organică	NC	6 × NC	S	5,5
Bromură de fenetil	103-63-9	electrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metiltio) -benzaldehidă	3446-89-7	electrofil	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Decadienă	1647-16-1	substanță organică neutră	NC	6 × NC	L	3,9
Tetracloretilenă	127-18-4	substanță organică neutră	NC	6 × NC	L	4,5

Abrevieri: aq = apos; Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; MRV = Metodă de referință validată; C = coroziv; NC = necoroziv.

([1]) Substanțele de verificare, sortate mai întâi ca substanțe corozive/necorozive, apoi pe subcategorii de substanțe corozive și apoi pe clase de substanțe chimice, au fost selectate dintre substanțele utilizate în studiul de validare ECVAM a metodei de testare RET pe piele de șobolan (8) (9). Cu excepția cazului în care se indică altfel, substanțele au fost testate la nivelul de puritate obținut atunci când au fost achiziționate dintr-o sursă comercială (8). Selecția a inclus, în măsura posibilității, substanțe care: (i) sunt reprezentative pentru gama de răspunsuri privind corozivitatea (de exemplu, substanțe necorozive; substanțe slab corozive și puternic corozive) pe care MRV poate să le măsoare sau să le estimeze; (ii) sunt reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în studiul de validare; (iii) reflectă caracteristicile de performanță ale MRV; (iv) au structuri chimice bine definite; (v) induc rezultate definitive în metoda de testare de referință *in vivo*; (vi) sunt disponibile în comerț; și (vii) nu sunt asociate cu costuri de eliminare prohibitive.

([3]) Clasa de substanțe chimice stabilită de Barratt *et al.* (8).

([4]) Grupurile de ambalaje aferente conform ONU sunt I, II și, respectiv, III pentru categoriile 1A, 1B și 1C din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

([5]) Valorile pH-ului au fost obținute de la Fentem *et al.* (9) și Barratt *et al.* (8).

PROCEDURA

13. Sunt disponibile proceduri standard de operare (PSO) pentru metoda de testare a coroziunii pielii prin RET pe piele de șobolan (19). Metodele de testare a RET pe piele de șobolan care fac obiectul prezentei metode de testare ar trebui să respecte următoarele condiții:

Animale

14. Ar trebui să se utilizeze șobolani, deoarece sensibilitatea pielii lor la substanțe, în prezenta metodă de testare, a fost demonstrată anterior (12) și este singura sursă de piele care a fost validată în mod oficial (8) (9). Vârsta (la care pielea este prelevată) și specia șobolanului sunt extrem de importante pentru a obține certitudinea că foliculii piloși sunt în stare latentă, înainte să înceapă creșterea părului adult.

15. Părul dorsal și de pe coaste al șobolanilor tineri de aproximativ 22 de zile, femele sau masculi (specia Wistar – comparabilă sau derivată), este îndepărtat cu grijă cu un clește mic. Apoi animalele sunt spălate prin ștergere atentă, iar zona fără păr este cufundată într-o soluție cu antibiotic (care conține de exemplu streptomicină, penicilină, cloramfenicol și amfotericin cu concentrații eficiente pentru inhibarea creșterii bacteriilor). Animalele sunt spălate încă o dată cu antibiotic în a treia sau a patra zi după prima spălare și sunt folosite în termen de trei zile după a doua spălare, atunci când stratul cornos s-a refăcut după îndepărtarea părului.

Pregătirea discurilor de piele

16. Animalele sunt eutanasiate fără durere la vârsta de 28-30 de zile; această vârstă este critică. Se îndepărtează pielea dorso-laterală a fiecărui animal și se desprinde grăsimea subcutanată în exces prin jupuirea cu grijă a acesteia de pe piele. Se prelevează discuri de piele cu un diametru de aproximativ 20 mm fiecare. Pielea poate fi păstrată înainte ca discurile să fie folosite, în cazurile în care se demonstrează că datele privind martorul negativ și pozitiv sunt echivalente cu cele obținute cu pielea proaspătă.

17. Fiecare disc de piele este așezat peste un capăt al unui tub PTFE (politetrafluoretilenă), asigurându-se că suprafața epidermei se află în contact cu tubul. Peste capătul tubului se așază prin apăsare un inel de cauciuc pentru a fixa pielea, iar excesul de țesut este tăiat. Apoi inelul de cauciuc este etanșat cu grijă la capătul tubului PTFE cu vaselină. Tubul este susținut de o clemă elastică în interiorul unei camere recipient care conține soluție de $MgSO_4$ (154 mM) (figura 1). Discul de piele ar trebui scufundat în întregime în soluția de $MgSO_4$. Dintr-o singură piele de șobolan se pot obține 10-15 discuri de piele. Dimensiunile tubului și ale inelului sunt prezentate în figura 2.

18. Înainte de începerea testării, se măsoară RET pe două discuri de piele ca o procedură de control al calității pentru fiecare piele de animal. Ambele discuri ar trebui să aibă valorile rezistenței mai mari de 10 kΩ pentru ca restul discurilor să poată fi folosite pentru test. Dacă valoarea rezistenței este mai mică de 10 kΩ, discurile rămase din pielea respectivă ar trebui eliminate.

Aplicarea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

19. Pentru fiecare test (experiment) ar trebui utilizați martori pozitivi și negativi concomitent pentru a asigura performanța adecvată a modelului experimental. În cadrul fiecărui test (experiment) ar trebui să se utilizeze discuri de piele de la un singur animal. Substanțele chimice de testat martor pozitive și negative sugerate sunt acidul clorhidric 10 M și, respectiv, apă distilată.

20. Substanțele chimice de testat lichide (150 µ) sunt aplicate uniform pe suprafața epidermei din interiorul tubului. Atunci când se testează materiale solide, pe disc se aplică o cantitate suficientă din substanța solidă, astfel încât întreaga suprafață a epidermei să fie acoperită. Peste substanța solidă se adaugă apă deionizată (150 µ), iar tubul este agitat ușor. Pentru a se obține un contact maxim cu pielea, substanțele solide ar trebui încălzite la 30 °C pentru ca substanțele chimice de testat să se topească sau să se înmoaie sau ar trebui să fie măcinate pentru a se obține granule sau pulbere.

21. Pentru fiecare test și substanță chimică martor se utilizează trei discuri de piele pentru fiecare test (experiment). Substanțele chimice de testat sunt aplicate pentru 24 de ore la 20-23 °C. Substanța chimică de testat este îndepărtată prin spălare sub jet de apă de la robinet până la temperatura camerei, până când nu se mai pot îndepărta alte materiale.

Măsurători ale RET

22. Impedanța pielii se măsoară ca RET prin utilizarea unei punți Wheatstone de joasă tensiune și curent alternativ (18). Specificațiile generale ale punții sunt: tensiunea de lucru 1-3 V, curent alternativ sinusoidal sau dreptunghiular de 50-1000 Hz și un interval de măsurare de cel puțin 0,1-30 kΩ. Puntea de date folosită în studiul de validare a măsurat inductanța, capacitatea electrică și rezistența până la valori de 2 000 H, 2 000 µF și 2 MΩ la frecvențe de 100 Hz sau 1 kHz, utilizând valori în serie sau în paralel. Măsurătorile testului de corozivitate RET constau în înregistrarea rezistenței la o frecvență de 100 Hz utilizând valori în serie. Înainte de măsurarea rezistenței electrice, se micșorează tensiunea suprafeței pielii prin adăugarea unui volum suficient de etanol 70 % pentru a acoperi epiderma. După câteva secunde etanolul este îndepărtat din tub și apoi țesutul este hidratat prin adăugarea de 3 ml soluție $MgSO_4$ (154 mM). Electrozii punții sunt așezați pe ambele părți ale discului de piele pentru a măsura rezistența în kΩ/disc de piele (figura 1). Dimensiunile electrozilor și lungimea electrodului expus sub clemele-crocodil sunt prezentate în figura 2. În timpul măsurării rezistenței, clema atașată electrodului interior este așezată pe partea superioară a tubului PTFE pentru a se asigura că lungimea electrodului scufundat în soluția de $MgSO_4$ rămâne constantă. Electrodul exterior este introdus în interiorul compartimentului receptor astfel încât să se sprijine pe fundul compartimentului. Distanța dintre clema elastică și fundul tubului PTFE este menținută constantă (figura 2) deoarece această distanță influențează valoarea rezistenței obținute. Prin urmare, distanța dintre electrodul interior și discul de piele trebuie să fie constantă și minimă (1-2 mm).

23. Dacă valoarea rezistenței măsurate este mai mare de 20 kΩ, acest lucru se poate datora resturilor de substanță chimică de testat care acoperă suprafața epidermică a discului de piele. Se poate încerca o îndepărtare suplimentară a acestui strat depus, de exemplu prin acoperirea tubului PTFE cu degetul mare protejat cu o mănușă și agitarea acestuia timp de aproximativ 10 secunde; soluția de $MgSO_4$ este înlăturată și se repetă măsurarea rezistenței cu $MgSO_4$ proaspăt.

24. Proprietățile și dimensiunile aparatului de testare și ale procedurii experimentale utilizate pot influența valorile RET obținute. Pe baza datelor obținute utilizând aparatul specific și procedura descrisă în această metodă, s-a stabilit un prag de corozivitate de 5 kΩ. Dacă se modifică condițiile de testare sau dacă se folosește un alt aparat, valorile de control și de prag pot fi diferite. Prin urmare, este necesar să se etaloneze metodologia și valorile de prag ale rezistenței prin testarea unei serii de substanțe de performanță alese dintre substanțele utilizate pentru studiul de validare (8) (9) sau dintre clase de substanțe chimice similare cu substanțele studiate. În tabelul 1 se identifică un set de substanțe de verificare adecvate.

Metode de fixare a unui colorant

25. Expunerea anumitor materiale necorozive poate duce la micșorarea rezistenței sub limita de 5 kΩ, permițându-se trecerea ionilor prin stratul cornos, ceea ce reduce rezistența electrică (9). De exemplu, substanțele organice neutre și substanțele care au proprietăți tensioactive (inclusiv detergenți, emulgatori și alți surfactanți) pot îndepărta lipidele pielii, făcând bariera cutanată mai permeabilă pentru ioni. Astfel, dacă, în absența unei deteriorări perceptibil vizibile a discurilor de piele, valorile RET generate de aceste substanțe chimice sunt de aproximativ 5 kΩ sau mai mici, ar trebui efectuată o evaluare a penetrării colorantului pentru țesuturile tratate și cele martor pentru a se determina dacă valorile RET obținute au constituit rezultatul unei permeabilități cutanate crescute sau al coroziunii cutanate (7) (9). În acest din urmă caz, în care stratul cornos este perturbat, colorantul sulforhodamină B, atunci când este aplicat pe suprafața pielii, pătrunde rapid și colorează țesutul de dedesubt. Acest colorant specific este stabil pentru o gamă largă de substanțe și nu este afectat de procedura de extracție descrisă mai jos.

Aplicarea și îndepărtarea colorantului sulforhodamină B

26. După efectuarea măsurătorilor RET, sulfatul de magneziu este îndepărtat din tub, iar pielea este examinată cu atenție pentru a se depista deteriorări evidente. În cazul în care nu există nicio vătămare evidentă gravă (de exemplu, perforare), se aplică o diluție de 150 µl de soluție de 10 % (g/v) în apa distilată a colorantului sulforhodamină B (acid roșu 52; C.I. 45100; număr CAS 3520-42-1) pe suprafața epidermei fiecărui disc de piele timp de 2 ore. Ulterior, aceste discuri de piele sunt spălate cu apă de la robinet la temperatura camerei, timp de aproximativ 10 secunde, pentru a îndepărta colorantul în exces/nefixat. Se scoate cu grijă fiecare disc de piele de pe tubul de PTFE și se introduce într-un flacon (de ex. un flacon scintilator din sticlă, de 20 ml) care conține apă deionizată (8 ml). Flacoanele sunt agitate ușor timp de cinci minute pentru a se îndepărta orice cantitate de colorant nefixat. Se repetă procedura de spălare, după care discurile de piele sunt scoase și așezate în

flacoane care conțin 5 ml de dodecilsulfat de sodiu (SDS) 30 % (greutate/volum) în apă distilată și incubate la 60 °C în timpul nopții.

27. După incubare, fiecare disc de piele este scos și eliminat, iar soluția rămasă este centrifugată timp de 8 minute la 21 °C (forța centrifugală relativă ~ 175 × g). Un eșantion de supernatant de 1 ml este diluat într-o proporție de 1 la 5 (v/v) [și anume 1 ml + 4 ml] cu SDS 30 % (g/v) în apă distilată. Densitatea optică (DO) a soluției este măsurată la 565 nm.

Calcularea conținutului de colorant

28. Conținutul de colorant sulforhodamină B din fiecare disc se calculează din valorile DO (9) (coeficientul de extincție molară a colorantului sulforhodamină B la 565 nm = $8,7 \times l0^4$; greutatea moleculară = 580). Conținutul de colorant este determinat pentru fiecare disc de piele folosind o curbă caracteristică de etalonare, iar ulterior se calculează conținutul mediu de colorant pentru testele repetate.

Criterii de acceptabilitate

29. Valorile medii ale RET sunt acceptate cu condiția ca valorile controalelor pozitive și negative efectuate în paralel să se încadreze în intervalele acceptabile pentru metoda în laboratorul de testare. Pentru metodologia și aparatele descrise mai sus, intervalele acceptabile ale rezistenței sunt prezentate în următorul tabel:

Substanță	martor	Interval de rezistență (kΩ)
Pozitivă	Acid clorhidric 10 M	0,5 - 1,0
Negativă	Apă distilată	10 - 25

30. Valorile medii de fixare ale colorantului sunt acceptate cu condiția ca valorile controalelor efectuate în paralel să se încadreze în intervalele acceptabile pentru metodă. Pentru metodologia și aparatele descrise mai sus, intervalele propuse pentru conținutul acceptabil de colorant pentru substanțele martor sunt prezentate în următorul tabel:

Substanță	martor	Intervalul conținutului de colorant (µg/disc)
Pozitivă	Acid clorhidric 10 M	40 - 100
Negativă	Apă distilată	15 - 35

Interpretarea rezultatelor

31. Valoarea-limită a RET care face distincția între substanțele chimice de testat corozive și cele necorozive a fost stabilită în timpul optimizării metodei de testare, testată într-o fază de pre-validare și confirmată în cadrul unui studiu de validare formală.

32. Modelul predictiv pentru metoda de testare a coroziunii pielii prin RET pe piele de șobolan (9) (19), asociat cu sistemul de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP, este prezentat mai jos:

Substanța chimică de testat este considerată necorozivă pentru piele:

i) dacă valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mare de 5 kΩ sau

ii) valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mică decât sau egală cu (≤) 5 kΩ și

— discurile de piele nu prezintă deteriorări evidente (de exemplu, perforare); și

— conținutul mediu de colorant pe disc este sub (<) conținutul mediu de colorant pe disc din martorul pozitiv HCl 10 M obținut în paralel (a se vedea punctul 30 pentru valori ale martorului pozitiv).

Substanța chimică de testat este considerată corozivă pentru piele:

i) Dacă valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mică decât sau egală cu (≤) 5 kΩ, iar discurile de piele sunt în mod evident deteriorate (de exemplu, perforate) sau

ii) valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mică decât sau egală cu (≤) 5 kΩ și

— discurile de piele nu prezintă deteriorări evidente (de exemplu, perforare), însă

— conținutul mediu de colorant pe disc este peste sau egal cu (≥) conținutul mediu de colorant pe disc din martorul pozitiv HCl 10 M obținut în paralel (a se vedea punctul 30 pentru valori ale martorului pozitiv).

33. Un singur test (experiment) compus din cel puțin trei discuri de piele duplicate ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea este fără echivoc. Însă, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale duplicatelor și/sau un procent mediu al RET egal cu 5 ± 5 k, ar trebui avut în vedere un al doilea test (experiment) independent, precum și un al treilea în cazul unor rezultate discordante între primele două teste (experimente).

DATE ȘI RAPORTARE

Date

34. Valorile rezistenței (kΩ) și valorile conținutului de colorant (μg/disc), după caz, pentru substanța chimică de testat, precum și pentru martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie consemnate în format tabelar, incluzând date pentru fiecare disc duplicat în cadrul fiecărui test (experiment) și valorile medii ± SD. Ar trebui să fie consemnate toate experimentele repetate. Deteriorările observate pe discurile de piele ar trebui să fie consemnate pentru fiecare substanță chimică de testat.

Raportul testului

35. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și substanțe martor

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Animale de testare:

— sușa și sexul utilizat;

— vârsta animalelor atunci când sunt folosite ca animale donatoare;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— detalii privind pregătirea pielii.

Condiții de testare:

— curbe de etalonare pentru aparatele de testare;

— curbe de etalonare pentru încercarea de legare a colorantului, filtrul de tip band pass pentru măsurarea valorilor densității optice și intervalul de liniaritate a DO a dispozitivului de măsurare (de exemplu, spectrofotometru), dacă este cazul;

— detalii ale procedurii de testare utilizate pentru măsurările RET;

— detalii ale procedurii de testare utilizate pentru evaluarea legării colorantului, după caz;

— dozele de testare utilizate, durata perioadei (perioadelor) de expunere și temperatura (temperaturile) expunerii;

— detalii privind procedura de spălare utilizată după perioada de expunere;

— numărul de discuri de piele duplicate utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (martor pozitiv și negativ);

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

— trimiteri la datele istorice ale modelului. Aceasta trebuie să includă, printre altele:

i) Acceptabilitatea valorilor RET ale substanțelor martor pozitive și negative (în kΩ) în raport cu intervalele de valori ale substanțelor martor pozitive și negative

ii) Acceptabilitatea valorilor privind conținutul de colorant al substanțelor martor pozitive și negative (în µg/disc) în raport cu intervalele de valori privind conținutul de colorant al substanțelor martor pozitive și negative

iii) Acceptabilitatea rezultatelor testelor în raport cu variabilitatea istorică dintre discurile de piele duplicate

— Descrierea criteriilor de decizie/a modelului predictiv aplicat.

Rezultate:

— Prezentarea tabelară a datelor obținute în cadrul testelor RET și de legare a colorantului (dacă este cazul), în cazul fiecărei substanțe chimice de testat și fiecărui martor, pentru fiecare test (experiment) și pentru fiecare disc de piele duplicat (animale individuale și eșantioane de piele individuale), medii, SD și CV;

— descrierea tuturor efectelor observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS), a doua ediție revizuită, ONU New York și Geneva, 2013. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(3) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Model de piele *in vitro*.

(4) Capitolul B.65 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin barieră cu membrană.

(5) Capitolul B.46 din prezenta anexă, Iritația cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită.

(6) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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. și 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. și 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. și 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. Publicația NIH nr. 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), emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC10), 3 aprilie 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. Publicația NIH nr. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OCDE (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 nr. 218. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A. și 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. și 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. și 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 (decembrie 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OCDE (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, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Figura 1

Aparatura Pentru Testarea Ret Pe Pielea De Șobolan

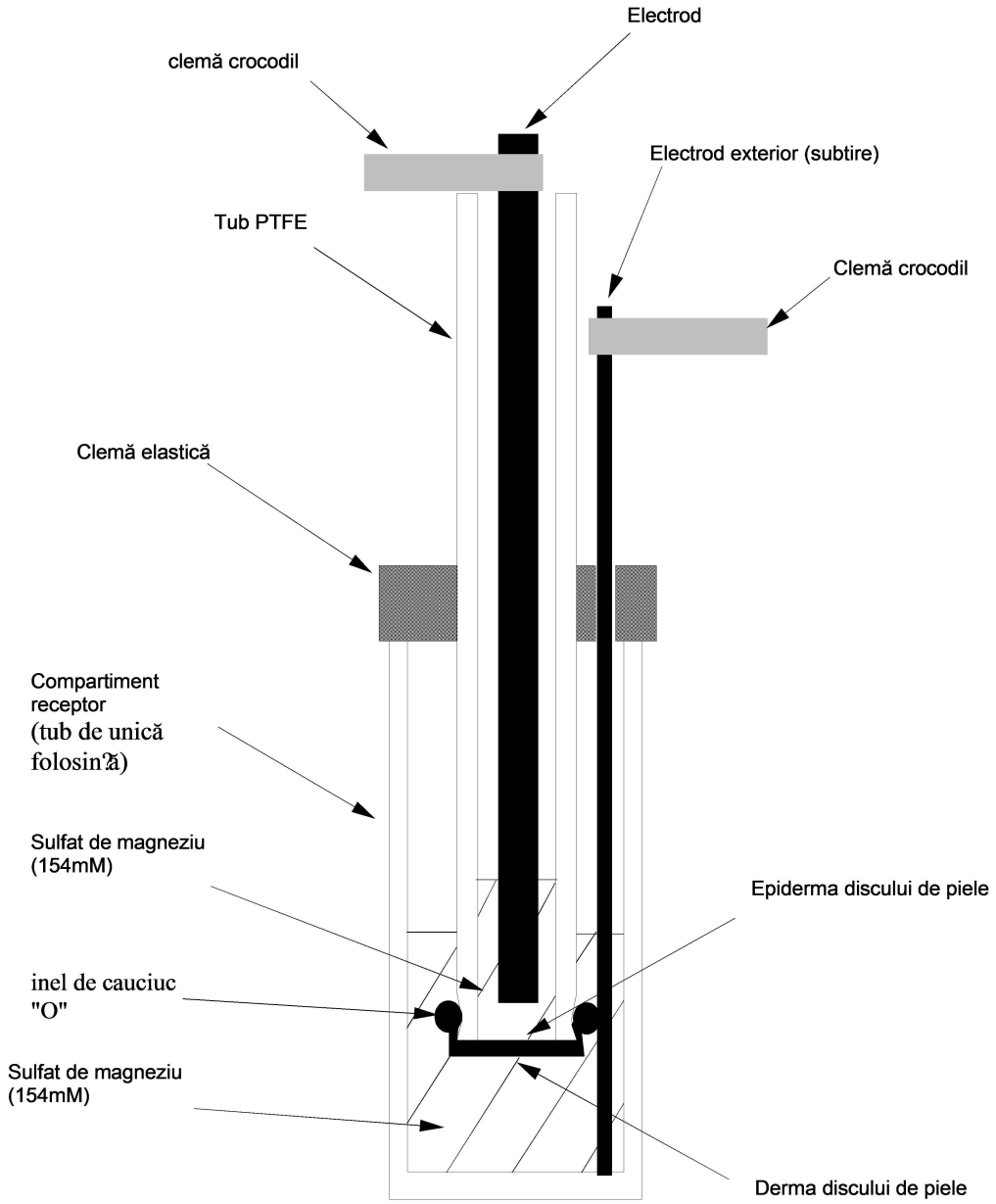
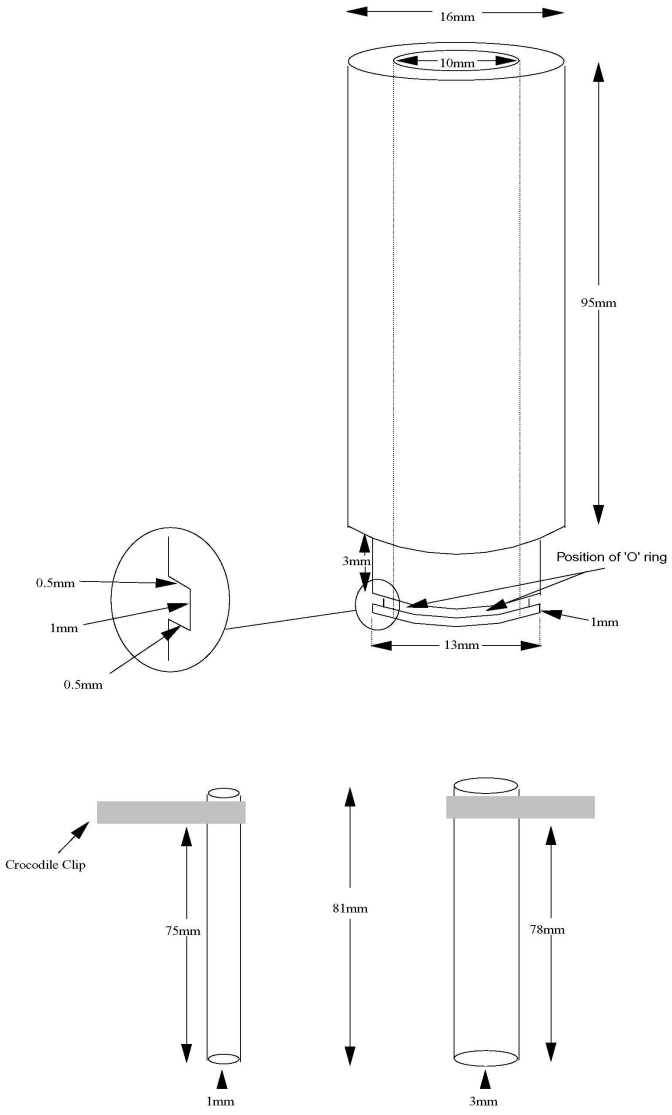


Figura 2

Dimensiunile Tubului De Politetrafluoretilenă (Ptfe) Și A Tuburilor Receptoare Și A Electrozilor Utilizați



Factori importanți ai aparatului prezentat mai sus:

— diametrul interior al tubului PTFE,

— lungimea electrozilor în raport cu tubul PFTE și tubul receptor, astfel încât discul de piele să nu fie atins de electrozi, iar lungimea standard a electrodului să fie în contact cu soluția de $MgSO_4$,

— cantitatea de soluție de $MgSO_4$ din tubul receptor ar trebui să fie suficientă pentru ca adâncimea lichidului, în raport cu nivelul din tubul PTFE, să fie astfel cum se arată în figura 1,

— discul de piele ar trebui fixat de tubul PFTE suficient de bine, astfel încât rezistența electrică să fie o măsură reală a proprietăților pielii.

Apendice

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim «concordanță», pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (20).

C: Coroziv.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Concordanță: Un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe" și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (20).

GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (ONU)]: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare.

Amestec: Un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NC: Necoroziv.

DO: Densitate optică.

MP: Martor pozitiv, un duplicat conținând toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratat cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Standarde de performanță (SP): Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) niveluri similare de fiabilitate și acuratețe, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă ar trebui să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe chimice de referință.

Relevanță: Descrierea relației dintre metoda de testare și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care metoda de testare măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (20).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (20).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (20).

Coroziunea cutanată *in vivo*: Producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (20).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Testare: O singură substanță chimică de testat testată concomitent pe minim trei discuri de piele duplicate.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Rezistența electrică transcutanată (RET): O măsură a impedanței electrice a pielii, exprimată ca valoare a rezistenței în kiloohmi. Este o metodă simplă și fiabilă de evaluare a funcției de barieră a pielii prin înregistrarea trecerii ionilor prin piele folosind o punte Wheatstone.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

(6) În partea B, capitolul B.40 se înlocuiește cu următorul text:

„B.40 **COROZIUNE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODĂ DE TESTARE PE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ (RhE)**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 431 (2016). Corodarea pielii înseamnă producerea de leziuni ireversibile ale pielii, care se manifestă ca o necroză vizibilă ce pătrunde în *epidermă*, ajungând în *dermă*, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([6])]. Această metodă de testare B.40bis actualizată asigură o procedură *in vitro* care permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive și corozive în conformitate cu GHS al ONU și cu Regulamentul CLP. Aceasta permite, de asemenea, o subclasificare parțială a substanțelor corozive.

2. Evaluarea potențialului de coroziune cutanată al substanțelor chimice a implicat, de regulă, utilizarea de animale de laborator (MT B.4, echivalentă cu Orientarea TG nr. 404 a OCDE; adoptată inițial în 1981 și revizuită în 1992, 2002 și 2015) (2). În plus față de actuala metodă de testare B.40bis, au fost validate și adoptate alte metode de testare *in vitro* pentru testarea potențialului de coroziune cutanată ale substanțelor chimice ca MT B.40 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 431 a OCDE) (3) și MT B.65 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 435 a OCDE) (4). În plus, s-a adoptat metoda MT B.46 *in vitro* (echivalentă cu Orientarea TG nr. 439 a OCDE) pentru testarea potențialului de iritație cutanată. Un document de orientare privind strategiile integrate de testare și evaluare al OCDE (Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru coroziunea și iritația cutanată descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și oferă îndrumări cu privire la (i) modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanate și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (6).

3. Prezenta metodă de testare abordează coroziunea cutanată având drept punct final sănătatea umană. Aceasta utilizează epiderma umană reconstruită (RhE) (obținută din keratinocite epidermice netransformate derivate de la om), care imită aproape perfect proprietățile histologice, morfologice, biochimice și fiziologice ale părților superioare ale pielii umane, și anume, *epiderma*. Orientarea OCDE corespunzătoare privind testarea a fost inițial adoptată în 2004, actualizată în 2013 pentru a include metode de testare suplimentare bazate pe modele RhE și posibilitatea de a utiliza metodele pentru a susține subclasificarea substanțelor chimice corozive și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA și a introduce utilizarea unei proceduri alternative pentru măsurarea viabilității.

4. În această metodă de testare sunt incluse patru modele RhE validate disponibile în comerț. Studii de pre-validare (7), urmate de un studiu de validare oficial pentru evaluarea coroziunii pielii (8) (9) (10), au fost realizate (11) (12) pentru două dintre aceste modele de testare disponibile în comerț, EpiSkin ™ Standard Model (SM) și EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (denumite în textul de mai jos metode de referință validate - MRV). Rezultatul acestor studii a condus la recomandarea ca cele două MRV-uri menționate mai sus să poată fi utilizate în scopuri de reglementare pentru a distinge substanțele corozive (C) de substanțele necorozive (NC) și ca EpiSkin™ să poată fi utilizată, în plus, pentru a susține subclasificarea substanțelor corozive (13) (14) (15). Alte două modele de testare RhE a coroziunii pielii *in vitro*, care sunt disponibile în comerț, au generat rezultate similare cu cele ale MRV EpiDerm™ conform validării bazate pe standardele de performanță (16) (17) (18). Acestea sunt SkinEthic™ RHE ([7]) și epiCS® (denumită anterior EST-1000) care pot fi, de asemenea, utilizate în scopuri de reglementare pentru a distinge substanțele corozive de cele necorozive (19) (20). Studiile post-validare realizate de producătorii modelului RhE în anii 2012-2014, cu un protocol îmbunătățit de corectare a interferențelor reducerii MTT nespecifice produse de substanțele chimice de testat, au îmbunătățit performanța atât a diferențierii C/NC, cât și a susținerii subclasificării substanțelor corozive (21) (22). Au fost efectuate alte analize statistice ale datelor post-validare generate cu EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE și EpiCS® pentru identificarea modelelor alternative de predicție care au îmbunătățit capacitatea predictivă pentru subclasificare (23).

([6]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

([7]) Abrevierea „RhE" (= epidermă umană reconstruită) este utilizată pentru toate modelele bazate pe tehnologia RhE. Acronimul RHE, astfel cum este utilizat în combinație cu modelul SkinEthic™, înseamnă același lucru dar, ca parte a denumirii comerciale a acestei metode de testare specifice, este scris integral cu majuscule.

5. Înainte să se poată utiliza în scopuri de reglementare o metodă de testare RhE *in vitro* similară sau modificată propusă pentru coroziunea cutanată, alta decât MRV-urile, ar trebui să se stabilească fiabilitatea, relevanța (precizia) și limitările acesteia pentru scopul propus al acesteia pentru a asigura similaritatea acesteia cu MRV-urile în conformitate cu cerințele standardelor de performanță (PS) (24) prevăzute în concordanță cu principiile din documentul de orientare nr. 34 al OCDE (25). Sistemul de acceptare reciprocă a datelor va fi garantat numai după revizuirea și includerea în orientarea aferentă privind testarea a oricăror metode de testare noi sau actualizate propuse în urma standardelor de performanță. Modelele de testare incluse în respectiva orientarea privind testarea pot fi utilizate pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor privind metoda de testare *in vitro* pentru coroziunea cutanată, în același timp beneficiind de acceptarea reciprocă a datelor.

DEFINIȚII

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Această metodă de testare permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive și corozive în conformitate cu GHS al ONU și cu Regulamentul CLP. Această metodă de testare susține, în continuare, subclasificarea substanțelor și amestecurilor corozive în subcategoria opțională 1A, în conformitate cu GHS al ONU (1), precum și o combinație între subcategoriile 1B și 1C (21) (22) (23). O limitare a acestei metode de testare o constituie faptul că nu permite diferențierea între subcategoria de substanțe corozive pentru piele 1B și subcategoria 1C în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP din cauza setului limitat de substanțe chimice corozive *in vivo* bine cunoscute din subcategoria 1C. Modelele de testare EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE și epiCS® pot stabili subcategorii (și anume, 1A față de 1B și 1C față de NC)

8. Se testează o gamă largă de substanțe chimice reprezentând, în principal, substanțe individuale în cadrul validării care susține modelele de testare incluse în prezenta metodă de testare, atunci când acestea sunt utilizate pentru identificarea substanțelor necorozive și a celor corozive; baza de date empirice a studiului de validare a ajuns să cuprindă 60 de substanțe chimice dintr-o gamă largă de clase de substanțe chimice (8) (9) (10). Testul pentru demonstrarea sensibilității, a specificității, a preciziei și a reproductibilității în laborator a testului pentru subclasificare a fost realizat de către dezvoltatorii metodei de testare și rezultatele au fost analizate de OCDE (21) (22) (23). Pe baza datelor generale disponibile, metoda de testare este aplicabilă pentru o gamă largă de clase de substanțe chimice și stări fizice, inclusiv lichide, semisolide, solide și ceruri. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind lipsa de aplicabilitate a modelelor de testare incluse în această metodă de testare la o anumită categorie de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui să fie utilizate pentru respectiva categorie de substanțe chimice de testat. În plus, se presupune că această metodă de testare este aplicabilă pentru amestecuri ca o extindere a aplicabilității sale la substanțe. Însă, datorită faptului că amestecurile acoperă un spectru larg de categorii și compoziții și că, în prezent, sunt disponibile doar informații limitate privind testarea amestecurilor, în cazurile în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la o categorie specifică de amestecuri [de exemplu, în urma unei strategii propuse la punctul (26)], metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie specifică de amestecuri. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul studiilor de validare (8) (9) (10). Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhE, actuala metodă de testare nu permite testarea produselor de acest tip.

9. Substanțele chimice de testat, care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT, și substanțele chimice de testat care pot să reducă direct colorantul MTT esențial (la formazan MTT) pot să interfereze cu măsurătorile de viabilitate tisulară și să necesite utilizarea unor martori adaptați pentru corecții. Tipul de martori adaptați care pot fi necesari vor varia în funcție de tipul de interferență produsă de substanța chimică de testat și de procedura utilizată pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctele 25-31).

10. Chiar dacă această metodă de testare nu furnizează informații adecvate privind iritația cutanată, ar trebui remarcat faptul că MT B.46 abordează în mod specific iritația cutanată *in vitro* ca efect asupra sănătății și se bazează pe același sistem de testare RhE, deși cu utilizarea unui alt protocol (5). Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (6). Această abordare IATA include efectuarea de teste *in vitro* pentru coroziunea cutanată (așa cum sunt descrise în prezenta metodă de testare) și pentru iritarea cutanată, înainte de a se lua în considerare testarea pe animale vii. Este recunoscut faptul că utilizarea de piele umană face obiectul considerațiilor etice și al condițiilor stabilite la nivel național și internațional.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Substanța chimică de testat se aplică local pe un model tridimensional de RhE compus din keratinocite netransformate derivate din epidermă umană care au fost cultivate pentru a forma un model multistratificat extrem de diferențiat de epidermă umană. Modelul este compus din straturi organizate (bazal, spinos și granular), precum și dintr-un strat cornos multistratificat care conține straturi lipidice lamelare intercelulare reprezentând principalele clase lipidice similare celor observate *in vivo*.

12. Metoda de testare RhE se bazează pe ipoteza că substanțele chimice corozive pot să penetreze stratul cornos prin difuziune sau eroziune și sunt citotoxice pentru celulele din straturile inferioare. Viabilitatea celulară se măsoară prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil; număr CAS 298-93-1] într-o sare de formazan de culoare albastră care este măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (27). Substanțele chimice corozive sunt identificate pe baza capacității acestora de a reduce viabilitatea celulară sub pragurile stabilite (a se vedea punctele 35 și 36). Metoda de testare RhE pentru coroziunea cutanată s-a dovedit a prezice efectele de coroziune cutanată *in vivo* evaluate la iepuri conform MT B.4 (2).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

13. Înainte de utilizarea sistematică a oricăruia dintre modelele de testare validate RhE care respectă prezenta metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice proprii prin clasificarea corectă a celor douăsprezece substanțe de verificare enumerate în tabelul 1. În cazul utilizării unei metode de subclasificare, ar trebui demonstrată, de asemenea, subclasificarea corectă. În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (24)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare ([1])

martor	NR CAS	Clasa chimică ([2])	Categ. conf. GHS al ONU/CLP pe baza rezultatelor *in vivo* ([3])	MRV Categ. bazată pe rezultate *in vitro* ([4])	MTT Reductor ([5])	Stare fizică
Subcategoria 1A de substanțe corozive *in vivo*						
Acid bromacetic	79-08-3	Acid organic	1A	(3) 1A	—	S
Trifluorură de bor, dihidrat	13319-75-0	Acid anorganic	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Clorură de dicloracetil	79-36-7	Electrofil	1A	(3) 1A	—	L
Combinație între subcategoriile de substanțe corozive 1B și 1C *in vivo*						
Monohidrat de acid glioxilic	563-96-2	Acid organic	1B-și-1C	(3) 1B-și-1C	—	S

martor	NR CAS	Clasa chimică ([2])	Categ. conf. GHS al ONU/CLP pe baza rezultatelor *in vivo* ([3])	MRV Categ. bazată pe rezultate *in vitro* ([4])	MTT Reductor ([5])	Stare fizică
Subcategoria 1A de substanțe corozive *in vivo*						
Acid lactic	598-82-3	Acid organic	1B-și-1C	(3) 1B-și-1C	—	L
Etanolamină	141-43-5	Bază organică	1B	(3) 1B-și-1C	Y	Vâscoasă
Acid hidrocloric (14,4 %)	7647-01-0	Acid anorganic	1B-și-1C	(3) 1B-și-1C	—	L
Substanțe necorozive *in vivo*						
Bromură de fenetil	103-63-9	Electrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Bază organică	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltio)-benzaldehidă	3446-89-7	Electrofil	NC	(3) NC	Y	L
Acid lauric	143-07-7	Acid organic	NC	(3) NC	—	S

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; MRV = Metodă de referință validată; NC = necoroziv; Y = da; S = solid; L = lichid

([1]) Substanțele de verificare, sortate mai întâi pe substanțe corozive/necorozive, apoi în subcategorii de substanțe corozive și apoi pe clase chimice, au fost selectate din substanțele utilizate în studiile de validare ECVAM pentru EpiSkin™ și EpiDerm™ (8) (9) (10) și din studiile de post-validare pe baza datelor furnizate de dezvoltatorii EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ și epiCS® (23). Cu excepția cazului în care se indică altfel, substanțele au fost testate la nivelul de puritate obținut atunci când au fost achiziționate dintr-o sursă comercială (8) (10). Selecția include, în măsura posibilității, substanțe care: (i) sunt reprezentative pentru gama de răspunsuri privind corozivitatea (de exemplu, substanțe necorozive; substanțe slab corozive și puternic corozive) pe care MRV-urile pot să le măsoare sau să le estimeze; (ii) sunt reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în studiile de validare; (iii) au structuri chimice bine definite; (iv) induc rezultate reproductibile în MRV; (v) induc rezultate definitive în metoda de testare de referință *in vivo*; (vi) sunt disponibile în comerț; și (vii) nu sunt asociate cu costuri de eliminare prohibitive.

([2]) Clasa de substanțe chimice stabilită de Barratt *et al.* (8).

([3]) Grupurile de ambalaje aferente conform ONU sunt I, II și, respectiv, III pentru 1A, 1B și 1C din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

([4]) Predicțiile MRV *in vitro* raportate în acest tabel au fost obținute utilizând modelele de testare EpiSkin™ și EpiDerm™ (MRV-uri) în timpul testului de post-validare realizat de către dezvoltatorii metodelor de testare.

([5]) Valorile de viabilitate obținute în cadrul studiilor de validare ECVAM pentru coroziunea cutanată nu au fost corectate pentru reducerea directă a MTT (martorii eutanasiați nu au fost analizați în cadrul studiilor de validare). Însă, datele post-validare generate de dezvoltatorii metodelor de testare, care sunt prezentate în acest tabel, au fost dobândite cu martori adaptați (23).

14. Ca parte a demonstrării performanței, se recomandă ca utilizatorul să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire astfel cum sunt specificate de producătorul modelului de RhE. Această etapă este în mod special importantă în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade de timp lungi. Odată ce o metodă de testare a fost stabilită cu succes, iar performanța acesteia în utilizare a fost demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în mod sistematic o metodă de testare, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

PROCEDURA

15. În continuare este prezentată o descriere generică a componentelor și a procedurilor modelelor de testare RhE pentru evaluarea coroziunii cutanate care fac obiectul prezentei metode de testare. Modelele RhE confirmate ca fiind valabile din punct de vedere științific pentru a fi utilizate în cadrul acestei metode de testare, și anume, modelele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE and epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), pot fi obținute din surse comerciale. Există proceduri standard de operare (PSO) pentru aceste patru modele RhE (34) (35) (36) (37), iar componentele principale ale acestora pentru metoda de testare sunt prezentate pe scurt în apendicele 2. Se recomandă să se consulte PSO relevantă la implementarea și utilizarea unuia dintre aceste modele în laborator. Testarea cu cele patru modele de testare RhE care fac obiectul prezentei metode de testare ar trebui să respecte următoarele condiții:

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE RHE

Condiții generale

16. Pentru reconstrucția epiteliului ar trebui utilizate keratinocite umane ne-transformate. Sub stratul cornos funcțional ar trebui să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile (stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos). Stratul cornos ar trebui să fie multistratificat și să prezinte profilul lipidic esențial pentru a constitui o barieră funcțională robustă care să reziste la penetrarea rapidă a substanțelor citotoxice de referință, de exemplu dodecilsulfatul de sodiu (SDS) sau Triton X-100. Bariera funcțională ar trebui demonstrată și poate fi evaluată fie prin stabilirea concentrației la care substanța chimică de referință reduce viabilitatea țesuturilor cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere, fie prin stabilirea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % (ET_{50}) la aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă (a se vedea punctul 18). Etanșeitatea modelului RhE ar trebui să prevină trecerea substanței dincolo de stratul cornos către țesutul viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelizare a expunerii pielii. Modelul RhE nu trebuie să fie contaminat cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.

Condiții funcționale

Viabilitate

17. Testul utilizat pentru cuantificarea viabilității tisulare este testul MTT (27). Celulele viabile ale structurii țesutului RhE reduc colorantul vital MTT într-un precipitat de formazan MTT de culoare albastră, care este apoi extras din țesut utilizând izopropanol (sau un solvent similar). DO a solventului de extracție trebuie să fie suficient de mică, și anume DO < 0,1. Formazanul MTT extras poate fi cuantificat folosind fie o măsurare standard a absorbanței (DO), fie o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (38). Utilizatorii modelului RhE ar trebui să se asigure că fiecare lot de model RhE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă. Producătorul/furnizorul modelului RhE ar trebui să stabilească un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru valorile DO ale martorului negativ. Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ pentru cele patru modele de testare RhE validate incluse în prezenta metodă de testare sunt date în tabelul 2. Un utilizator al spectrofotometriei HPLC/UPLC ar trebui să utilizeze intervalele DO ale martorului negativ din tabelul 2 ca și criteriu de acceptare pentru martorul negativ. Ar trebui documentat faptul că țesuturile tratate cu substanță martor negativă sunt stabile în cultură (prezintă măsurători DO similare) în perioada de expunere.

Tabelul 2

Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ pentru controlul calității lotului

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
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

Funcția de barieră

18. Stratul cornos și compoziția lipidică a acestuia ar trebui să fie suficiente pentru a rezista la penetrarea rapidă a anumitor substanțe chimice citotoxice de referință (de exemplu, SDS sau Triton X-100), astfel cum este estimat prin IC_{50} sau ET_{50} (tabelul 3). Funcția de barieră a fiecărui lot de model RhE utilizat ar trebui să fie demonstrată de către producătorul/furnizorul modelului RhE la momentul livrării țesuturilor la utilizatorul final (a se vedea punctul 21).

Morfologie

19. Ar trebui să fie efectuată examinarea histologică a modelului RhE, cu demonstrarea structurii de epidermă umană multi-stratificată care conține stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos și stratul cornos și prezintă un profil lipidic similar cu profilul lipidic al epidermei umane. Examinarea histologică a fiecărui lot de model RhE utilizat, care demonstrează o morfologie adecvată a țesuturilor, ar trebui să fie asigurată de către producătorul/furnizorul modelului RhE la momentul livrării țesuturilor la utilizatorul final (a se vedea punctul 21).

Reproductibilitate

20. Utilizatorii metodei de testare ar trebui să demonstreze reproductibilitatea metodelor de testare în timp cu martori pozitivi și negativi. În plus, metoda de testare ar trebui să fie utilizată numai în cazul în care producătorul/furnizorul modelului RhE furnizează date care demonstrează reproductibilitatea în timp cu substanțe chimice corozive și necorozive, de exemplu, din lista substanțelor de verificare (tabelul 1). În cazul utilizării unei metode de testare pentru subclasificare, ar trebui demonstrată, de asemenea, reproductibilitatea în raport cu subclasificarea.

Controlul calității (CC)

21. Modelul RhE ar trebui să fie utilizat doar dacă producătorul/furnizorul demonstrează că fiecare lot de modele RhE îndeplinește criteriile definite pentru introducere în procesul de fabricație, printre care cele mai importante sunt criteriile privind *viabilitatea* (punctul 17), *funcția de barieră* (punctul 18) și *morfologia* (punctul 19). Datele respective sunt furnizate utilizatorilor metodei de testare pentru ca aceștia să le poată include în raportul de testare. Numai rezultatele obținute pe baza unor loturi de țesuturi acceptate în urma CC pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a clasificării privind coroziunea. Producătorul/furnizorul modelului RhE stabilește un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru IC50 sau ET50. Intervalele de acceptabilitate pentru cele patru modele de teste validate sunt date în tabelul 3.

Tabelul 3

Criterii pentru controlul calității lotului

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiSkin™ (SM) (18 ore de tratament cu SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 ore	ET50 = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 ore	ET50 = 10,0 ore
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 ore	ET50 = 7,0 ore

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a celor martor

22. Pentru fiecare substanță chimică de testat și martori pentru fiecare expunere ar trebui să se utilizeze cel puțin două țesuturi duplicate. Atât în cazul substanțelor chimice lichide, cât și în cazul celor solide, ar trebui să se aplice o cantitate suficientă de substanță chimică de testat pentru a acoperi uniform suprafața epidermei, evitându-se totodată o doză infinită, și anume, ar trebui utilizată o cantitate minimă de 70 µl/cm^2 sau 30 mg/cm^2. În funcție de modele, suprafața epidermei ar trebui umezită cu apă deionizată sau distilată

înainte de aplicarea substanțelor chimice solide, pentru a îmbunătăți contactul dintre substanța chimică de testare și suprafața epidermei (34) (35) (36) (37). În măsura în care este posibil, substanțele solide ar trebui să fie testate sub formă de pulbere fină. Metoda de aplicare ar trebui să fie adecvată pentru substanța chimică de testat [a se vedea, de exemplu, referințele (34-37)]. La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat ar trebui spălată cu atenție de pe suprafața epidermei, utilizând o soluție-tampon apoasă sau NaCl de 0,9 %. În funcție de care dintre cele patru modele de testare RhE validate este utilizat, se folosesc două sau trei perioade de expunere pentru fiecare substanță chimică de testat (pentru toate cele patru modele RhE valabile: 3 min. și o oră; pentru EpiSkin™, un timp de expunere suplimentar de patru ore). În funcție de modelul de testare RhE utilizat și de perioada de expunere estimată, temperatura de incubare în timpul expunerii poate varia între temperatura camerei și 37 °C.

23. Pentru fiecare test ar trebui utilizați simultan martori negativi și pozitivi (MP) pentru a demonstra că viabilitatea (cu martori negativi), funcția de barieră și sensibilitatea rezultată a țesuturilor (cu MP) se încadrează în intervalul de valori istorice acceptabile stabilit. Substanțele chimice CP sugerate sunt acidul acetic glacial sau 8N KOH, în funcție de modelul RhE utilizat. Ar trebui remarcat faptul că 8N KOH este un reductor MTT direct care ar putea necesita martori adaptați, astfel cum este descris la punctele 25 și 26. Martorii negativi recomandați sunt 0,9 % (g/v) NaCl sau apă.

Măsurători ale viabilității celulare

24. Testul MTT, care este un test cantitativ, ar trebui să fie utilizat pentru măsurarea viabilității celulare în cadrul prezentei metode de testare (27). Mostra de țesut este introdusă într-o soluție de MTT având o concentrație adecvată (0,3 sau 1 mg/ml) timp de trei ore. Precipitatul de formazan albastru este apoi extras din țesut utilizând un solvent (de exemplu izopropanol, izopropanol acid) și concentrația de formazan se măsoară determinând DO la 570 nm folosind o bandă de filtrare de maximum ±30 nm, sau printr-o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (a se vedea punctele 30 și 31) (38).

25. Substanțele chimice de testat pot interfera cu testul MTT prin reducerea directă a MTT în formazan de culoare albastră și/sau prin interferența culorii în cazul în care substanța chimică de testat absoarbe, în mod natural sau datorită procedurilor de tratament, în aceeași gamă DO pentru formazan (570 ± 30 nm, în principal, substanțe chimice de culoare albastră și violetă). Ar trebui utilizați martori suplimentari pentru a detecta și a corecta o eventuală interferență a acestor substanțe chimice de testat, cum ar fi martorul nespecific pentru reducerea MTT (NSMTT) și martorul nespecific de culoare (NSC) (a se vedea punctele 26-30). Acest lucru este deosebit de important atunci când o anumită substanță chimică de testat nu este îndepărtată complet din țesut prin spălare sau atunci când aceasta pătrunde în epidermă și, prin urmare, există în țesuturi atunci când se efectuează testul de viabilitate MTT. O descriere detaliată a modului în care poate fi corectată direct reducerea MTT și interferențele cu ajutorul agenților de colorare este disponibilă în PSO pentru modelele de testare (34) (35) (36) (37).

26. Pentru identificarea reductorilor direcți ai MTT, ar trebui să se adauge fiecare substanță chimică de testat la un mediu de MTT proaspăt preparat (34) (35) (36) (37). Dacă amestecul cu MTT care conține substanța chimică de testat devine albastru/violet, se presupune că substanța chimică de testat reduce direct MTT și ar trebui să se efectueze o verificare funcțională suplimentară a epidermei neviabile, independent de utilizarea măsurării standard a absorbanței (DO) sau a unei proceduri HPLC/UPLC de spectrofotometrie. Această verificare funcțională suplimentară utilizează țesuturi moarte care au doar o activitate metabolică reziduală, dar care absorb substanța chimică de testat în cantități similare ca țesuturi viabile. Fiecare substanță chimică de reducere a MTT este aplicată pe cel puțin două duplicate de țesuturi moarte la un interval de expunere, acestea fiind supuse întregului test de coroziune cutanată. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind viabilitatea tisulară procentuală obținută pe țesuturi vii expuse la reductorul MTT minus procentul de reducere a MTT nespecific obținut pe țesuturi moarte expuse la același reductor MTT, calculat în raport cu efectuarea testului pe martorul negativ, concomitent cu testul corectat (% NSMTT).

27. Pentru a identifica o posibilă interferență cauzată de substanțele chimice de testat colorate sau substanțele chimice de testat care s-au colorat în contact cu apa sau cu izopropanolul și a decide dacă sunt necesare verificări suplimentare, ar trebui să se efectueze analiza spectrală a substanței chimice de testat în apă (mediu în timpul expunerii) și/sau izopropanol (soluție de extracție). În cazul în care substanța chimică de testat în apă și/sau izopropanol absoarbe lumina în intervalul de 570 ± 30 nm, ar trebui efectuate verificări suplimentare pe

colorant sau, în mod alternativ, ar trebui să se utilizeze o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC, iar în acest caz aceste verificări nu sunt necesare (a se vedea punctele 30 și 31). La măsurarea absorbanței standard (DO), fiecare substanță chimică de testat care interferează este aplicată pe cel puțin două duplicate de țesut viabile la un interval de expunere, acestea fiind supuse întregului test de coroziune cutanată, dar sunt incubate în mediu în locul soluției MTT în etapa de incubare a MTT pentru a genera un martor de o culoare nespecifică (NSC_{living}). Testul pe martorul NSC_{living} trebuie să fie efectuat concomitent în intervalul de expunere pentru fiecare substanță chimică de testat colorată (în cadrul fiecărui test), din cauza variabilității biologice inerente a țesuturilor vii. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în soluția cu MTT, minus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, testul fiind efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{living}).

28. Substanțele chimice de testat care sunt identificate ca producând atât o reducere directă a MTT (a se vedea punctul 26), cât și interferența culorii (a se vedea punctul 27) va necesita, de asemenea, un al treilea set de martori, în afară de NSMTT și martorii NSC_{living} descriși la punctele anterioare, la efectuarea măsurătorii standard a absorbanței (DO). Acest lucru se întâmplă, de obicei, în cazul substanțelor chimice de testat colorate în nuanțe închise care interferează cu testul MTT (de exemplu, albastru, violet, negru), deoarece culoarea lor intrinsecă împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce în mod direct MTT, astfel cum este descris la punctul 26. Aceste substanțe chimice de testat se pot prinde atât de țesuturile vii, cât și de cele moarte și, prin urmare, martorul NSMTT se poate corecta nu doar pentru o posibilă reducere directă a MTT prin substanța chimică de testat, ci și pentru interferența culorii ca urmare a aderării substanței chimice de testat la țesuturile moarte. Aceasta ar putea conduce la o dublă corecție pentru interferența culorii, întrucât martorul NSC_{living} corectează deja interferența culorii determinată de prinderea substanței chimice de testat de țesuturile vii. Pentru a evita o posibilă corecție dublă pentru interferența culorii, ar trebui efectuată o a treia verificare pentru culoarea nespecifică la țesuturile moarte (NSCkilled). În cadrul acestei verificări suplimentare, substanța chimică de testat se aplică pe cel puțin două țesuturi moarte duplicate în fiecare interval de expunere, care sunt supuse întregii proceduri de testare, dar sunt incubate în mediu în locul soluției de MTT în etapa de incubare a MTT. O singură verificare pentru martorul NSC_{killed} este suficientă pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste independente, dar ar trebui să fie efectuată concomitent cu verificarea pentru martorul NSMTT și, dacă este posibil, pe același lot de țesuturi. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat % NSMTT minus %NSC_{living}plus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi moarte expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, cu calculare raportat la testul pentru martor negativ efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{killed}).

29. Este important de precizat că reducerea valorii MTT nespecifice și interferențele culorii nespecifice pot crește valorile de citire ale extractului de țesut peste intervalul de liniaritate al spectrofotometrului. Pe această bază, fiecare laborator ar trebui să stabilească intervalul de liniaritate al spectrofotometrului lor pentru formazan MTT (CAS # 57360-69-7) dintr-o sursă comercială înainte de a iniția testarea substanțelor chimice de testat în scopuri de reglementare. În mod specific, măsurarea absorbanței standard (DO) cu ajutorul unui spectrofotometru este adecvată pentru evaluarea reductorilor direcți ai MTT și a substanțelor chimice care interferează cu culorile atunci când valorile DO ale extractelor de țesuturi, care sunt obținute cu substanța chimică de testat fără nicio corecție pentru reducerea directă a MTT și/sau interferența culorii, se află în intervalul liniar al spectrofotometrului sau atunci când procentul de viabilitate necorectat obținut cu substanța chimică de testat a fost deja definit ca fiind coroziv (a se vedea punctele 35 și 36). Totuși, rezultatele pentru substanțele chimice de testat care produc % NSMTT și/sau % NSC_{living} > 50 % din martorul negativ ar trebui să fie tratate cu precauție.

30. Pentru substanțele chimice de testat colorate care nu sunt compatibile cu măsurarea absorbanței standard (DO) din cauza unei interferențe prea puternice cu testul MTT, poate fi utilizată procedura de spectrofotometrie HPLC/UPLC alternativă pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctul 31) (37). Sistemul de spectrofotometrie HPLC/UPLC permite separarea formazanului MTT de substanța chimică de testat înainte de cuantificarea sa (38). Din acest motiv, martorii NSC_{living} sau NSC_{killed}, nu sunt niciodată necesari atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, independent de substanța chimică de testat. Martorii NSMTT ar trebui să fie totuși utilizați în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată a reduce în mod direct MTT sau are o culoare care împiedică evaluarea capacității de a reduce MTT în mod direct (conform descrierii de la punctul 26). Atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC pentru a măsura formazanul MTT, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf,

care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Pentru substanțele chimice de testat care pot reduce MTT în mod direct, viabilitatea tisulară reală se calculează ca procent de viabilitate tisulară obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat, minus % NSMTT. În cele din urmă, ar trebui remarcat faptul că reductorii direcți ai MTT, care pot interfera, de asemenea, cu culorile și care sunt reținuți în țesuturi după tratament și reduc MTT atât de mult încât conduc în mod semnificativ la valori ale DO (prin măsurarea standard a DO) sau la valori de vârf (folosind spectrofotometrul UPLC/HPLC) ale extractelor de țesuturi testate care nu se încadrează în intervalul de linearitate al spectrofotometrului, nu pot fi evaluați, deși se apariția acestora este preconizată doar în situații foarte rare.

31. Spectrofotometria HPLC/UPLC poate fi utilizată, de asemenea, pe toate tipurile de substanțe chimice de testat (colorate, necolorate, reductori ai MTT și nereductori ai MTT) pentru măsurarea formazanului MTT (38). Datorită diversității sistemelor de spectrofotometrie HPLC/UPLC, calificarea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC ar trebui să fie demonstrată înainte ca acesta să fie utilizat pentru a cuantifica formazanul MTT din extractele de țesuturi prin îndeplinirea criteriilor de acceptare pentru un set de parametri standard de calificare, pe baza celor descrise în orientarea U.S. Food and Drug Administration pentru industrie cu privire la validarea metodei bioanalitice (38) (39). Acești parametri-cheie și criteriile de acceptare aferente sunt prezentate în apendicele 4. Odată ce criteriile de acceptare definite în apendicele 4 au fost îndeplinite, sistemul de spectrofotometrie prin HPLC/UPLC este considerat a fi calificat și pregătit pentru a măsura formazanul MTT în condițiile experimentale descrise în prezenta metodă de testare.

Criterii de acceptabilitate

32. Pentru fiecare metodă de testare care aplică modele RhE valabile, țesuturile tratate cu martor negativ ar trebui să prezinte o valoare DO care să reflecte calitatea țesuturilor, așa cum este descris în tabelul 2, și nu ar trebui să fie sub limitele istorice stabilite. Țesuturile tratate cu MP, și anume, acidul acetic glacial sau 8N KOH, ar trebui să reflecte capacitatea țesuturilor de a reacționa la o substanță chimică corozivă în condițiile modelului de testare (a se vedea apendicele 2). Variabilitatea dintre țesuturile duplicate ale substanței chimice de testat și/sau ale substanțelor chimice martor ar trebui să se încadreze în limitele acceptate pentru fiecare cerință valabilă a modelului RhE (a se vedea apendicele 2) (de exemplu, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %). În cazul în care martorul negativ sau MP inclus într-un test nu se încadrează în intervalele acceptate, se consideră că testul nu este calificat și ar trebui să fie repetat. În cazul în care variabilitatea substanțelor chimice de testat se încadrează în afara intervalului definit, testul ar trebui să fie repetat.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

33. Valorile DO obținute pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui utilizate pentru a calcula un procent de viabilitate relativ la martorul negativ, care este stabilit la 100 %. În cazul în care se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Valorile procentuale-limită ale viabilității celulare care fac distincția între substanțele chimice de testat corozive și cele necorozive (sau care diferențiază diferite subcategorii de substanțe corozive) sunt definite mai jos, la punctele 35 și 36 pentru fiecare dintre modelele de testare vizate de prezenta metodă de testare și ar trebui să fie utilizate la interpretarea rezultatelor.

34. Un singur test compus din cel puțin două duplicate de țesuturi ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea aferentă este fără echivoc. Însă, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale duplicatelor, ar trebui avut în vedere un al doilea test, precum și un al treilea în cazul unor rezultate discordante între primele două teste.

35. Modelul predictiv pentru modelul de testare a coroziunii cutanate EpiSkin™ (9) (34) (22), asociat cu sistemul de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP, este prezentat în tabelul 4:

Tabelul 4

Modelul predictiv EpiSkin™

Viabilitatea măsurată după puncte ale intervalului de expunere (t = 3, 60 și 240 de minute)	Predicția avută în vedere
< 35 % după o expunere de trei minute	**Coroziv:** •Subcategoria 1A opțională (*)
≥ 35 % după o expunere de trei minute **ȘI** < 35 % după o expunere de 60 de minute **SAU** ≥ 35 % după o expunere de 60 de minute **ȘI** < 35 % după o expunere de 240 de minute	**Coroziv:** •O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale
≥ 35 % după o expunere de 240 de minute	**Necoroziv**

(*) Conform datelor generate în vederea evaluării utilității modelelor de testare RhE pentru susținerea clasificării în subcategorii, s-a arătat că aproximativ 22 % din rezultatele din subcategoria 1A ale modelului de testare EpiSkin™ pot fi, de fapt, considerate substanțe/amestecuri din subcategoria 1B sau 1C (și anume, supraclasificări) (a se vedea apendicele 3).

36. Modelele predictive pentru EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), modelele de testare a coroziunii cutanate SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) și epiCS® (16) (23) (37), care sunt asociate cu sistemul de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP, sunt indicate în tabelul 5:

Tabelul 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE și epiCS®

Viabilitatea măsurată după puncte ale intervalului de expunere (t = 3 și 60 de minute)	Predicția avută în vedere
ETAPA 1 pentru EpiDerm™ SCT, pentru SkinEthic™ RHE și epiCS®	
< 50 % după o expunere de trei minute	Coroziv
≥ 50 % după o expunere de trei minute **ȘI** < 15 % după o expunere de 60 de minute	Coroziv
≥ 50 % după o expunere de trei minute **ȘI** ≥ 15 % după o expunere de 60 de minute	Necoroziv
Etapa 2 pentru EpiDerm™ SCT - pentru substanțe/amestecuri identificate ca fiind corozive în etapa 1	
< 25 % după o expunere de trei minute	Subcategoria 1A opțională *

Viabilitatea măsurată după puncte ale intervalului de expunere (t = 3 și 60 de minute)	Predicția avută în vedere
ETAPA 1 pentru EpiDerm™ SCT, pentru SkinEthic™ RHE și epiCS®	
≥ 25 % după o expunere de trei minute	O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale
Etapa 2 pentru SkinEthic™ RHE - pentru substanțe/amestecuri identificate ca fiind corozive în etapa 1	
< 18 % după o expunere de trei minute	Subcategoria 1A opțională *
≥ 18 % după o expunere de trei minute	O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale
Etapa 2 pentru epiCS® - pentru substanțe/amestecuri identificate ca fiind corozive în etapa 1	
< 15 % după o expunere de trei minute	Subcategoria 1A opțională *
≥ 15 % după o expunere de trei minute	O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale

DATE ȘI RAPORTARE

Date

37. Pentru fiecare test, ar trebui consemnate în format tabelar datele obținute pentru fiecare țesut duplicat (de exemplu, valorile DO și datele procentuale privind viabilitatea celulară calculate pentru fiecare substanță chimică de testat, inclusiv clasificarea), inclusiv datele obținute în urma repetării experimentelor, dacă este cazul. În plus, ar trebui să se consemneze valorile medii și intervalele de viabilitate, precum și valorile VC dintre țesuturile duplicate pentru fiecare test. Interacțiunile observate cu reactivul MTT prin reductorii direcți MTT sau substanțele chimice de testat colorate ar trebui consemnate pentru fiecare substanță chimică testată.

Raportul testului

38. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat și substanțele chimice martor:

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Modelul și protocolul RhE utilizate, precum și justificarea acestora (dacă este cazul)

Condiții de testare:

— Modelul RhE utilizat (inclusiv numărul lotului);

— Informațiile privind calibrarea pentru dispozitivul de măsurare (de exemplu, spectrofotometru), lungimea de undă și filtrul de tip band pass (dacă este cazul) utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT, precum și intervalul de linearitate al dispozitivului de măsurare;

— Descrierea metodei utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT;

— Descrierea calificării sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC, dacă este cazul;

— informații de asistență complete privind modelul de RhE utilizat, inclusiv performanța acestuia. Aceasta trebuie să includă, printre altele:

i) viabilitatea;

ii) funcția de barieră;

iii) morfologia;

iv) reproductibilitatea și capacitatea de estimare;

v) controalele de calitate (CC) asupra modelului;

— Trimiteri la datele istorice ale modelului. Aceastea ar trebui să includă, printre altele acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul;

— demonstrarea competenței de desfășurare a metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor de verificare.

Procedura de testare:

— detalii privind procedura de testare utilizată (inclusiv procedurile de spălare utilizate după perioada de expunere);

— dozele de substanțe chimice de testat și de substanțe chimice martor utilizate;

— durata perioadei (perioadelor) de expunere și temperatura (temperaturile) expunerii;

— indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare, dacă este cazul;

— numărul de țesuturi duplicate utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (MP, martor negativ și NSMTT, NSC_{living} și NSC_{killed}, dacă este cazul), pe interval de expunere;

— descrierea criteriilor de decizie/a modelului predictiv aplicat pe baza modelului RhE utilizat;

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare (inclusiv procedurile de spălare).

Durata și criteriile de acceptare a testului:

— valorile medii ale martorilor pozitivi și negativi și intervale de acceptare pe baza datelor istorice;

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru martorii pozitivi și negativi;

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru substanța chimică de testat.

Rezultate:

— prezentarea tabelară a datelor pentru fiecare substanță chimică de testat și martor, pentru fiecare perioadă de expunere, fiecare test și fiecare măsurare duplicată care include valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, procentul de viabilitate tisulară, procentul mediu de viabilitate tisulară, diferențele între duplicate, valorile DS și/sau VC, dacă este cazul;

— dacă este cazul, rezultatele martorilor utilizați pentru reductorii direcți ai MTT și/sau substanțele chimice de colorare, inclusiv valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, diferențe între țesuturile duplicate, valorile DS și/sau VC (dacă este cazul), precum și procentul final corect de viabilitate tisulară;

— rezultatele obținute cu substanța (substanțele) chimică(e) de testat și substanțele chimice martor în legătură cu criteriile de acceptare ale verificării și testării specifice;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ONU (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS). A cincea ediție revizuită, ONU New York și Geneva. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(3) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*.

(4) Capitolul B.65 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin barieră cu membrană.

(5) Capitolul B.46 din prezenta anexă, Iritația cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită.

(6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. Publicația NIH nr. 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. Publicația NIH nr. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SUA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC10), 3 aprilie 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC14), 21 martie 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. și 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. și Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals Conform noii Orientări TG 431 a OCDE. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. și 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, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC25), 17 noiembrie 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, emisă de căte Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC30), 12 iunie 2009.

(21) OCDE (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 (nr. 190). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H. și 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. și 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) OCDE (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). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(25) OCDE (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, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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*. În: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M și Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. și 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 și 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. și 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 și 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 și Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (decembrie 2011). *INVITTOX* Protocol (nr. 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (februarie 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 (ianuarie 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (ianuarie 2012). Versiunea 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. și 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. (mai 2001). Publicație disponibilă la adresa: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Apendicele 1

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim «concordanță», pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (25).

Viabilitate celulară: Parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare, de exemplu, capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale celulare de a reduce colorantul vital MTT [bromură de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil], care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Concordanță: Este un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe" și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (25).

ET_{50}: Poate fi estimat prin calcularea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % odată cu aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă (a se vedea, de asemenea, IC_{50}).

GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (1).

HPLC: Cromatografie lichidă de înaltă performanță.

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare.

IC_{50}: Poate fi estimat prin determinarea concentrației la care o substanță chimică de referință reduce viabilitatea țesutului cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere (a se vedea, de asemenea, ET_{50}).

Doză infinită: Cantitate de substanță chimică de testat aplicată pe epidermă, care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epidermei.

Amestec:: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe, în care acestea nu intră în reacție.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

MTT:: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație > 10 % (g/g) și < 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NC: Necoroziv.

Martorul NSC_{killed}: Martor de culoare nespecifică la țesuturi moarte.

Martor NSC_{living}: Martor de culoare nespecifică la țesuturi vii.

NSMTT: Reducere nespecifică a MTT.

DO: Densitate optică

MP: Martor pozitiv, un duplicat care conține toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratat cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Standarde de performanță (SP): Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) niveluri similare de fiabilitate și acuratețe, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă ar trebui să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe chimice de referință (25).

Relevanță: Descrierea relației dintre metoda de testare și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care metoda de testare măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (25).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (25).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor negativ și un MP.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (25).

Coroziunea cutanată*in vivo*: Producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (25).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UPLC: Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Apendicele 2

COMPONENTELE PRINCIPALE ALE MODELELOR DE TESTARE RHE VALIDATE PENTRU TESTUL DE COROZIUNE CUTANATĂ

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Suprafața modelelor	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Numărul de țesuturi duplicate	Cel puțin 2 pe interval de expunere	2-3 pe interval de expunere	Cel puțin 2 pe interval de expunere	Cel puțin 2 pe interval de expunere
Doze de tratament și aplicare	Substanțe lichide și vâscoase: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Substanțe solide: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + soluție 100 µl ± 5µl NaCl (9 g/l) Substanțe ceroase/lipicioase: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) cu o plasă din nailon	Substanțe lichide: 50 µl (79,4 µl/cm^2) cu sau fără o plasă din nailon *Verificarea compatibilității substanței chimice de testat cu plasa de nailon înainte de testare* Substanțe semisolide: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Substanțe solide: 25 µl H_2O (sau mai mult, dacă este necesar) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Ceruri: o bucată circulară plată cu diametrul de aproximativ 8 mm, așezată pe țesutul înmuiat în 15 µl H_2O.	Substanțe lichide și vâscoase: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) folosind o plasă din nailon *Verificarea compatibilității substanței chimice de testat cu plasa de nailon înainte de testare* Substanțe solide: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Substanțe ceroase/lipicioase: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) folosind o plasă din nailon	Substanțe lichide: 50 µl (83,3 µl/cm^2) folosind o plasă din nailon *Verificarea compatibilității substanței chimice de testat cu plasa de nailon înainte de testare* Substanțe semisolide: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Substanțe solide: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (sau mai mult, dacă este necesar) Substanțe ceroase: o bucată plată în formă de fursec, având diametrul de aproximativ 8 mm, așezată pe țesutul înmuiat în 15 µl H_2O

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pre-verificare pentru reducția directă a MTT	50 µl (lichide) sau 20 mg (solide)+ 2 ml MTT soluție de 0,3 mg/ml pentru 180 ± 5 minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați în apă	50 µl (lichide) sau 25 mg (solide)+ 1 ml MTT soluție de 1 mg/ml pentru 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare	40 µl (lichide) sau 20 mg (solide)+ 1 ml MTT 1 mg/ml soluție pentru 180± 15 min la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare	50 µl (lichide) sau 25 mg (solide)+ 1 ml MTT soluție de 1 mg/ml pentru 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare
Pre-verificarea pentru interferența culorii	10 µl (lichid) sau 10 mg (solid) + 90 µl H_2O amestecat timp de 15 minute la temperatura camerei → în cazul în care soluția se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	50 µl (lichid) sau 25 mg (solid) + 300 µl H_2O timp de 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	40 µl (lichid) sau 20mg (solid) + 300 µl H_2O amestecat timp de 60 de minute la temperatura camerei → în cazul în care substanța chimică de testat se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	50 µl (lichid) sau 25 mg (solid) + 300 µl H_2O timp de 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați
Interval de expunere și temperatură	3 min., 60 min. (± 5 min.) și 240 min. (± 10 min.) În spațiu ventilat Temperatura camerei (TC, 18-28°C)	3 min. la TC și 60 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. la TC și 60 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. la TC și 60 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Clătire	25 ml 1 x PBS (2 ml/eliminare)	de 20 de ori sub jet slab și constant de 1 x PBS	de 20 de ori sub jet slab și constant de 1 x PBS	de 20 de ori sub jet slab și constant de 1 x PBS

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Martor negativ	50 µl de soluție NaCl (9 g/l) Testat la fiecare interval de expunere	50 µl H_2O Testat la fiecare interval de expunere	40 µl H_2O Testat la fiecare interval de expunere	50 µl H_2O Testat la fiecare interval de expunere
Martor pozitiv	50 µl de acid acetic glacial Testat doar pentru 4 ore	50 µl 8N KOH Testat la fiecare interval de expunere	40 µl 8N KOH Testat doar pentru 1 oră	50 µl 8N KOH Testat la fiecare interval de expunere
Soluția MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Timpul și temperatura incubației MTT	180 min. (± 15 min.) la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. (± 15 min.) la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Solvent de extracție	500 µl izopropanol acidifiat (0,04 N HCl în izopropanol) (țesut izolat scufundat complet)	2 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)	1,5 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)	2 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)
Timpul și temperatura de extracție	Peste noapte, la temperatura camerei (TC), ferit de lumină	Peste noapte, fără agitare, la temperatura camerei sau timp de 120 min. cu agitare (~ 120 rpm) la TC	Peste noapte, fără agitare, la temperatura camerei sau timp de 120 min. cu agitare (~ 120 rpm) la TC	Peste noapte, fără agitare, la temperatura camerei sau timp de 120 min. cu agitare (~ 120 rpm) la TC

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Citirea DO	570 nm (545 - 595 nm) fără filtru de referință	570 nm (sau 540 nm) fără filtru de referință	570 nm (540 - 600 nm) fără filtru de referință	540 - 570 nm fără filtru de referință
Controlul calității țesutului	18 ore de tratament cu SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Tratament cu 1 % Triton X-100 4,08 ore ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ore	Tratament cu 1 % Triton X-100 4,0 ore ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ore	Tratament cu 1 % Triton X-100 2,0 ore ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ore
Criterii de acceptabilitate	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (NaCl) ar trebui să fie ≥ 0,6 și ≤ 1,5 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de 4 ore cu martorul pozitiv (acid acetic glacial), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie ≤ 20 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 % și pentru valori DO ≥ 0,3, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %.	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (H_2O) ar trebui să fie ≥ 0,8 și ≤ 2,8 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de o oră cu martorul pozitiv (8N KOH), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 15 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 %, coeficientul de variație (CV) între țesuturile duplicate ar trebui să fie de ≤ 30 %.	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (H_2O) ar trebui să fie ≥ 0,8 și ≤ 3,0 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de o oră (și patru ore, dacă este cazul) cu martorul pozitiv (8N KOH), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 15 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 % și pentru valori DO ≥ 0,3, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (H_2O) ar trebui să fie ≥ 0,8 și ≤ 2,8 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de o oră cu martorul pozitiv (8N KOH), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 20 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 % și pentru valori DO ≥ 0,3, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %

Apendicele 3

PERFORMANȚA MODELELOR DE TESTARE PENTRU SUBCLASIFICARE

Tabelul de mai jos prezintă performanțele celor patru modele de testare calculate pe baza unui set de 80 de substanțe chimice testate de către cei patru dezvoltatori de teste. Calculele au fost efectuate de către Secretariatul OCDE, revizuite și convenite de un subgrup de experți (21) (23).

Modelele de testare EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ și epiCS® pot stabili subcategorii (și anume, 1A față de 1B și 1C față de NC)

Performanțele, ratele de supraclasificare, ratele de subclasificare și precizia (capacitatea predictivă) a celor patru modele de testare bazate pe un set de 80 de substanțe chimice testate toate în cadrul a două sau trei teste pentru fiecare model de testare:

STATISTICI PRIVIND PREVIZIUNILE OBȚINUTE PENTRU ÎNTREGUL SET DE SUBSTANȚE CHIMICE

(n = 80 de substanțe chimice testate în cadrul a două serii independente pentru epiCS ® sau a trei serii independente pentru EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ și SkinEthic™, și anume, 159 (*) sau, respectiv, 240 de clasificări)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Supraclasificări:				
1B și 1C supraclasificate 1A	21,50 %	29,0%	31,2%	32,8%
MN supraclasificat 1B și 1C	20,7%	23,4%	27,0 %	28,4 %
MN supraclasificat 1A	0,00%	2,7%	0,0 %	0,00%
Corecție de supraclasificare	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Rata globală de supraclasificare (toate categoriile)	17,9%	23,3%	24,5%	25,8%
Subclasificări:				
1A supraclasificat 1B și 1C	16,7%	16,7 %	16,7%	12,5 %
1A subclasificate MN	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B și 1C supraclasificate MN	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Rata globală de subclasificare (toate categoriile)	3,3%	2,5%	5,4%	4,4%
Clasificări corecte:				
1A clasificate în mod corect	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
1B și 1C clasificate în mod corect	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
MN clasificat în mod corect	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Precizie totală	78,8%	74,2%	70%	69,8%

MN: Necoroziv

(*) o substanță chimică a fost testată o singură dată cu epiSC® datorită indisponibilității (23)

Apendicele 4

Parametrii cheie și criteriile de acceptare pentru calificarea unui sistem de spectrometrie HPLC/UPLC pentru măsurarea formazanului MTT extras din țesutul RhE

Parametru	Protocol derivat din Orientarea FDA (37) (38)	Criterii de acceptare
Selectivitate	Analiza izopropanolului, probă vie (extras de izopropanol din țesuturi RhE vii fără tratament), probă moartă (extras de izopropanol din țesuturile RhE moarte fără tratament)	$Zonă_{interferență} \leq 20\ \%$ din $Zona_{LLOQ}$ [1]
Precizie	Controale ale calității (și anume, formazan MTT la 1,6 µg/ml, 16 µg/ml și 160 µg/ml) în izopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Precizie	Controlul calității la izopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Efectul de matrice	Controlul calității la proba vie (n = 5)	85 % ≤ efectul de matrice % ≤ 115 %
Reportare	Analiza izopropanolului conform unui standard $ULOQ^2$ [2]	$Zona_{interferență} \leq 20\ \%$ din $Zona_{LLOQ}$
Reproductibilitate (în aceeași zi)	3 curbe de calibrare independente (pe baza a 6 diluții 1/3 consecutive de formazan MTT în izopropanol începând de la valoarea ULOQ, și anume, 200 µg/ml); Controlul calității la izopropanol (n = 5)	Curbe de calibrare: % Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ Controale ale calității: % Dev ≤ 15 % și CV ≤ 15 %
Reproductibilitate (între zile diferite)	Ziua 1: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 2: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 3: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3)	
Stabilitate pe termen scurt a formazanului MTT în extractul de țesut RhE	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după 24 de ore de la stocare la temperatura camerei	% Dev ≤ 15 %
Stabilitate pe termen lung a formazanului MTT în extractul de țesut RhE, dacă este necesar	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după mai multe zile de la stocare la o temperatură specifică (de exemplu, 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: Limita inferioară de cuantificare, definită ca acoperind 1-2 % din viabilitatea tisulară, și anume, 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: Limita superioară de cuantificare, definită a fi de cel puțin două ori mai mare decât cea mai mare concentrație prevăzută de formazan MTT în extracte de izopropanol din martori negativi, și anume 200 µg/ml.

(7) În partea B, capitolul B.46 se înlocuiește cu următorul text:

„B.46 **IRITAȚIA CUTANATĂ *IN VITRO*: METODĂ DE TESTARE PE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 439 (2015). Iritația cutanată înseamnă producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de patru ore [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare asigură o procedură *in vitro* care poate fi folosită pentru identificarea riscurilor asociate substanțelor chimice iritante (substanțe și amestecuri) în conformitate cu GHS al ONU/categoria 2 prevăzută în Regulamentul CLP (2). În regiunile care nu adoptă categoria 3 opțională (substanțe ușor iritante) prevăzută în GHS al ONU, această metodă de testare poate fi utilizată, de asemenea, pentru identificarea substanțelor chimice neclasificate. Prin urmare, în funcție de cadrul de reglementare și de sistemul de clasificare utilizat, prezenta metodă de testare poate fi utilizată pentru a determina caracterul iritant pentru piele al substanțelor chimice fie ca un test independent de substituire pentru testarea iritației cutanate *in vivo*, fie ca test de substituire parțială în cadrul unei strategii de testare (3).

2. Evaluarea iritației cutanate a implicat, de regulă, utilizarea animalelor de laborator (MT B.4, echivalentă cu Orientarea nr. 404 a OCDE adoptată inițial în 1981 și revizuită în 1992, 2002 și 2015) (4). Pentru testarea corozivității, trei metode de testare *in vitro* validate au fost adoptate ca MT B.40 UE (echivalentul Orientării TG nr. 430 a OCDE), MT B.40bis (echivalentul Orientării TG nr. 431 a OCDE) și MT B.65 (echivalentul Orientării TG nr. 435 a OCDE) (5) (6) (7). Un document de orientare privind strategiile integrate de testare și evaluare al OCDE (Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru coroziunea și iritația cutanată descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și oferă îndrumări cu privire la (i) modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanate și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (3).

3. Prezenta metodă de testare abordează iritația cutanată având drept punct final sănătatea umană. Aceasta se bazează pe sistemul de testare *in vitro* a epidermei umane reconstruite (RhE), care prezintă proprietăți biochimice și fiziologice similare proprietăților părților superioare ale pielii umane, și anume epiderma. Sistemul de testare pe RhE utilizează keratinocite de origine umană netransformate ca sursă celulară pentru a reconstitui un model de epidermă cu histologie și citoarhitectură reprezentativă. Există standarde de performanță (SP) pentru a facilita validarea și evaluarea metodelor de testare bazate pe RhE similare și modificate, în conformitate cu principiile documentului de orientare nr. 34 al OCDE (8) (9). Orientarea corespunzătoare privind testarea a fost inițial adoptată în 2010, actualizată în 2013 pentru a include metode RhE suplimentare și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA și a introduce utilizarea unei proceduri alternative pentru măsurarea viabilității.

4. Au fost realizate studii de prevalidare, optimizare și validare pentru patru modele de testare *in vitro* disponibile în comerț (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) pe baza sistemului de testare pe RhE (sensibilitate de 80 %, specificitate de 70 % și precizie de 75 %). Aceste patru modele de testare sunt incluse în prezenta metodă de testare și sunt prezentate în apendicele 2, care oferă, de asemenea, informații cu privire la tipul de studiu de validare folosit pentru validarea metodelor de testare respective. Astfel cum s-a menționat în apendicele 2, metoda de referință validată (MRV) a fost utilizată pentru a dezvolta prezenta metodă de testare și standardele de performanță (8).

5. Sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE va fi garantat numai pentru modelele de testare validate în conformitate cu standardele de performanță (8), în cazul în care aceste modele de testare au fost revizuite și adoptate de OCDE. Modelele de testare incluse în prezenta metodă de testare și în orientarea privind testarea a OCDE pot fi utilizate în mod nediscriminatoriu pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor din metodele de testare *in vitro* pentru iritația cutanată, în același timp beneficiind de acceptarea reciprocă a datelor.

6. În apendicele 1 sunt prezentate definițiile termenilor utilizați în prezentul document.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

7. Una dintre limitările metodei de testare, astfel cum a fost demonstrată prin studiul prospectiv complet de validare care evaluează și caracterizează metodele de testare pe RhE (16), este aceea că aceasta nu permite clasificarea substanțelor chimice în categoria 3 opțională (substanțe ușor iritante) din GHS al ONU (1). Astfel, cadrul de reglementare din statele membre va decide modul în care va fi utilizată această metodă de testare. Pentru UE, categoria 3 nu a fost preluată în Regulamentul CLP. Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (3). Este recunoscut faptul că utilizarea de piele umană face obiectul considerațiilor etice și al condițiilor stabilite la nivel național și internațional.

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

8. Prezenta metodă de testare abordează iritația cutanată având drept punct final sănătatea umană. Chiar dacă această metodă de testare nu furnizează informații adecvate privind coroziunea cutanată, ar trebui remarcat faptul că capitolul B.40bis (orientarea OCDE privind testarea nr. 431) privind coroziunea cutanată din MT se bazează pe același sistem de testare RhE, dar se utilizează un alt protocol (6). Prezenta metodă de testare se bazează pe modele RhE care utilizează keratinocite umane care reprezintă așadar *in vitro* organul țintă al speciei studiate. În plus, aceasta acoperă direct etapa inițială a cascadei inflamatorii/mecanismului de acțiune (leziuni celulare și ale țesuturilor cauzând un traumatism localizat) care apare în timpul iritației *in vivo*. În cadrul procesului de validare a acestei metode de testare a fost testată o gamă largă de substanțe chimice, iar baza de date empirice a studiului de validare a ajuns să cuprindă în total 58 de substanțe chimice (16) (18) (23). Metoda de testare este aplicabilă substanțelor solide, lichide, semi-solide și cerurilor. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul unui studiu de validare (29). Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhE, actuala metodă de testare nu permite testarea produselor de acest tip.

9. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Însă, datorită faptului că amestecurile acoperă un spectru larg de categorii și compoziții și că, în prezent, sunt disponibile doar informații limitate privind testarea amestecurilor, în cazurile în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la o categorie specifică de amestecuri [de exemplu, în urma unei strategii propuse de Eskes *et al.*, 2012 (30)], metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie specifică de amestecuri. Ar trebui să se aplice un tratament similar în cazul în care se constată că clasele chimice specifice sau proprietățile fizico-chimice nu sunt aplicabile pentru actuala metodă de testare.

10. Substanțele chimice de testat, care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT, și substanțele chimice de testat care pot să reducă direct colorantul MTT esențial (la formazan MTT) pot să interfereze cu măsurătorile de viabilitate celulară și să necesite utilizarea unor martori adaptați pentru corecții (a se vedea punctele 28-34).

11. Un singur test compus din trei țesuturi duplicate ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea este fără echivoc. În schimb, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale duplicatelor și/sau un procent mediu al viabilității egal cu 50 ± 5 %, ar trebui avut în vedere un al doilea test, precum și un al treilea test în cazul unor rezultate discordante între primele două teste.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. Substanța chimică de testat se aplică local pe un model tridimensional de RhE compus din keratinocite netransformate derivate din epidermă umană care au fost cultivate pentru a forma un model multistratificat extrem de diferențiat de epidermă umană. Modelul este compus din straturi organizate (bazal, spinos și granular), precum și dintr-un strat cornos (stratum corneum) multistratificat care conține straturi lipidice lamelare intercelulare reprezentând principalele clase lipidice similare celor observate *in vivo*.

13. Iritația cutanată indusă de substanța chimică, manifestată, în principal, prin eritem și edem, este rezultatul unei cascade de evenimente care încep cu pătrunderea substanțelor chimice prin stratul cornos, unde acestea ar putea afecta straturile subiacente de keratinocite și alte celule din piele. Celulele deteriorate fie pot elibera mediatori inflamatori, fie pot induce o cascadă inflamatorie care acționează, de asemenea, asupra celulelor din dermă, în special asupra celulelor stromale și endoteliale din vasele de sânge. Dilatarea și permeabilitatea crescută a celulelor endoteliale sunt cele care produc eritemele și edemele observate (29). În special, metodele de testare bazate pe RhE, în absența vascularizării în sistemul de testare *in vitro*, măsoară evenimentele inițiatoare în cascadă, de exemplu lezarea celulei/țesutului (16) (17), folosind viabilitatea celulară drept citire.

14. Viabilitatea celulară la modelele RhE se măsoară prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil; număr CAS 298-93-1] într-o sare de formazan de culoare albastră care este măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (31). Substanțele chimice iritante sunt identificate pe baza capacității acestora de a reduce viabilitatea celulară sub pragurile stabilite (și anume ≤ 50 % pentru substanțele din categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP). În funcție de cadrul de reglementare și aplicabilitatea metodei de testare, substanțele chimice pentru care viabilitatea celulară este superioară nivelului stabilit pot fi considerate non-iritante (și anume, > 50 %, nicio categorie).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

15. Înainte de utilizarea sistematică a oricăruia dintre modelele de testare validate care respectă prezenta metodă de testare (apendicele 2), laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice proprii prin utilizarea celor zece substanțe de verificare enumerate în tabelul 1. În situațiile în care, spre exemplu, o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (8)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1. Utilizarea unei substanțe de verificare alternative ar trebui să fie justificată.
16. În cadrul verificării performanței, se recomandă ca utilizatorii să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire, astfel cum sunt specificate de către producătorul modelului de RhE. Această etapă este în mod special importantă în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade de timp lungi. Odată ce o metodă de testare a fost stabilită cu succes, iar performanța acesteia în utilizare a fost dobândită și demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în mod sistematic o metodă de testare, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

Tabelul 1

Substanțe de verificare ([1])

martor	Nr. CAS	Punctaj *in vivo* ([16])	Stare fizică	Categoria din GHS al ONU
SUBSTANȚELE NECLASIFICATE (neîncadrate în GHS al ONU)				
Acid naftilacetic	86-87-3	0	Solid	Neîncadrat
izopropanol	67-63-0	0,3	Lichid	Neîncadrat
stearat de metil	112-61-8	1	Solid	Neîncadrat
butirat de heptil	5870-93-9	1,7	Lichid	Neîncadrat (*Cat. opțională 3*) ([17])
salicilat de hexil	6259-76-3	2	Lichid	Neîncadrat (*Cat. opțională 3*) ([17])
SUBSTANȚE CLASIFICATE (categoria 2 din GHS al ONU)				
ciclamenaldehidă	103-95-7	2,3	Lichid	Cat. 2
1-bromohexan	111-25-1	2,7	Lichid	Cat. 2
hidroxid de potasiu (5 % apă)	1310-58-3	3	Lichid	Cat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazină	5271-27-2	3,3	Solid	Cat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Lichid	Cat. 2

([1]) Substanțele de verificare constituie un subset de substanțe utilizate în studiul de validare, iar selecția se bazează pe următoarele criterii; (i) substanțele chimice sunt disponibile în comerț; (ii) sunt reprezentative pentru întreaga gamă de scoruri Draize de evaluare a efectelor iritante (de la substanțe neiritante până la substanțe puternic iritante); (iii) au o structură chimică bine definită; (iv) sunt reprezentative pentru funcționalitatea chimică utilizată în procesul de validare; (v) au furnizat rezultate reproductibile *in vitro* în cadrul mai multor teste și în mai multe laboratoare; (vi) au fost corect anticipate *in vitro* și (vii) nu sunt asociate unui profil extrem de toxic (de exemplu, cancerigen sau toxic pentru sistemul de reproducere) și nu sunt asociate unor costuri de eliminare prohibitive.

([16]) Punctarea *in vivo* în conformitate cu MT B.4 (4).

([17]) În cadrul acestei metode de testare, categoria 3 opțională (substanțe ușor iritante) din GSH al ONU (1) este considerată a fi „Nicio categorie”.

PROCEDURA

17. În continuare este prezentată o descriere a componentelor și a procedurilor metodei de testare bazate pe RhE pentru evaluarea iritației cutanate (a se vedea, de asemenea, apendicele 3 pentru parametrii referitori la fiecare model de testare). Sunt disponibile proceduri standard de operare (PSO) pentru cele patru modele care respectă această metodă de testare (32) (33) (34) (35).

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE PE RHE

Condiții generale

18. Pentru reconstrucția epiteliului ar trebui utilizate keratinocite umane ne-transformate. Sub stratul cornos funcțional ar trebui să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile (stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos). Stratul cornos ar trebui să fie multistratificat și să prezinte profilul lipidic esențial pentru a constitui o barieră funcțională robustă care să reziste la penetrarea rapidă a substanțelor chimice citotoxice de referință, de exemplu dodecilsulfatul de sodiu (SDS) sau Triton X-100. Bariera funcțională ar trebui demonstrată și poate fi evaluată fie prin stabilirea concentrației la care substanța chimică de referință reduce viabilitatea țesuturilor cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere, fie prin stabilirea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % (ET_{50}) la aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă. Etanșeitatea modelului RhE ar trebui să prevină trecerea substanței dincolo de stratul cornos către țesutul viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelizare a expunerii pielii. Modelul RhE nu trebuie să fie contaminat cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.

Condiții funcționale

Viabilitate

19. Testul utilizat pentru cuantificarea viabilității este testul MTT (31). Celulele viabile ale structurii țesutului RhE pot reduce colorantul vital MTT într-un precipitat de formazan MTT de culoare albastră, care este apoi extras din țesut utilizând izopropanol (sau un solvent similar). Densitatea optică (DO) doar a solventului de extracție ar trebui să fie suficient de mică, și anume, DO < 0,1. Formazanul MTT extras poate fi cuantificat folosind fie o măsurare standard a absorbanței (DO), fie o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (36). Utilizatorii modelului RhE ar trebui să se asigure că fiecare lot de model RhE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă. Producătorul/furnizorul modelului RhE stabilește un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru valorile DO ale martorului negativ (în condițiile metodei de testare pentru iritația cutanată). Intervalele de acceptabilitate pentru cele patru modele RhE validate incluse în prezenta metodă de testare sunt date în tabelul 2. Un utilizator al spectrofotometriei HPLC/UPLC ar trebui să utilizeze intervalele DO ale martorului negativ din tabelul 2 ca și criteriu de acceptare pentru martorul negativ. Ar trebui documentat faptul că țesuturile tratate cu substanță martor negativă sunt stabile în cultură (prezintă măsurători similare ale viabilității) în perioada de expunere prin testare.

Tabelul 2

Intervale de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorilor negativi pentru modelele de testare incluse în prezenta MT

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
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

Funcția de barieră

20. Stratul cornos și compoziția lipidică a acestuia ar trebui să fie suficiente pentru a rezista la penetrarea rapidă a substanțelor chimice citotoxice de referință (de exemplu, SDS sau Triton X-100), astfel cum este estimat prin IC_{50} sau ET_{50} (tabelul 3).

Morfologie

21. Ar trebui să se prezinte examinarea histologică a modelului RhE prin demonstrarea unei structuri similare celei a epidermei umane (inclusiv stratul cornos multistratificat).

Reproductibilitate

22. Rezultatele martorilor pozitivi și negativi ai metodei de testare ar trebui să demonstreze reproductibilitatea în timp.

Controlul calității (CC)

23. Modelul RhE ar trebui să fie utilizat doar dacă producătorul/furnizorul demonstrează că fiecare lot de modele RhE îndeplinește criteriile definite pentru introducere în procesul de fabricație, printre care cele mai importante sunt criteriile privind *viabilitatea* (punctul 19), *funcția de barieră* (punctul 20) și *morfologia* (punctul 21). Datele respective ar trebui să fie furnizate utilizatorilor metodei de testare pentru ca aceștia să le poată include în raportul de testare. Producătorul/furnizorul modelului RhE ar trebui să stabilească un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru IC_{50} sau ET_{50}. Numai rezultatele obținute pe baza unor țesuturi calificate pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a clasificării substanțelor iritante. Intervalele de acceptabilitate pentru cele patru modele de testare incluse în prezenta metodă de testare sunt indicate în tabelul 3.

Tabelul 3

Criterii privind controlul calității lotului pentru modelele de testare incluse în prezenta MT

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiSkin™ (SM) (18 ore de tratament cu 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 ore	ET_{50} = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 10,0 ore
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 ore de tratament cu SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a celor martor

24. Ar trebui să fie utilizate cel puțin trei duplicate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru martorii din cadrul fiecărui test. Atât în cazul substanțelor chimice lichide, cât și în cazul celor solide, ar trebui să se aplice o cantitate suficientă de substanță chimică de testat pentru a acoperi uniform suprafața epidermei, evitându-se totodată o doză infinită, și anume, cu valori între 26 și 83 µl/cm^2 sau mg/cm^2 (a se vedea apendicele 3). În cazul substanțelor chimice solide, suprafața epidermei ar trebui să fie umezită cu apă deionizată sau distilată înainte de aplicare, pentru a îmbunătăți contactul dintre substanța chimică de testat și suprafața epidermei. În măsura în care este posibil, substanțele solide ar trebui să fie testate sub formă de pulbere fină. Ar putea fi utilizată o plasă de nailon ca și mijloc de dispersie în unele cazuri (a se vedea apendicele 3). La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat ar trebui să fie spălată cu atenție de pe suprafața epidermei, utilizând o soluție-tampon apoasă sau NaCl de 0,9 %. În funcție de modelele de testare pe RhE utilizate, perioada de expunere, perioada de expunere poate varia între 15 și 60 de minute, iar temperatura de incubare între 20 și 37 °C. Aceste perioade de expunere și temperaturi sunt optimizate pentru fiecare metodă de testare pe RhE și reprezintă diferitele proprietăți intrinseci ale modelelor de testare (de exemplu, funcția de barieră) (a se vedea apendicele 3).

25. În cadrul fiecărui test ar trebui să se utilizeze concomitent un martor negativ (MN) și un martor pozitiv (MP) pentru a demonstra că viabilitatea (folosind MN), funcția de barieră și sensibilitatea rezultată a țesuturilor (folosind MP) se încadrează în intervalul de valori istorice acceptabile stabilit. Substanța MP sugerată este soluția apoasă de SDS de 5 %. Substanțele MN sugerate sunt apă sau soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

Măsurători ale viabilității celulare

26. Conform procedurii de testare, este esențial ca viabilitatea să nu fie măsurată imediat după expunerea la substanța chimică de testat, ci după o perioadă de incubare post-tratament suficient de lungă a țesuturilor clătite în mediu proaspăt. Această perioadă permite atât recuperarea în urma unor efecte citotoxice ușoare, cât și manifestarea efectelor citotoxice clare. O perioadă de incubare post-tratament de 42 de ore a fost considerată ca fiind optimă în timpul optimizării testului pentru două dintre modelele de testare bazate pe RhE care stau la baza prezentei metode de testare (11) (12) (13) (14) (15).
27. Testul MTT este o metodă cantitativă standardizată care ar trebui să fie utilizată pentru măsurarea viabilității celulare în cadrul prezentei metode de testare. Acesta este compatibil cu o arhitectură tridimensională a țesutului. Eșantionul de țesut este introdus în soluția MTT având o concentrație adecvată (de exemplu, 0,3-1 mg/mL) timp de 3 ore. Soluția MTT este transformată în formazan albastru de celulele viabile. Precipitatul de formazan albastru este apoi extras din țesut utilizând un solvent (de exemplu izopropanol, izopropanol acid) și concentrația de formazan se măsoară determinând DO la 570 nm folosind o bandă de filtrare de maximum ±30 nm, sau printr-o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (a se vedea punctul 34) (36).
28. Proprietățile optice ale substanței chimice de testat sau acțiunea sa chimică asupra MTT (de exemplu, substanțele chimice pot împiedica sau inversa producerea culorii și, de asemenea, pot să cauzeze producerea acesteia) pot influența testul, determinând o falsă estimare a viabilității. Acest lucru se poate întâmpla atunci când o anumită substanță chimică de testat nu este eliminată complet de pe piele prin clătire sau atunci când aceasta pătrunde în epidermă. Dacă o substanță chimică de testat acționează direct asupra MTT (de exemplu, un reductor al MTT), este colorată în mod natural sau se colorează în timpul tratării țesutului, ar trebui utilizați martori suplimentari pentru a detecta și a corecta interferența substanței chimice de testat prin tehnica de măsurare a viabilității (a se vedea punctele 29 și 33). O descriere detaliată a modului de corectare a reducerii directe a MTT și a interferențelor agenților de colorare este disponibilă în PSO pentru cele patru metode validate incluse în prezenta metodă de testare (32) (33) (34) (35).
29. Pentru identificarea reductorilor direcți ai MTT, ar trebui să se adauge fiecare substanță chimică de testat la o soluție de MTT proaspăt preparată. Dacă amestecul cu MTT care conține substanța chimică de testat devine albastru/violet, se presupune că substanța chimică de testat reduce direct MTT și ar trebui să se efectueze o verificare funcțională suplimentară a țesuturilor RhE neviabile, independent de utilizarea măsurării standard a absorbanței (DO) sau a unei proceduri HPLC/UPLC de spectrofotometrie. Această verificare funcțională suplimentară utilizează țesuturi moarte care au doar o activitate metabolică reziduală, dar care absorb substanța chimică de testat în mod similar țesuturilor viabile. Fiecare substanță chimică de testat care reduce MTT se aplică pe cel puțin două țesuturi moarte duplicate care sunt supuse întregii proceduri de testare pentru a genera o reducere nespecifică a MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Un singur martor NSMTT este suficient pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste/serii de teste independente efectuate. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind viabilitatea tisulară procentuală obținută pe țesuturi vii expuse la reductorul MTT minus procentul de reducere a MTT nespecific obținut pe țesuturi moarte expuse la același reductor MTT, calculat în raport cu efectuarea testului pe martorul negativ, concomitent cu testul corectat (% NSMTT).
30. Pentru a identifica o posibilă interferență cauzată de substanțele chimice de testat colorate sau substanțele chimice de testat care s-au colorat în contact cu apa sau cu izopropanolul și a decide dacă sunt necesare verificări suplimentare, ar trebui să se efectueze analiza spectrală a substanței chimice de testat în apă (mediu în timpul expunerii) și/sau izopropanol (soluție de extracție). În cazul în care substanța chimică de testat din apă și/sau izopropanol absoarbe lumina în intervalul de 570 ± 30 nm, ar trebui realizați martori coloranți suplimentari sau, în mod alternativ, ar trebui utilizată o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC, iar în acest caz nu sunt necesari astfel de martori (a se vedea punctele 33 și 34). La măsurarea absorbanței standard (DO), fiecare substanță chimică de testat colorată care interferează este aplicată pe cel puțin două replicate de țesut viabile, acestea fiind supuse întregii proceduri de testare, dar sunt incubate într-un mediu în locul soluției MTT în etapa de incubare a MTT pentru a genera un martor de o culoare nespecifică (NSC_{living}). Testul pentru martorul NSC_{living} trebuie efectuat concomitent cu testul substanței chimice de testat colorate și, în cazul testării multiple, trebuie efectuat un test pentru un martor independent NSC_{living} la fiecare test efectuat (în cadrul fiecărei secvențe de testare), din cauza variabilității biologice inerente a țesuturilor vii. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în soluția cu MTT, minus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, testul fiind efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{living}).
31. Substanțele chimice de testat care sunt identificate ca producând atât o reducere directă a MTT (a se vedea punctul 29), cât și interferența culorii (a se vedea punctul 30) va necesita, de asemenea, un al treilea set de martori, în afară de NSMTT și martorii NSC_{living} descriși la punctele anterioare, la efectuarea măsurătorii standard a absorbanței (DO). Acest lucru este valabil, de obicei, în cazul substanțelor chimice de testat colorate în nuanțe închise care influențează testul MTT (de exemplu, culoarea albastră, violet, neagră), deoarece culoarea lor intrinsecă împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce direct MTT, conform descrierii de la punctul 29. Aceste substanțe chimice de testat se pot prinde atât de țesuturile vii, cât și de cele moarte și, prin urmare, martorul NSMTT se poate corecta nu doar pentru o posibilă reducere directă a MTT prin substanța chimică de testat, ci și pentru interferența culorii ca urmare a aderării substanței chimice de testat la țesuturile moarte. Aceasta ar putea conduce la o dublă corecție pentru interferența culorii, întrucât martorul NSC_{living} corectează deja interferența culorii determinată de prinderea

substanței chimice de testat de țesuturile vii. Pentru a evita o posibilă corecție dublă pentru interferența culorii, ar trebui efectuat un test pentru un al treilea martor de culoare nespecifică la țesuturi moarte (NSC_{killed}). La acest martor suplimentar, substanța chimică de testat se aplică pe cel puțin două țesuturi duplicate moarte, care sunt supuse întregii proceduri de testare, dar se incubează în mediu în loc de MTT în etapa de incubare MTT. O singură verificare pentru martorul NSC_{killed} este suficientă pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste independente, dar ar trebui să fie efectuată concomitent cu verificarea pentru martorul NSMTT și, dacă este posibil, pe același lot de țesuturi. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat % NSMTT minus $\%NSC_{living}$plus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi moarte expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, cu calculare raportat la testul pentru martor negativ efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{killed}).

32. Este important de precizat că reducerea valorii MTT nespecifice și interferențele culorii nespecifice pot crește valorile de citire ale extractului de țesut peste intervalul de liniaritate al spectrofotometrului. Pe această bază, fiecare laborator ar trebui să stabilească intervalul de liniaritate al spectrofotometrului lor pentru formazan MTT (CAS # 57360-69-7) dintr-o sursă comercială înainte de a iniția testarea substanțelor chimice de testat în scopuri de reglementare. Măsurarea absorbanței standard (DO) cu ajutorul unui spectrofotometru este adecvată pentru evaluarea reductorilor direcți ai MTT și a substanțelor chimice care interferează cu culorile atunci când valorile DO ale extractelor de țesuturi, care sunt obținute cu substanța chimică de testat fără nicio corecție pentru reducerea directă a MTT și/sau interferența culorii, se află în intervalul liniar al spectrofotometrului sau atunci când procentul de viabilitate necorectat obținut cu substanța chimică de testat este deja ≤ 50 %. Cu toate acestea, rezultatele pentru substanțele chimice de testat care produc % NSMTT și/sau % NSC_{living} ≥ 50 % din martorul negativ ar trebui să fie tratate cu precauție, deoarece aceasta este valoarea-limită utilizată pentru a distinge substanțele chimice clasificate de cele neclasificate (a se vedea punctul 36).

33. Pentru substanțele chimice de testat colorate care nu sunt compatibile cu măsurarea absorbanței standard (DO) din cauza unei interferențe prea puternice cu testul MTT, poate fi utilizată procedura de spectrofotometrie HPLC/UPLC alternativă pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctul 34) (36). Sistemul de spectrofotometrie HPLC/UPLC permite separarea formazanului MTT de substanța chimică de testat înainte de cuantificarea sa (36). Din acest motiv, martorii NSC_{living} sau NSC_{killed}, nu sunt niciodată necesari atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, independent de substanța chimică de testat. Martorii NSMTT ar trebui să fie totuși utilizați în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată a reduce în mod direct MTT sau are o culoare care împiedică evaluarea capacității de a reduce MTT în mod direct (conform descrierii de la punctul 29). Atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC pentru a măsura formazanul MTT, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Pentru substanțele chimice de testat care pot reduce MTT în mod direct, viabilitatea tisulară reală se calculează ca procent de viabilitate tisulară obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat, minus % NSMTT. În cele din urmă, ar trebui remarcat faptul că reductorii direcți ai MTT, care pot interfera, de asemenea, cu culorile și care sunt reținuți în țesuturi după tratament și reduc MTT atât de mult încât conduc în mod semnificativ la valori ale DO (prin măsurarea standard a DO) sau la valori de vârf (folosind spectrofotometrul UPLC/HPLC) ale extractelor de țesuturi testate care nu se încadrează în intervalul de linearitate al spectrofotometrului, nu pot fi evaluați, deși se apariția acestora este preconizată doar în situații foarte rare.

34. Spectrofotometria HPLC/UPLC poate fi utilizată, de asemenea, pe toate tipurile de substanțe chimice de testat (colorate, necolorate, reductori ai MTT și nereductori ai MTT) pentru măsurarea formazanului MTT (36). Datorită diversității sistemelor de spectrofotometrie HPLC/UPLC, calificarea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC ar trebui să fie demonstrată înainte ca acesta să fie utilizat pentru a cuantifica formazanul MTT din extractele de țesuturi prin îndeplinirea criteriilor de acceptare pentru un set de parametri standard de calificare, pe baza celor descrise în orientarea U.S. Food and Drug Administration pentru industrie cu privire la validarea metodei bioanalitice (36) (37). Acești parametri-cheie și criteriile de acceptare aferente sunt prezentate în apendicele 4. Odată ce criteriile de acceptare definite în apendicele 4 au fost îndeplinite, sistemul de spectrofotometrie prin HPLC/UPLC este considerat a fi calificat și pregătit pentru a măsura formazanul MTT în condițiile experimentale descrise în prezenta metodă de testare.

Criterii de acceptabilitate

35. Pentru fiecare metodă de testare care utilizează loturi valabile de modele de RhE (a se vedea punctul 23), țesuturile tratate cu martor negativ ar trebui să prezinte o densitate optică care să reflecte calitatea țesuturilor care au parcurs etapele de transport și recepție, precum și toate procesele de protocol. Valorile densității optice (DO) ale martorilor nu ar trebui să fie sub limitele istorice stabilite. În mod similar, țesuturile tratate cu martor pozitiv, și anume, o soluție apoasă de 5 % SDS, ar trebui să reflecte capacitatea acestora de a reacționa la o substanță chimică iritantă în condițiile metodei de testare [a se vedea apendicele 3 și, pentru informații suplimentare, PSO-urile celor patru modele de testare incluse în prezenta orientare privind testarea (32) (33) (34) (35)]. Măsurile asociate și adecvate ale variabilității între țesuturile duplicate, și anume, abaterile standard (DS) ar trebui să se încadreze în limitele de acceptare stabilite pentru modelul de testare utilizat (a se vedea apendicele 3).

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

36. Valorile densității optice obținute pentru fiecare substanță chimică de testat pot fi utilizate pentru a calcula procentul de viabilitate normalizat la nivelul martorului negativ, care este stabilit la 100 %. În cazul în care se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Valoarea-limită a procentului de viabilitate celulară pe baza căreia se face distincția între substanțele chimice de testat iritante și cele neclasificate, precum și procedura (procedurile) statistică (statistice) utilizată (utilizate) pentru evaluarea rezultatelor și identificarea substanțelor chimice iritante, ar trebui să fie clar definite și documentate și să se demonstreze caracterul adecvat al acestora (a se vedea PSO-urile modelelor de testare pentru informații). În continuare sunt prezentate valorile-limită pentru estimarea efectelor iritante:

— Substanța chimică de testat este identificată ca necesitând clasificarea și etichetarea în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP (categoria 2 sau 1) dacă procentul mediu al viabilității tisulare după expunere și după perioada de incubare post-tratament este mai mic de sau egal cu (≤) 50 %. Întrucât modelele de testare bazate pe RhE care fac obiectul prezentei metode de testare nu pot stabili încadrarea în categoriile 1 și 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP, vor fi necesare informații suplimentare privind coroziunea cutanată, pentru a decide cu privire la clasificarea sa finală [a se vedea, de asemenea, documentul de orientare al OCDE privind IATA (3)]. În cazul în care se constată că substanța chimică de testat este necorozivă (de exemplu, pe baza MT.40, B.40bis sau B.65) și că aceasta prezintă o viabilitate a țesutului după expunere și după perioada de incubare post-tratament mai mică de sau egală cu (≤) 50 %, substanța chimică de testat este considerată a fi iritantă pentru piele în conformitate cu categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

— În funcție de cadrul de reglementare din statele membre, substanța chimică de testat poate fi considerată ca fiind neiritantă pentru piele în conformitate cu clasificarea „neîncadrat” din GHS al ONU/Regulamentul CLP dacă viabilitatea tisulară după expunere și după perioada de incubare post-tratament este mai mare (>) de 50 %.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

37. Pentru fiecare serie, ar trebui să se consemneze într-un tabel date obținute pentru fiecare țesut duplicat (de exemplu, valorile DO și datele privind procentele calculate ale viabilității celulare pentru fiecare substanță chimică de testat, inclusiv clasificarea corespunzătoare), inclusiv datele obținute în urma repetării experimentelor, dacă este cazul. În plus, ar trebui să se consemneze valorile medii ± DS pentru fiecare serie. Interacțiunile observate cu reactivul MTT și cu substanțele chimice de testat colorate ar trebui să fie consemnate pentru fiecare substanță chimică testată.

Raport testului

38. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat și substanțele chimice martor:

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/substanțelor chimice martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Modelul și protocolul RhE utilizate (precum și justificarea alegerii, dacă este cazul)

Condiții de testare:

— Modelul RhE utilizat (inclusiv numărul lotului);

— Informațiile privind calibrarea pentru dispozitivul de măsurare (de exemplu, spectrofotometru), lungimea de undă și filtrul de tip band pass (dacă este cazul) utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT, precum și intervalul de linearitate al dispozitivului de măsurare; Descrierea metodei utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT;

— Descrierea calificării sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC, dacă este cazul; informații de asistență complete privind modelul de RhE utilizat, inclusiv performanța acestuia. Acestea ar trebui să includă, printre altele:

  i) viabilitatea;

  ii) funcția de barieră;

  iii) morfologia;

  iv) reproductibilitate și predictibilitate

  v) controalele calității (CC) asupra modelului;

— trimiteri la datele istorice ale modelului. Acestea ar trebui să includă, printre altele, acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul.

— Demonstrarea competenței de desfășurare a metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor de verificare.

Procedura de testare:

— detalii privind procedura de testare utilizată (inclusiv procedurile de spălare utilizate după perioada de expunere); doza de substanță chimică de testat și de martori utilizați;

— Durata și temperatura expunerii și perioada de incubație post-expunere;

— indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare, dacă este cazul;

— numărul de țesuturi duplicate utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (MP, martor negativ și NSMTT, NSC_{living} și NSC_{killed}, dacă este cazul);

— descrierea criteriilor de decizie/a modelului predictiv aplicat pe baza modelului RhE utilizat;

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare (inclusiv procedurile de spălare).

Durata și criteriile de acceptare a testului:

— valorile medii ale martorilor pozitivi și negativi și intervale de acceptare pe baza datelor istorice; variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru martorii pozitivi și negativi;

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru substanța chimică de testat.

Rezultate:

— prezentarea tabelară a datelor pentru fiecare substanță chimică de testat pentru fiecare test și fiecare măsurătoare duplicată care include valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, procentul de viabilitate tisulară, procentul mediu de viabilitate tisulară și valorile DS;

— dacă este cazul, rezultatele martorilor utilizați pentru reductorii direcți ai MTT și/sau substanțele chimice de colorare, inclusiv valorile de vârf ale DO sau ale formazanului MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, valorile DS, procentul final corect de viabilitate tisulară;

— rezultatele obținute cu substanța (substanțele) chimică(e) de testat și martorii în legătură cu criteriile de acceptare ale verificării și testării specifice;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS), a doua ediție revizuită, ONU New York și Geneva, 2013. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Declarație privind „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", emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC31), 9 aprilie 2009. Publicație disponibilă la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(5) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Rezistența electrică transcutanată (RET).

(6) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită (RHE).

(7) Capitolul B.65 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin barieră cu membrană.

(8) OCDE (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 (nr. 220). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(9) OCDE (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, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. și 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, 351358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC26), 27 aprilie 2007. Publicație disponibilă la adresa: 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. Acestea sunt standardele de performanță inițiale utilizate pentru validarea a două metode de testare. Aceste standarde de performanță nu ar trebui să mai fie utilizate, întrucât există acum o versiune actualizată (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC29), 5 noiembrie 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OCDE (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, (nr. 137), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. și 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. și 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) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 159), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 155), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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. și 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™ (februarie 2009). SOP, versiunea 1.8 ECVAM 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™ (revizuire în martie 2009). SOP, versiunea 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 (iunie 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, versiunea 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. și 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. Mai 2001. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. și Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, în: 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. Aceasta este versiunea actuală a standardelor de performanță ale ECVAM, actualizată în 2009 în vederea implementării GHS al ONU. Aceste standarde de performanță nu ar trebui să mai fie utilizate, întrucât există acum o versiune actualizată (8) referitoare la actuala orientare privind testarea.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC31), 8 iulie 2009.

(41) CE (2001). Directiva 2001/59/CE a Comisiei din 6 august 2001 de efectuare a celei de-a douăzeci și opta adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L225, 1-333.

Apendicele 1

DEFINIțII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim «concordanță», pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (9).

Viabilitate celulară: Parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare, de exemplu, capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale celulare de a reduce colorantul vital MTT [bromură de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil], care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

Substanță chimică: înseamnă o substanță sau un amestec.

Concordanță: Acesta este un indicator al performanței pentru modelele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe" și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (9).

ET_{50}: Poate fi estimat prin calcularea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % odată cu aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă, a se vedea, de asemenea, IC_{50}.

GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite (ONU)]: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

HPLC: Cromatografie lichidă de înaltă performanță.

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare

IC_{50}: Poate fi estimat prin determinarea concentrației la care o substanță chimică de referință reduce viabilitatea țesutului cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere (a se vedea, de asemenea, ET_{50}).

Doză infinită: Cantitate de substanță chimică de testat aplicată pe epidermă, care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epidermei.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NSC_{killed}: Culoare nespecifică la țesuturi moarte.

NSC_{living}: Culoare nespecifică la țesuturi vii.

NSMTT: Reducere nespecifică a MTT.

Standarde de performanță (SP): Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin metoda de testare propusă la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (9).

MP: Martor pozitiv, un duplicat care conține toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratat cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (9).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (9).

Test substitutiv: Un test conceput să substituie un test utilizat în mod sistematic și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost conceput pentru a asigura o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat pentru toate situațiile de testare posibile și toate substanțele chimice (9).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor negativ și un MP.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active de testat clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Iritația cutanată *in vivo*: Producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la 4 ore. Iritația cutanată este o reacție locală produsă la nivelul țesutului cutanat afectat, care apare la scurt timp după stimulare (38). Aceasta este cauzată de o reacție inflamatorie locală care implică sistemul imunitar (nespecific) înnăscut al țesutului cutanat. Principala sa caracteristică este procesul reversibil care implică reacții inflamatorii și majoritatea semnelor clinice caracteristice iritației (eritem, edem, prurit și durere) asociate unui proces inflamator.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice de testat negative/inactive clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UPLC: Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Apendicele 2

MODELELE DE TESTARE INCLUSE ÎN PREZENTA METODĂ DE TESTARE

Nr.	Denumirea modelelor de testare	Tip de studiu de validare	Referințe
1	EpiSkin™	Studiu de validare prospectiv complet (2003-2007). Componentele acestui model au fost utilizate pentru a defini componentele metodei de testare esențiale din versiunea inițială și cea actualizată a standardelor de performanță ECVAM (39) (40) (21) (*) . Mai mult, datele metodei cu privire la identificarea substanțelor neclasificate și a celor clasificate au constituit baza principală pentru definirea valorilor de specificitate și de sensibilitate ale standardelor de performanță inițiale (*) .	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*inițial*): Inițial, modelul de testare a fost supus unei validări prospective complete împreună cu versiunea nr. 1 din perioada 2003-2007. Componentele acestui model au fost utilizate pentru a defini componentele metodelor de testare esențiale din versiunea inițială și cea actualizată a standardelor de performanță ECVAM (39) (40) (21) (*) . **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** O modificare a versiunii inițiale a EpiDerm™ a fost validată pe baza SP inițiale ECVAM (21) în 2008 (*)	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Studiu de validare pe baza standardelor de performanță inițiale ale ECVAM (21) în 2008 (*) .	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Studiu de validare (2011-2012) pe baza standardelor de performanță (SP) din orientarea nr. 439 a OCDE privind testarea (8), care se bazează pe versiunea actualizată a standardelor de performanță ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) și SP ale prezentei orientări privind testarea (8) (*)

(*) Standardele de performanță inițiale ECVAM (SP) (21) au fost dezvoltate în 2007 la finalizarea studiului de validare prospectivă (16) care evaluase performanța modelelor de testare nr. 1 și 2 în ceea ce privește sistemul de clasificare descris în a 28-a modificare a Directivei UE privind substanțele periculoase (41). În 2008, au fost introduse GHS al ONU (1) și Regulamentul CLP al UE, modificând în mod eficace valoarea-limită pentru diferențierea substanțelor neclasificate de cele clasificate de la un punctaj *in vivo* de 2,0 la 2,3. Pentru a se adapta la această cerință de reglementare modificată, valorile de precizie și lista substanțelor chimice de referință din SP ECVAM au fost actualizate în 2009 (2) (39) (40). Asemenea SP inițiale, SP actualizate au fost, de asemenea, bazate, în mare parte, pe date din modelele 1 și 2 (16), însă au utilizat, în plus, date privind substanțele chimice de referință de la modelul nr. 3. În 2010, versiunea actualizată a SP ECVAM a fost utilizată pentru a stabili SP aferente acestei orientări privind testarea (8). În sensul prezentei metode de testare, EpiSkin™ este considerată a fi MRV, datorită faptului că a fost utilizată pentru a elabora toate criteriile SP. Informații detaliate privind studiile de validare, o compilație a datelor generate, precum și informații generale cu privire la adaptările necesare ale SP ca urmare a punerii în aplicare a GHS al ONU/CLP, se găsesc în documentul de referință explicativ ECVAM/BfR la orientarea OCDE nr. 439 aferentă privind testarea (23).

SIT: Test de iritație cutanată

RHE: Epidermă umană reconstruită

Apendicele 3

PARAMETRII PROTOCOLULUI SPECIFICI FIECĂRUI MODEL DE TESTARE INCLUS ÎN ACEASTĂ METODĂ DE TESTARE

Modelele bazate pe RhE prezintă protocoale foarte asemănătoare și, în special, toate utilizează o perioadă de post-incubație de 42 de ore (32) (33) (34) (35). Variațiile se referă, în principal, la trei parametri privind diferitele funcții de barieră ale modelelor de testare, care sunt enumerați aici: A) timpul și volumul de pre-incubare, B) aplicarea substanțelor chimice de testat și C) volumul de post-incubare.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Pre-incubarea				
Timpul de incubare	18-24 de ore	18-24 de ore	< 2 ore	15-30 de ore
Volum mediu	2 ml	0,9 ml	0,3 sau 1 ml	0,5 ml
B) Aplicarea substanței chimice de testat				
Pentru lichide	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Pentru substanțe solide	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25mg (39mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16mg (32mg/cm^2) + DW (10 µl)	25mg (83mg/cm^2) + DW (25 µl)
Utilizarea unei plase din nailon	Nu este utilizată	Dacă este necesar	Aplicată	Nu este utilizată
Timpul total de aplicare	15 minute	60 minute	42 minute	15 minute
Temperatura de aplicare	Temperatura camerei (TC)	a) la TC timp de 25 de minute b) la 37 °C timp de 35 de minute	Temperatura camerei (TC)	Temperatura camerei (TC)
C) Volum post-incubare				
Volum mediu	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Variabilitatea maximă acceptabilă				
Abaterea standard între țesuturile duplicate	AS18	AS18	AS18	AS18

TC: Temperatura camerei
AD: apă distilată
DPBS: Soluția-tampon fosfat salin a lui Dulbecco

Apendicele 4

PARAMETRII CHEIE ȘI CRITERIILE DE ACCEPTARE PENTRU CALIFICAREA UNUI SISTEM DE SPECTROMETRIE HPLC/UPLC PENTRU MĂSURAREA FORMAZANULUI MTT EXTRAS DIN ȚESUTUL RHE

Parametru	Protocol derivat din Orientarea FDA (36) (37)	Criterii de acceptare
Selectivitate	Analiza izopropanolului, probă vie (extras de izopropanol din țesuturi RhE vii fără tratament), probă moartă (extras de izopropanol din țesuturile RhE moarte fără tratament)	$Zonă_{interferență}$ ≤ 20 % din $Zona_{LLOQ}$ (1)
Precizie	Controale ale calității (și anume, formazan MTT la 1,6 µg/ml, 16 µg/ml și 160 µg/ml) în izopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Precizie	Controlul calității la izopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Efectul de matrice	Controlul calității la proba vie (n = 5)	85 % ≤ efectul de matrice % ≤ 115 %
Reportare	Analiza izopropanolului conform unui standard ULOQ (2)	$Zona_{interferență}$ ≤ 20 % din $Zona_{LLOQ}$
Reproductibilitate (în aceeași zi)	3 curbe de calibrare independente (pe baza a 6 diluții 1/3 consecutive de formazan MTT în izopropanol începând de la valoarea ULOQ, și anume, 200 µg/ml); Controlul calității la izopropanol (n = 5)	Curbe de calibrare: % Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ Controale ale calității: % Dev ≤ 15 % și CV ≤ 15 %
Reproductibilitate (între zile diferite)	Ziua 1:: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 2:: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 3:: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3)	
Stabilitate pe termen scurt a formazanului MTT în extractul de țesut RhE	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după 24 de ore de la stocare la temperatura camerei	% Dev ≤ 15 %
Stabilitate pe termen lung a formazanului MTT în extractul de țesut RhE, dacă este necesar	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după mai multe zile de la stocare la o temperatură specifică (de exemplu, 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Limita inferioară de cuantificare, definită ca acoperind 1-2 % din viabilitatea tisulară, și anume, 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Limita superioară de cuantificare, definită a fi de cel puțin două ori mai mare decât cea mai mare concentrație prevăzută de formazan MTT în extracte de izopropanol din martori negativi, și anume 200 µg/ml.

(8) În partea B, se adaugă următoarele capitole:

„B.63 **TESTUL DE DEPISTARE A TOXICITĂȚII PENTRU REPRODUCERE/DEZVOLTARE**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 421 (2016). Orientările OCDE pentru testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic în contextul evoluțiilor științifice. Orientarea inițială nr. 421 privind testarea pentru depistare a fost adoptată în 1995, pe baza unui protocol pentru un „Test preliminar de depistare a toxicității pentru reproducere" discutat în cadrul a două reuniuni ale experților, la Londra, în 1990 (1) și la Tokyo în 1992 (2).

2. Această metodă de testare a fost actualizată cu puncte finale relevante privind perturbatorii endocrini, ca o continuare a activității cu prioritate ridicată inițiată de OCDE în 1998 în vederea revizuirii orientărilor existente privind testarea și a elaborării unor noi orientări privind testarea pentru depistarea și testarea unor potențiali perturbatori endocrini (3). Orientarea nr. 407 a OCDE privind testarea (studiul de toxicitate orală cu doză repetată la rozătoare, de 28 de zile, capitolul B.7 din prezenta anexă), de exemplu, a fost îmbunătățită în 2008 cu parametri adecvați pentru detectarea activității endocrine a substanțelor chimice de testat. În cadrul actualizării Orientării nr. 421 privind testarea, obiectivul a fost acela de a include câteva puncte finale relevante pentru perturbatori endocrini în orientările privind testele pentru depistare în cazul în care perioadele de expunere acoperă unele dintre perioadele sensibile din procesul de dezvoltare (perioadele prenatale sau postnatale timpurii).

3. Punctele finale relevante suplimentare selectate pentru perturbatorii endocrini fac parte, de asemenea, din TG nr. 443 privind testarea (Studiu extins de toxicitate pentru reproducere la o singură generație, capitolul B.56 din prezenta anexă) au fost incluse în TG nr. 421 pe baza unui studiu de fezabilitate care abordează aspecte științifice și tehnice legate de includerea acestora, precum și de posibile adaptări ale modelului testului, care sunt necesare pentru includerea acestora (4).

4. Această metodă de testare este concepută pentru a genera informații limitate cu privire la efectele unei substanțe chimice de testat asupra performanței reproductive a masculilor și femelelor, cum ar fi funcția gonadelor, comportamentul de împerechere, concepția, dezvoltarea produsului de concepție și parturiția. Aceasta nu este o alternativă la metodele de testare existente B.31, B.34, B.35 sau B.56 și nici nu le înlocuiește.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. Această metodă de testare pentru depistare poate fi utilizată pentru a furniza informații inițiale cu privire la posibile efecte asupra reproducerii și/sau dezvoltării, fie într-un stadiu incipient de evaluare a proprietăților toxicologice ale substanțelor chimice, fie asupra substanțelor chimice de interes. Aceasta poate fi utilizată, de asemenea, în cadrul unui set de teste inițiale pentru depistare în cazul substanțelor chimice existente pentru care sunt disponibile informații toxicologice puține sau pentru care nu sunt disponibile astfel de informații, ca un studiu pentru stabilirea intervalului de dozare pentru studii mai ample privind reproducerea/dezvoltarea sau pentru alte cazuri considerate relevante. În desfășurarea studiului, ar trebui să se respecte principiile directoare și considerentele prezentate în documentul de orientare nr. 19 al OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale fără suferință pentru animalele de experiență utilizate în evaluări ale siguranței (5).

6. Această metodă de testare nu oferă informații complete cu privire la toate aspectele legate de reproducere și dezvoltare. În special, aceasta oferă doar mijloace limitate de detectare a manifestărilor postnatale ale expunerii prenatale sau a efectelor care pot fi induse în timpul expunerii postnatale. Printre altele, din cauza numărului relativ mic de animale din grupurile de dozare, a selectivității punctelor finale și a duratei scurte a studiului, această metodă nu va furniza dovezi pentru concluzii sigure privind inexistența efectelor. În plus, în absența datelor provenite din alte teste de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, rezultatele pozitive sunt utile pentru evaluarea inițială a pericolelor și contribuie la luarea deciziilor cu privire la necesitatea și calendarul testelor suplimentare.

7. Rezultatele obținute prin parametrii endocrini conecși ar trebui să fie evaluate în contextul „Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine" (6). În acest cadru conceptual, orientarea nr. 421 a OCDE privind testarea îmbunătățită se regăsește la nivelul 4 ca test *in vivo* care asigură date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante ale sistemului endocrin. Însă este posibil ca un semnal endocrin să nu fie considerat drept o dovadă suficientă în sine pentru faptul că substanța chimică de testat este un perturbator endocrin.

8. Această metodă de testare presupune administrarea substanței chimice de testat pe cale orală. Dacă se utilizează alte căi de expunere, este posibil să fie necesare modificări.

9. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

10. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Substanța chimică de testat se administrează în doze gradate mai multor grupuri de masculi și femele. Doza pentru masculi ar trebui să fie administrată pentru o perioadă de cel puțin patru săptămâni și până în ziua dinaintea sacrificării planificate inclusiv (aceasta include cel puțin două săptămâni înainte de împerechere, perioada de împerechere și aproximativ două săptămâni după împerechere). Având în vedere perioada de dozare limitată de pre-împerechere a masculilor, este posibil ca fertilitatea să nu fie un indicator deosebit de sensibil al toxicității testiculare. Prin urmare, este esențială o examinare histologică detaliată a testiculelor. Combinația dintre o perioadă de dozare de pre-împerechere de două săptămâni și de formulare ulterioară a observațiilor privind împerecherea/fertilitatea și o perioadă de dozare generală de cel puțin patru săptămâni, urmată de histopatologia detaliată a gonadelor de sex masculin, este considerată suficientă pentru a permite detectarea majorității efectelor asupra fertilității masculine și a spermatogenezei.

12. Femelelor ar trebui să li se administreze doze pe toată durata studiului. Aceasta include două săptămâni înainte de împerechere (cu obiectivul de a acoperi cel puțin două cicluri estrale complete), timpul variabil până la concepție, durata sarcinii și cel puțin 13 zile după parturiție, până în ziua dinaintea eutanasierii planificate inclusiv.

13. Durata studiului, în urma aclimatizării și evaluării ciclului estral înainte de dozare, depinde de performanța femelei și este de aproximativ 63 de zile, [cel puțin 14 zile înainte de împerechere, (până la) 14 zile de împerechere, 22 de zile de gestație, 13 zile de lactație].

14. În perioada de administrare, animalele sunt examinate cu atenție zilnic, în vederea identificării unor eventuale semne de toxicitate. Animalele care au murit sau care au fost eutanasiate în perioada de testare sunt supuse unei autopsii, iar cele care supraviețuiesc până la sfârșitul testului sunt eutanasiate și autopsiate.

DESCRIEREA METODEI

Selecția speciilor de animale

15. Această metodă de testare este concepută pentru a fi utilizată la șobolan. În cazul în care parametrii specificați în cadrul acestei metode de testare sunt investigați la o altă specie de rozătoare, ar trebui să se prezinte o justificare detaliată. În cadrul programului de validare internațional pentru detectarea perturbatorilor endocrini în TG nr. 407 din OCDE (care corespunde capitolului B.7 din prezenta anexă), șobolanul a fost singura specie folosită. Nu ar trebui să se utilizeze sușe cu fecunditate scăzută sau cu o incidență a defectelor de dezvoltare cunoscută a fi ridicată. Ar trebui să se folosească animale virgine sănătoase, care nu au fost supuse anterior unor proceduri experimentale. Animalele de experiență ar trebui să fie caracterizate în ceea ce privește specia, sușa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite ar trebui să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex. În cazul în care studiul este realizat cu titlu de studiu preliminar pentru un studiu pe termen lung sau pentru o întreagă generație, este de preferat să se utilizeze, în ambele studii, animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

Adăpostire și hrănire

16. Toate procedurile ar trebui să fie în conformitate cu standardele locale privind îngrijirea animalelor de laborator. Temperatura camerei în care se află animalele de experiență ar trebui să fie de 22 °C (± 3 °). Cu toate că umiditatea relativă ar trebui să fie de cel puțin 30 % și, de preferință, să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este de 50-60 %. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând perioade de 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al unei substanțe chimice de testat atunci când aceasta se administrează utilizând această metodă.

17. Animalele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici de același sex; animalele pot fi adăpostite individual dacă există o justificare științifică. În cazul cuștilor colective nu ar trebui să se depășească numărul de cinci animale în fiecare cușcă. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. Femelele gestante ar trebui să fie plasate în cuști individuale și prevăzute cu materiale pentru cuibărire. Femelele aflate în lactație vor fi plasate în cuști individuale împreună cu progeniturile acestora.

18. Hrana ar trebui să fie analizată în mod regulat în vederea identificării contaminanților. Ar trebui să se rețină un eșantion din hrană până la finalizarea raportului.

Pregătirea animalelor

19. Animale adulte, tinere și sănătoase sunt distribuite în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate amplasării cuștii. Animalele prezintă o identificare unică și sunt ținute în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

Prepararea dozelor

20. Se recomandă administrarea orală a substanței chimice de testat, cu excepția cazului în care se consideră că sunt adecvate alte căi de administrare. Atunci când se alege calea orală, substanța chimică de testat se administrează, de obicei, prin gavaj; însă, în mod alternativ, substanțele chimice de testat pot fi administrate împreună cu hrana sau cu apa potabilă.

21. Dacă este necesar, substanța chimică de testat se dizolvă sau se suspendă într-un vehicul adecvat. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și ulterior a unei soluții posibile în alte vehicule. Pentru alte vehicule decât apa, ar trebui să fie cunoscute caracteristicile toxice ale vehiculului respectiv. Ar trebui să se determine stabilitatea și omogenitatea substanței chimice de testat în vehicul.

PROCEDURA

Numărul și sexul animalelor

22. Se recomandă ca, la început, fiecare grup să aibă cel puțin 10 masculi și 12-13 femele. Femelele vor fi evaluate înainte de expunere pentru ciclicitatea estrală, iar animalele la care nu se produc cicluri tipice de 4-5 zile nu vor fi incluse în studiu; prin urmare, se recomandă femele suplimentare pentru a obține 10 femele într-un grup. Cu excepția cazului în care apar efecte toxice pronunțate, se preconizează că acesta va asigura cel puțin 8 femele gestante în fiecare grup, care reprezintă, în mod normal, numărul minim acceptabil de femele gestante într-un grup. Obiectivul este să se asigure un număr suficient de sarcini și pui pentru a asigura o evaluare semnificativă a potențialului substanței chimice de testat de a afecta fertilitatea, sarcina și comportamentul matern și de supt, precum și creșterea și dezvoltarea puilor F_1, de la concepție până în ziua 13 a perioadei post-partum.

Dozare

23. În general, ar trebui să se utilizeze cel puțin trei grupuri de testare tratate și un grup martor. Nivelurile de dozare pot fi stabilite în funcție de informațiile obținute în urma testelor de toxicitate acută sau de rezultatele studiilor cu doze repetate. Cu excepția tratării cu substanța chimică de testat, animalele din grupul martor ar trebui să fie tratate în mod identic cu animalele din grupul de testare. Dacă pentru administrarea substanței chimice de testat se folosește un vehicul, acesta se administrează grupului martor în volumul maxim utilizat.

24. Dozele ar trebui să fie selectate ținându-se cont de toxicitatea existentă și de datele toxico-cinetice disponibile. De asemenea, ar trebui să se țină seama de faptul că ar putea exista diferențe de sensibilitate între animalele gestante și cele negestante. Ar trebui să fie aleasă doza cea mai mare pentru a induce efecte toxice, însă nu moartea sau suferințe grave. În continuare, ar trebui să se scadă nivelul dozelor pentru a se pune în evidență un eventual răspuns legat de doză și concluzia că nu există efecte adverse observate (NOAEL) la cel mai redus nivel al dozei. Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și, deseori, este de preferat să se adauge un al patrulea grup de testare, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare de 10) între doze.

25. În prezența toxicității generale observate (de exemplu, greutate corporală redusă, efecte asupra ficatului, plămânilor sau rinichilor etc.) sau a altor schimbări care pot să nu constituie răspunsuri toxice (de exemplu, consum de hrană redus, mărirea ficatului), efectele observate asupra punctelor finale endocrine sensibile ar trebui să fie interpretate cu precauție.

Testul valorilor-limită

26. Dacă un studiu oral efectuat la un dozaj de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării împreună cu hrana sau cu apă potabilă, într-un procent echivalent în hrană sau în apa potabilă, folosind procedurile descrise pentru acest studiu, nu produce efecte toxice detectabile și dacă nu se anticipează toxicitatea pe baza datelor despre substanțe cu structuri asemănătoare, atunci este posibil să nu fie considerată necesară realizarea unui studiu complet cu mai multe niveluri de dozare. Testul valorilor-limită este valabil, cu excepția cazului în care expunerea umană indică faptul că trebuie să se administreze o doză mai mare pe cale orală. Pentru alte tipuri de administrare, cum sunt inhalarea sau aplicarea dermică, este posibil ca proprietățile fizice și chimice ale substanțelor chimice de testat să determine deseori nivelul maxim posibil al concentrației.

Administrarea dozelor

27. Animalelor li se administrează substanța chimică de testat zilnic, timp de 7 zile pe săptămână. Când substanța chimică de testat este administrată prin gavaj, administrarea ar trebui să fie în doză unică la animale, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. Volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor chimice de testat iritante sau corozive care vor produc, de regulă, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile de dozare.

28. Pentru substanțele chimice de testat administrate în hrană sau în apa potabilă, este important să se asigure că respectivele cantități de substanță chimică de testat implicate nu influențează nutriția normală sau echilibrul hidric. Dacă substanța chimică de testat se administrează în hrană, aceasta poate fi administrată fie într-o concentrație constantă în alimentație (ppm), fie la o doză constantă în raport cu greutatea corporală a animalelor; alternativa utilizată ar trebui precizată. În cazul unei substanțe chimice de testat administrate prin gavaj, doza ar trebui să se administreze la aproximativ aceeași oră în fiecare zi și să fie ajustată cel puțin săptămânal pentru a menține un nivel constant al dozei în funcție de greutatea corporală a animalului.

Schema de tratament

29. Administrarea dozelor la ambele sexe ar trebui să înceapă cu cel puțin 2 săptămâni înainte de împerechere, după ce acestea au fost aclimatizate timp de cel puțin cinci zile, iar femelele au fost supuse unui control privind ciclurile estrale normale (într-o perioadă de pre-tratament de 2 săptămâni). Studiul ar trebui să fie planificat în așa fel încât evaluarea ciclului estral să înceapă de îndată ce animalele au ajuns la maturitatea sexuală deplină. Aceasta ar putea varia ușor între diferite sușe de șobolani din diferite laboratoare, de exemplu, la șobolanii Sprague Dawley aceasta este la vârsta de 10 săptămâni, la șobolanii Wistar la vârsta de aproximativ 12 săptămâni. Femelele cu pui ar trebui să fie eutanasiate în ziua 13 post-partum sau imediat după aceea. Ziua nașterii (și anume, atunci când s-a încheiat parturiția) este definită ca fiind ziua 0 post-partum. Femelele care nu prezintă semne ale copulației sunt eutanasiate după 24-26 zile de la ultima zi a perioadei de împerechere. Administrarea dozelor continuă la ambele sexe în perioada de împerechere. Masculilor ar trebui să li se administreze în continuare doze după perioada de împerechere cel puțin până la încheierea perioadei de dozare minime totale de 28 de zile. Apoi aceștia sunt eutanasiați sau, alternativ, sunt reținuți pentru administrarea în continuare a dozelor pentru o posibilă desfășurare a unei a doua împerecheri, dacă se consideră că este cazul.

30. Administrarea de doze zilnice la femelele parentale ar trebui să continue pe întreaga durată a sarcinii și cel puțin până în ziua 13 post-partum inclusiv sau cu o zi înainte de sacrificare. În cazul studiilor în care substanța chimică de testat se administrează prin inhalare sau subcutanat, dozele ar trebui să fie administrate în continuare cel puțin până în ziua 19 de sarcină inclusiv și administrate din nou cât mai curând posibil, dar nu mai târziu de ziua post-fătare (PND) 4.

31. În apendicele 2 este prezentată o diagramă a schemei de tratament.

Procedura de împerechere

32. De regulă, în prezentul studiu ar trebui utilizate împerecheri 1:1 (un mascul la o femelă). Pot exista excepții în cazul deceselor ocazionale ale masculilor. Femela ar trebui să fie plasată împreună cu același mascul până când se observă semne ale copulației sau au trecut două săptămâni. În fiecare dimineață, femelele ar trebui să fie examinate pentru a se constata prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 a gestației este definită ca fiind ziua în care se confirmă dovada împerecherii (se constată existența unui dop vaginal sau a spermei). În cazul în care împerecherea eșuează, se poate lua în calcul reîmperecherea femelelor în cauză cu masculi din același grup care și-au dovedit capacitatea reproductivă.

Dimensiunea seriei de pui

33. În ziua 4 de după naștere, dimensiunea fiecărei serii de pui poate fi ajustată prin eliminarea puilor suplimentari printr-o selecție aleatorie pentru a obține, pe cât posibil, patru sau cinci pui per sex per serie, în funcție de dimensiunea normală a seriei la sușa de șobolani utilizați. Ar trebui să se colecteze probe de sânge de la doi dintre puii în exces, care să fie grupate și utilizate pentru determinarea nivelurilor serului T4. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu pe baza greutății corporale sau a distanței anogenitale (AGD) nu este adecvată. Ori de câte ori numărul de pui masculi sau femele împiedică obținerea unui număr de patru sau cinci exemplare din fiecare sex per serie, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, șase masculi și patru femele). Nu se vor elimina pui dacă dimensiunea seriei va scădea sub ținta de sacrificare (8 sau 10 de pui/serie). Dacă există un singur pui peste obiectivul de sacrificare, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

34. Dacă dimensiunea seriei nu este ajustată, se sacrifică doi pui per serie în ziua 4, după naștere, și se iau probe de sânge pentru măsurarea concentrațiilor de hormoni tiroidieni din ser. Dacă este posibil, cei doi pui per serie ar trebui să fie pui de sex feminin pentru a rezerva puii masculi în vederea evaluării retenției mamelonului, cu excepția cazului în care în urma îndepărtării puilor respectivi nu mai rămân femele pentru evaluare la încheierea procesului. Nu se vor elimina pui în cazul în care dimensiunea seriei va scădea sub 8 sau 10 pui/serie (în funcție de dimensiunea normală a seriei în sușa de șobolani utilizată). Dacă există un singur pui peste dimensiunea normală a seriei, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

Observații în-viață

Observații clinice

35. Pe parcursul întregii perioade de testare, ar trebui să se formuleze observații clinice generale cel puțin o dată pe zi și mai frecvent atunci când se observă semne de toxicitate. Acestea ar trebui să fie efectuate, de preferat, la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozelor. Ar trebui să se înregistreze modificări comportamentale semnificative, semnele unei parturiții dificile sau prelungite și toate semnele de toxicitate, inclusiv mortalitatea. Aceste evidențe ar trebui să includă momentul apariției, gradul și durata semnelor de toxicitate.

Greutate corporală și consumul de hrană/apă

36. Masculii și femelele ar trebui să fie cântărite în prima zi a administrării dozelor, apoi cel puțin săptămânal și la sfârșit. În timpul sarcinii, femelele ar trebui să fie cântărite în zilele 0, 7, 14 și 20 și în termen de 24 de ore de la parturiție (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Aceste observații ar trebui să fie consemnate individual pentru fiecare animal adult.

37. În perioada de pre-împerechere, de sarcină și de alăptare, consumul de alimente ar trebui să fie măsurat cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană în timpul împerecherii este opțională. Pe parcursul acestor perioade, consumul de apă ar trebui, de asemenea, să fie măsurat atunci când substanța chimică de testat este administrată împreună cu apa potabilă.

Cicluri estrale

38. Înainte de a începe tratamentul, ar trebui să se monitorizeze ciclurile estrale pentru femelele studiate cu ciclicitate regulate (a se vedea punctul 22). De asemenea, frotiul vaginal ar trebui să fie monitorizat zilnic de la începutul perioadei de tratament, până la obținerea dovezii împerecherii. În cazul în care există motive de îngrijorare cu privire la efecte de criză acută care ar putea modifica ciclurile estrale odată cu inițierea administrării dozelor, laboratoarele pot să expună animalele de experiență timp de două săptămâni, apoi să colecteze frotiuri vaginale zilnic pentru a monitoriza ciclul estral timp de cel puțin două săptămâni în perioada de pre-împerechere, cu o continuare a monitorizării în perioada de împerechere până când există dovezi ale împerecherii. Atunci când se obțin celule vaginale/cervicale, ar trebui să se evite orice perturbare a mucoasei, care ar putea induce pseudogestația (7) (8).

Parametrii puilor

39. Durata gestației ar trebui să fie înregistrată, calculându-se din ziua 0 de gestație. Fiecare serie de pui ar trebui să fie examinată cât mai curând posibil după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, puii născuți morți, puii vii, puii subdezvoltați (puii care sunt semnificativ mai mici decât puii corespunzători din grupul martor) și prezența unor anomalii macroscopice.

40. În termen de 24 de ore de la parturiție, puii vii ar trebui să fie numărați și separați pe sexe, iar seriile de pui cântărite (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Pe lângă observațiile descrise la punctul 35, ar trebui să fie consemnat orice comportament anormal al puiului.

41. Este necesar ca AGD a fiecărui pui să fie măsurată în aceeași zi post-natală de la PND 0 până la PND 4. Greutatea corporală a puilor ar trebui să fie consemnează în ziua în care se măsoară AGD, aceasta trebuind să fie normalizată la o valoare aferentă dimensiunii puiului, de preferat, rădăcina cubică a greutății corporale (9). Numărul sfârcurilor/aureolelor la puii masculi ar trebui să fie calculat în PND 12 sau 13, astfel cum se recomandă în Orientarea nr. 151 a OCDE (10).

Biochimia clinică

42. Sunt prelevate probe de sânge dintr-un anumit loc pe baza următorului calendar:

— de la cel puțin doi pui pe serie în ziua 4, după naștere, în cazul în care numărul puilor permite acest lucru (a se vedea punctele 33-34)

— de la toate femelele și de la cel puțin doi pui pe serie la încheiere, în ziua 13, și

— de la toți masculii adulți, la încheiere,

Toate probele de sânge sunt păstrate în condiții adecvate. Sunt analizate probe de sânge de la pui din ziua 13 și de la masculii adulți pentru identificarea nivelurilor de hormoni tiroidieni din ser (T4). Dacă se consideră că este relevant, sunt efectuate analize suplimentare ale T4 din probele de sânge de la femele și de la puii din ziua 4. Opțional, dacă se consideră relevant, ar putea fi măsurați și alți hormoni. Probele de sânge ale puilor pot fi grupate pe serii pentru analize ale hormonilor tiroidieni. Hormonii tiroidieni (T4 și TSH) ar trebui, de preferință, să fie măsurați ca „valoare totală”.

43. Următorii factori pot influența variabilitatea și concentrațiile absolute ale valorilor hormonale determinate:

— momentul eutanasierii, din cauza variației diurne a concentrațiilor hormonale

— metoda de eutanasiere pentru a evita stresul nejustificat exercitat asupra animalelor, care poate afecta concentrațiile hormonale;

— seturile de testare pentru determinările hormonale, care pot varia prin curbele lor standard.

44. Probele de plasmă prevăzute în mod specific pentru determinarea hormonală ar trebui să fie obținute la momente comparabile din zi. Valorile numerice obținute la analiza concentrațiilor hormonale diferă în funcție de diferitele seturi de testare comerciale.

Patologie

Autopsie macroscopică

45. La momentul sacrificării sau al decesului pe durata studiului, animalele adulte ar trebui să fie examinate macroscopic pentru determinarea oricăror anomalii sau modificări patologice. Se acordă o atenție deosebită organelor sistemului de reproducere. Ar trebui să se înregistreze numărul de locuri de implantare. Ar trebui să se examineze frotiurile vaginale în dimineața zilei autopsiei pentru a determina stadiul ciclului estral și pentru a permite corelarea cu histopatologia ovarelor.

46. Testiculele și epididimitele, precum și prostata și veziculele seminale cu glande coagulante în ansamblu, ale tuturor masculilor adulți ar trebui să fie curățate de țesuturile aderente, după caz, și greutatea umedă a acestora înregistrată cât mai curând posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În plus, greutățile opționale ale organelor ar putea include complexul muscular levatorul ani plus bulbocavernos, glandele Cowper și glandul penisului la masculi și ovarele (greutate umedă) cuplate cu uterul (inclusiv colul uterin) la femele; dacă sunt incluse, aceste greutăți ar trebui să fie colectate cât mai curând posibil după disecție.

47. Puii morți și puii eutanasiați în ziua 13 post-partum, sau imediat după aceea, ar trebui să fie cel puțin examinați cu atenție la exterior pentru identificarea anomaliilor macroscopice. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită organelor genitale de reproducere externe, care ar trebui să fie examinate pentru identificarea unor modificări în dezvoltare. În ziua 13, ar trebui să fie păstrată tiroida de la un mascul pui și o femelă pui per serie.

48. Ar trebui să se păstreze ovarele, testiculele, organele sexuale anexe (uter și col uterin, epididimite, prostată, vezicule seminale plus glande coagulante), tiroida și toate organele care prezintă leziuni macroscopice la toate animalele adulte. Fixarea formaldehidei nu este recomandată în cazul examinării de rutină a testiculelor și a epididimitelor. O metodă acceptabilă este utilizarea fixatorului Bouin sau Davidson modificat pentru aceste țesuturi (11). Tunica albuginea ar putea fi perforată ușor și superficial cu un ac la ambii poli ai organului pentru a permite pătrunderea rapidă a fixatorului.

Histopatologie

49. Ar trebui să se efectueze un examen histologic detaliat al ovarelor, testiculelor și epididimitelor (se pune un accent deosebit pe fazele spermatogenezei și pe histopatologia structurii celulare testiculare interstițiale) a animalelor din grupul tratat cu doza maximă și din grupul martor. Ar putea fi examinate și celelalte organe păstrate, inclusiv tiroida de la pui și animalele adulte, dacă este necesar. După fixare ar putea fi determinată greutatea tiroidei. Curățarea ar trebui să fie făcută, de asemenea, foarte atent și doar după fixare, pentru a evita deteriorarea țesuturilor. Deteriorarea țesuturilor ar putea compromite analiza histopatologică. Examinările ar trebui să fie extinse la animalele din grupurile tratate cu alte doze, atunci când se constată modificări în grupul tratat cu doza cea mai mare. Ghidul privind histopatologia (11) prezintă detalii suplimentare privind disecția, fixarea, secționarea și histopatologia țesuturilor endocrine.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

50. Ar trebui să fie furnizate date despre fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să fie sintetizate în format tabelar, prezentându-se, pentru fiecare grup de testare, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, data decesului sau a eutanasierii, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de animale care prezintă semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și gravitatea efectelor toxice, tipul de modificări histopatologice și toate datele relevante privind seriile. În apendicele 3 este prezentat un format tabelar de raport de sinteză care s-a dovedit a fi foarte util pentru evaluarea efectului privind reproducerea/dezvoltarea.

51. Din cauza dimensiunilor limitate ale studiului, analizele statistice sub formă de teste de „semnificație" au o valoare limitată pentru multe puncte finale, în special punctele finale privind reproducerea. În cazul în care se utilizează analize statistice, atunci metoda aleasă ar trebui să fie adecvată pentru distribuirea variabilei examinate și să fie aleasă înainte de începerea studiului. Analiza statistică a AGD și a retenției sfârcurilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luate în considerare efectele asupra seriei. Dacă este cazul, seria constituie unitatea de analiză. Analiza statistică a greutății corporale a puilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luată în considerare dimensiunea seriei. Din cauza dimensiunii reduse a grupului, utilizarea datelor anterioare privind martorii (de exemplu, pentru dimensiunea seriei), dacă există, ar putea, de asemenea, să ajute la interpretarea studiului.

Evaluarea rezultatelor

52. Constatările acestui studiu de toxicitate ar trebui să fie evaluate sub aspectul efectelor observate, al autopsiei și al constatărilor microscopice. Evaluarea va include relația dintre doza de substanță chimică de testat și prezența sau absența, incidența și gravitatea unor anomalii, inclusiv leziuni macroscopice, organe țintă identificate, efecte asupra fertilității, anomalii clinice, efecte asupra performanței de reproducere și a seriei, modificări ale greutății corporale, efecte asupra mortalității și orice alte efecte toxice.

53. Din cauza perioadei scurte de tratament a masculului, histopatologia testiculelor și a epididimitelor ar trebui luată în considerare împreună cu datele privind fertilitatea la evaluarea efectelor de reproducere la masculi. Utilizarea datelor istorice privind martorii cu privire la reproducere/dezvoltare (de exemplu, pentru dimensiunea seriei, AGD, retenția sfârcurilor, nivelurile T4 din ser), dacă există, ar putea fi utile, de asemenea, pentru interpretarea studiului.

54. Pentru controlul calității, se propune colectarea datelor anterioare privind martorii și calcularea coeficienților de variație pentru datele numerice, în special pentru parametrii corelați cu detectarea perturbatorilor endocrini. Aceste date pot fi folosite în scop de comparație la evaluarea studiilor curente.

Raportul testului

55. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB-uri și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului dacă este altul decât apa.

Animale de testare:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

— justificarea, în cazul în care se folosesc alte specii decât șobolanul

Condiții de testare:

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— detalii privind formularea substanței chimice de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— conversia concentrației substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apa potabilă în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— descriere detaliată a procedurii de randomizare pentru selecția puilor pentru sacrificare, dacă aceștia sunt sacrificați.

Rezultate:

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— date privind răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și orice alte semne de toxicitate;

— durata gestației;

— efecte toxice sau de altă natură asupra reproducerii, puilor, creșterii postnatale etc.;

— natura, gravitatea și durata observațiilor clinice (reversibile sau nu);

— numărul de femele adulte cu ciclu estral normal sau anormal și durata ciclului;

— numărul de pui născuți vii și de pierderi după implantare;

— date privind greutatea corporală a puilor;

— AGD a tuturor puilor (și greutatea corporală în ziua măsurării AGD)

— retenția sfârcurilor la puii masculi;

— nivelurile hormonilor tiroidieni la pui din ziua 13 și masculi adulți (și femele și pui din ziua 4, dacă se măsoară)

— numărul de pui cu anomalii extrem de vizibile, o evaluare brută a organelor genitale externe, numărul de pui subdezvoltați;

— momentul decesului în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— numărul de implantări, dimensiunea seriei și valori ale greutății seriei la momentul înregistrării;

— greutatea corporală la sacrificare și date privind greutatea organelor în cazul animalelor părinți;

— rezultatele autopsiei;

— o descriere detaliată a constatărilor histopatologice;

— date privind absorbția (dacă există);

— tratarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

Interpretarea rezultatelor

56. Studiul va furniza evaluări ale toxicității pentru reproducere/dezvoltare, prin corelare cu administrarea de doze repetate (a se vedea punctele 5 și 6). Acesta ar putea indica dacă este necesar să se efectueze investigații suplimentare și ar putea oferi îndrumări în proiectarea studiilor ulterioare. Ar trebui să se consulte Documentul de orientare nr. 43 al OCDE pentru ajutor în interpretarea rezultatelor privind reproducerea și dezvoltarea (12). Documentul de orientare nr. 106 al OCDE privind evaluarea histologică a testelor endocrine și a testelor de reproducere la rozătoare (11) furnizează informații cu privire la pregătirea și evaluarea organelor (endocrine) și a frotiurilor vaginale care pot fi utile pentru această orientare privind testarea.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27-29 octombrie 1992. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 martie 1998. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 217), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(5) OCDE (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, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. și Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, partea B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, în Auston C.R. and Short R.V. (editori), 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. și 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) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 151), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 106), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 43), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Apendicele 1

DEFINIȚII [A SE VEDEA, DE ASEMENEA, ORIENTAREA NR. 150 A OCDE (6)]

Androgenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiandrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiestrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Activitatea antitiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol $T_{3)}$ în organismul unui mamifer.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Toxicitate pentru dezvoltare: manifestarea toxicității pentru reproducere, reprezentând afecțiuni prenatale, perinatale, postnatale, structurale sau funcționale ale progeniturii.

Dozarea este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării dozei.

Doză înseamnă cantitatea de substanță chimică de testat administrată. Doza este exprimată ca greutate a substanței chimice de testat pe unitatea de greutate corporală a animalului de experiență pe zi (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi) sau ca o concentrație constantă în regimul alimentar.

Toxicitatea evidentă este un termen general care descrie semne clare de toxicitate în urma administrării unei substanțe chimice de testat. Aceste semne ar trebui să fie suficiente pentru a permite o evaluare a pericolelor și ar trebui să fie de așa natură încât o creștere a dozei administrate să poată fi prevăzută a declanșa apariția unor semne de toxicitate severe și probabil moartea.

Afectarea fertilității reprezintă tulburări ale funcțiilor sau capacității de reproducere masculine sau feminine.

Toxicitate maternă: efecte adverse asupra femelelor gestante, care apar fie în mod specific (efect direct), fie în mod nespecific (efect indirect).

NOAEL este abrevierea pentru nivelul la care nu se observă niciun efect advers. Acesta este cel mai ridicat nivel de dozare la care nu se observă efecte adverse din cauza tratamentului.

Estrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Toxicitate pentru reproducere reprezintă efecte dăunătoare asupra descendenților și/sau afectarea funcțiilor sau a capacității de reproducere masculine și feminine.

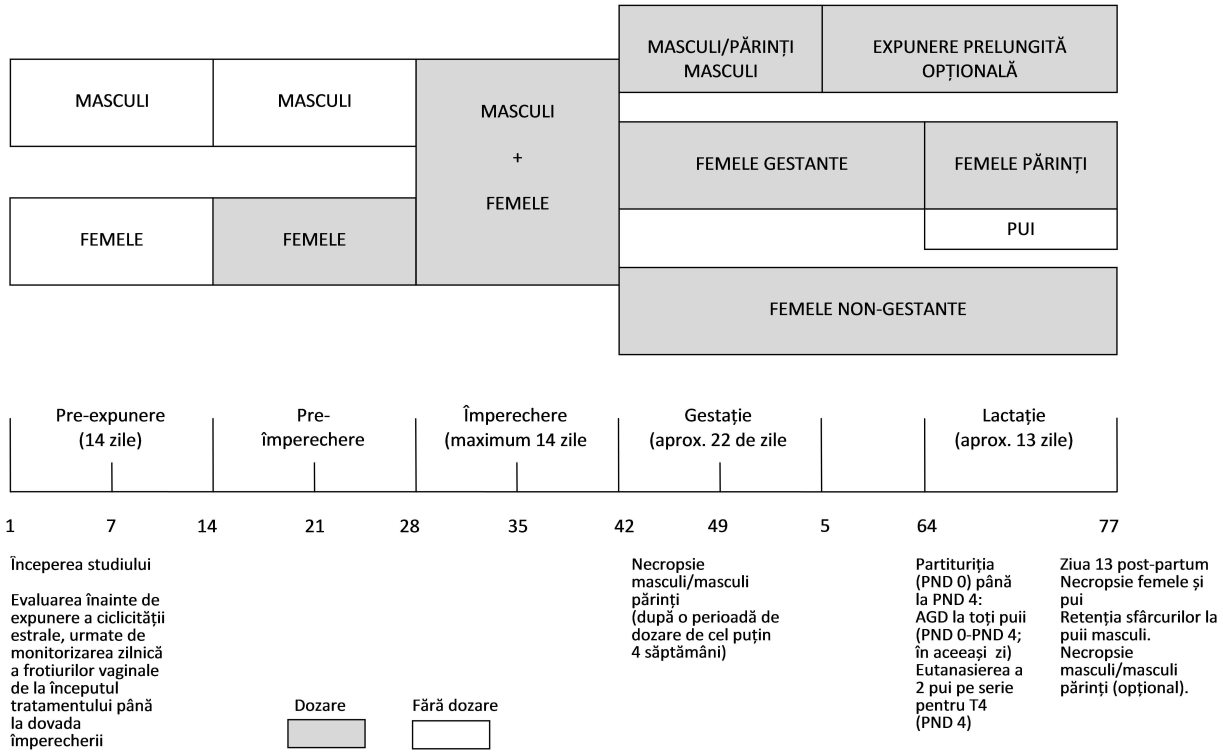
Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat(ă) utilizând această metodă de testare.

Activitatea tiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol $T_{3)}$ în organismul unui mamifer.

Validare înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acesteia pentru un anumit scop.

Apendicele 2

DIAGRAMĂ A SCHEMEI DE TRATAMENT CARE INDICĂ DURATA MAXIMĂ A STUDIULUI, PE BAZA UNEI PERIOADE DE ÎMPERECHERE COMPLETE DE 14 ZILE



Apendicele 3

RAPORT DE SINTEZĂ TABELAR CU EFECTELE ASUPRA REPRODUCERII/DEZVOLTĂRII

OBSERVAȚII	VALORI				
Dozaj (unități)	0 (martor)	…	…	…	…
Perechi începute (N)					
Ciclul estral (cel puțin durata medie și frecvența ciclurilor neregulate)					
Femele la care apare dovada copulației (N)					
Femele care au ajuns în gestație (N)					
Zile de concepție 1-5 (N)					
Zilele de concepție 6-...([1]) (N)					
Sarcină ≤ 21 de zile (N)					
Sarcină = 22 de zile (N)					
Sarcină ≥ 23 de zile (N)					
Femele cu pui născuți vii (N)					
Femele cu pui născuți vii în ziua 4 pp (N)					
Implanturi/femelă (media)					
Pui vii/femelă la naștere (media)					
Pui vii/femelă în ziua 4 (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) la naștere (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) în ziua 4 (media)					
Greutatea seriei la naștere (media)					
Greutatea seriei în ziua 4 (media)					
Greutatea puilor la naștere (media)					

OBSERVAȚII	VALORI				
Dozaj (unități)	0 (martor)	…	…	…	…
Greutatea puilor în momentul măsurării AGD (media la masculi, media la femele)					
AGD a puilor în aceeași zi postnatală, la naștere – ziua 4 (media la masculi, media la femele, se notează PND)					
Greutatea puilor în ziua 4 (media)					
Retenția sfârcurilor la pui masculi în ziua 13 (media)					
Greutatea puilor în ziua 13 (media)					
PUI ANORMALI					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu ≥ 2					
PIERDEREA PUILOR					
Implantații prenatale/postnatale (implantații minus născuți vii)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					
Postnatal (pui născuți vii minus pui vii în ziua postnatală 13)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					

([1]) ultima zi a perioadei de împerechere

B.64 STUDIU DE TOXICITATE CU DOZĂ REPETATĂ COMBINAT CU TESTUL DE DEPISTARE A TOXICITĂȚII PENTRU REPRODUCERE/DEZVOLTARE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 422 (2016). Orientările OCDE pentru testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic în contextul evoluțiilor științifice. Orientarea inițială nr. 422 privind testarea pentru depistare a fost adoptată în 1996, pe baza unui protocol pentru un „Test combinat cu doză repetată și de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare" discutat în cadrul a două reuniuni ale experților, la Londra, în 1990 (1) și la Tokyo în 1992 (2).

2. Această metodă de testare combină o componentă de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare, care se bazează pe experiența dobândită în statele membre ca urmare a utilizării metodei inițiale pe substanțele chimice existente în mare volum de producție și în cadrul unor teste de explorare cu substanțe martor pozitive (3) (4), precum și pe o componentă cu repetarea dozei de toxicitate, în concordanță cu orientarea nr. 407 a OCDE privind testarea (Studiu de toxicitate orală cu doză repetată de 28 de zile la rozătoare, corespunzător capitolului B.7 din prezenta anexă).

3. Această metodă de testare a fost actualizată cu puncte finale relevante privind perturbatorii endocrini, ca o continuare a activității cu prioritate ridicată inițiată de OCDE în 1998 în vederea revizuirii orientărilor existente privind testarea și a elaborării unor noi orientări privind testarea pentru depistarea și testarea unor potențiali perturbatori endocrini (5). În acest context orientarea nr. 407 privind testarea (corespunzătoare capitolului B.7 din prezenta anexă), a fost îmbunătățită în 2008 prin parametri adecvați pentru detectarea activității endocrine a substanțelor chimice de testat. În cadrul actualizării Orientării nr. 422 privind testarea, obiectivul a fost acela de a include câteva puncte finale relevante pentru perturbatori endocrini în orientările privind testele pentru depistare în cazul în care perioadele de expunere acoperă unele dintre perioadele sensibile din procesul de dezvoltare (perioadele prenatale sau postnatale timpurii).

4. Punctele finale relevante suplimentare selectate pentru perturbatorii endocrini fac parte, de asemenea, din TG nr. 443 privind testarea (Studiu extins de toxicitate pentru reproducere la o singură generație, corespunzător capitolului B.56 din prezenta anexă) au fost incluse în TG nr. 422 pe baza unui studiu de fezabilitate care abordează aspecte științifice și tehnice legate de includerea acestora, precum și de posibile adaptări ale modelului testului, care sunt necesare pentru includerea acestora (6).

5. Această metodă de testare este concepută pentru a genera informații limitate cu privire la efectele unei substanțe chimice de testat asupra performanței reproductive a masculilor și femelelor, cum ar fi funcția gonadelor, comportamentul de împerechere, concepția, dezvoltarea produsului de concepție și parturiția. Aceasta nu este o alternativă la metodele de testare existente B.31, B.34, B.35 sau B.56 și nici nu le înlocuiește.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

6. În analiza și evaluarea caracteristicilor toxice ale unei substanțe chimice de testat, determinarea toxicității orale folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale privind toxicitatea din teste de toxicitate acută. Acest studiu oferă informații cu privire la posibilele pericole pentru sănătate care pot apărea în urma expunerii repetate pe o perioadă de timp relativ limitată. Metoda cuprinde studiul de bază de toxicitate la doză repetată, care se poate folosi pentru substanțe chimice pentru care nu este justificat un studiu de 90 de zile (de exemplu, în cazul în care volumul de producție nu depășește anumite limite) sau ca studiu preliminar în cazul unui studiu pe termen lung. În desfășurarea studiului, ar trebui să se respecte principiile directoare și considerentele prezentate în documentul de orientare nr. 19 al OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale fără suferință pentru animalele de experiență utilizate în evaluări ale siguranței (7).

7. De asemenea, acesta cuprinde un test de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare și, prin urmare, poate fi utilizat, de asemenea, pentru a furniza informații inițiale cu privire la posibile efecte asupra performanțelor de reproducere ale masculilor și femelelor, cum ar fi funcția gonadală, comportamentul de împerechere, concepția, dezvoltarea produsului de concepție și parturiția, fie într-o etapă timpurie de evaluare a proprietăților toxicologice ale substanțelor chimice de testat, fie cu privire la substanțe chimice de testat de interes. Această metodă de testare nu oferă informații complete cu privire la toate aspectele legate de reproducere și dezvoltare. În special, aceasta oferă doar mijloace limitate de detectare a manifestărilor postnatale ale expunerii prenatale sau a efectelor care pot fi induse în timpul expunerii postnatale. Printre altele, din cauza selectivității punctelor finale și a duratei scurte a studiului, această metodă nu va furniza dovezi pentru concluzii sigure privind inexistența efectelor pentru reproducere/dezvoltare. În plus, în absența datelor provenite din alte teste de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, rezultatele pozitive sunt utile pentru evaluarea inițială a pericolelor și contribuie la luarea deciziilor cu privire la necesitatea și calendarul testelor suplimentare.

8. Rezultatele obținute prin parametrii endocrini conecși ar trebui să fie evaluate în contextul „Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine" (8). În acest cadru conceptual, orientarea nr. 422 a OCDE privind testarea îmbunătățită se regăsește la nivelul 4 ca test *in vivo* care asigură date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante ale sistemului endocrin. Însă este posibil ca un semnal endocrin să nu fie considerat drept o dovadă suficientă în sine pentru faptul că substanța chimică de testat este un perturbator endocrin.

9. Această metodă de testare pune accentul, de asemenea, pe efectele neurologice ca punct final specific, precum și pe nevoia unor observații clinice riguroase, pentru a se obține cât mai multe informații posibil. Metoda ar trebui să presupună identificarea substanțelor chimice cu potențial neurotoxic, care ar putea justifica desfășurarea în continuare a unor studii mai aprofundate cu privire la acest aspect. În plus, metoda poate oferi, de asemenea, o indicație elementară a efectelor imunologice.

10. În absența datelor provenite din alte studii de toxicitate sistemică, de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, de neurotoxicitate și/sau imunotoxicitate, rezultatele pozitive sunt utile pentru evaluarea inițială a pericolelor și contribuie la luarea deciziilor cu privire la necesitatea și calendarul testelor suplimentare. Testul poate fi deosebit de util ca parte a setului de date cu informații de depistare al OCDE (SIDS) pentru evaluarea substanțelor chimice existente pentru care există puține informații toxicologice sau pentru care nu există astfel de informații, și care poate servi drept alternativă la efectuarea a două teste separate pentru toxicitatea la doze repetate (TG nr. 407 a OCDE, corespunzătoare capitolului B.7 din prezenta anexă) și pentru toxicitate pentru reproducere/dezvoltare (TG nr. 421 a OCDE, corespunzătoare capitolului B.63 din prezenta anexă). Acesta poate fi utilizat, de asemenea, ca studiu pentru stabilirea dozelor pentru studii mai ample privind reproducerea/dezvoltarea sau în alte cazuri considerate relevante.

11. În general, se presupune că există diferențe de sensibilitate între animalele gestante și animalele negestante. Prin urmare, ar putea fi mai complicat să se stabilească niveluri ale dozelor în cadrul acestui test combinat, care să fie adecvate pentru evaluarea toxicității sistemice generale și a toxicității specifice pentru reproducere/dezvoltare, decât în cazul în care sunt efectuate teste individuale separat. În plus, interpretarea rezultatelor testelor în ceea ce privește toxicitatea sistemică generală ar putea fi mai dificilă decât atunci când se realizează un studiu cu doză repetată separat, în special atunci când parametrii serului și ai histopatologiei nu sunt evaluați în același timp în cadrul studiului. Din cauza acestor complicații tehnice, este necesară o experiență considerabilă în ceea ce privește testarea toxicității pentru efectuarea prezentului test combinat de depistare. Pe de altă parte, în afara numărului mai mic de animale implicate, testul combinat poate oferi mijloace mai bune de diferențiere a efectelor directe asupra reproducerii/dezvoltării de cele care sunt secundare altor efecte (sistemice).

12. În cadrul acestui test, perioada de dozare este mai lungă decât cea din cadrul unui studiu convențional cu doză repetată de 28 de zile. Însă, acesta utilizează mai puține animale de fiecare sex pe grup, în comparație cu situația în care se efectuează un test convențional cu doze repetate de 28 de zile pe lângă un test de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare.

13. Această metodă de testare presupune administrarea substanței chimice de testat pe cale orală. Dacă se utilizează alte căi de expunere, este posibil să fie necesare modificări.

14. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

15. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

16. Substanța chimică de testat se administrează în doze gradate mai multor grupuri de masculi și femele. Doza pentru masculi ar trebui să fie administrată pentru o perioadă de cel puțin patru săptămâni până în ziua dinaintea sacrificării planificate inclusiv (aceasta include cel puțin două săptămâni înainte de împerechere, perioada de împerechere și aproximativ două săptămâni după împerechere). Având în vedere perioada de dozare limitată de pre-împerechere a masculilor, este posibil ca fertilitatea să nu fie un indicator deosebit de sensibil al toxicității testiculare. Prin urmare, este esențială o examinare histologică detaliată a testiculelor. Combinația dintre o perioadă de dozare de pre-împerechere de

două săptămâni și de formulare ulterioară a observațiilor privind împerecherea/fertilitatea și o perioadă de dozare generală de cel puțin patru săptămâni, urmată de histopatologia detaliată a gonadelor de sex masculin, este considerată suficientă pentru a permite detectarea majorității efectelor asupra fertilității masculine și a spermatogenezei.

17. Femelelor ar trebui să li se administreze doze pe toată durata studiului. Aceasta include două săptămâni înainte de împerechere (cu obiectivul de a acoperi cel puțin două cicluri estrale complete), timpul variabil până la concepție, durata sarcinii și cel puțin 13 zile după parturiție, până în ziua dinaintea eutanasierii planificate inclusiv.

18. Durata studiului, în urma aclimatizării și evaluării ciclului estral înainte de dozare, depinde de performanța femelei și este de aproximativ 63 de zile, [cel puțin 14 zile înainte de împerechere, (până la) 14 zile de împerechere, 22 de zile de gestație, 13 zile de lactație].

19. În perioada de administrare, animalele sunt examinate cu atenție zilnic, în vederea identificării unor eventuale semne de toxicitate. Animalele care au murit sau care au fost eutanasiate în timpul testului sunt supuse unei autopsii, iar cele care supraviețuiesc până la sfârșitul testului sunt eutanasiate și autopsiate.

DESCRIEREA METODEI

Selecția speciilor de animale

20. Această metodă de testare este concepută pentru a fi utilizată la șobolan. În cazul în care parametrii specificați în prezenta orientare TG nr. 422 privind testarea sunt investigați la o altă specie de rozătoare, ar trebui să se prezinte o justificare detaliată. În cadrul programului de validare internațional pentru detectarea factorilor perturbatori endocrini cu privire la TG nr. 407, șobolanul a fost singura specie folosită. Nu ar trebui să se utilizeze sușe cu fecunditate scăzută sau cu o incidență a defectelor de dezvoltare cunoscută a fi ridicată. Ar trebui să se folosească animale virgine sănătoase, care nu au fost supuse anterior unor proceduri experimentale. Animalele de experiență ar trebui să fie caracterizate în ceea ce privește specia, sușa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite ar trebui să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex. În cazul în care studiul este realizat cu titlu de studiu preliminar pentru un studiu pe termen lung sau pentru o întreagă generație, este de preferat să se utilizeze, în ambele studii, animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

Adăpostire și hrănire

21. Toate procedurile ar trebui să fie în conformitate cu standardele locale privind îngrijirea animalelor de laborator. Temperatura în spațiul de adăpostire a animalelor de experiență ar trebui să fie de 22 °C (± 3 °C). Umiditatea relativă ar trebui să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând perioade de 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al unei substanțe chimice de testat atunci când aceasta se administrează utilizând această metodă.

22. Animalele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici de același sex; animalele pot fi adăpostite individual dacă există o justificare științifică. În cazul cuștilor colective nu ar trebui să se depășească numărul de cinci animale în fiecare cușcă. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. Femelele gestante ar trebui să fie plasate în cuști individuale și prevăzute cu materiale pentru cuibărire. Femelele aflate în lactație vor fi plasate în cuști individuale împreună cu progeniturile acestora.

23. Hrana ar trebui să fie analizată în mod regulat în vederea identificării contaminanților. Ar trebui să se rețină un eșantion din hrană până la finalizarea raportului.

Pregătirea animalelor

24. Animalele adulte, tinere și sănătoase sunt distribuite în mod aleatoriu în grupuri și cuști de tratament. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate deplasărilor acestora. Animalele prezintă o identificare unică și sunt ținute în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

Prepararea dozelor

25. Se recomandă administrarea orală a substanței chimice de testat, cu excepția cazului în care se consideră că sunt adecvate alte căi de administrare. Atunci când se alege calea orală, substanța chimică de testat se administrează, de obicei, prin gavaj; însă, în mod alternativ, substanțele chimice de testat pot fi administrate, de asemenea, împreună cu hrana sau cu apa potabilă.

26. Dacă este necesar, substanța chimică de testat se dizolvă sau se suspendă într-un vehicul adecvat. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se aibă în considerare, în primul rând, utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. Pentru vehicule neapoase, ar trebui să fie cunoscute caracteristicile toxice ale vehiculului respectiv. Ar trebui să se determine stabilitatea și omogenitatea substanței chimice de testat în vehicul.

PROCEDURA

Numărul și sexul animalelor

27. Se recomandă ca, la început, fiecare grup să aibă cel puțin 10 masculi și 12-13 femele. Femelele vor fi evaluate înainte de expunere pentru ciclicitatea estrală, iar animalele la care nu se produc cicluri tipice de 4-5 zile nu vor fi incluse în studiu; prin urmare, se recomandă femele suplimentare pentru a obține 10 femele într-un grup. Cu excepția cazului în care apar efecte toxice pronunțate, se preconizează că acesta va asigura cel puțin 8 femele gestante în fiecare grup, care reprezintă, în mod normal, numărul minim acceptabil de femele gestante într-un grup. Obiectivul este să se asigure un număr suficient de sarcini și pui pentru a asigura o evaluare semnificativă a potențialului substanței chimice de testat de a afecta fertilitatea, sarcina și comportamentul matern și de supt, precum și creșterea și dezvoltarea puilor F_1, de la concepție până în ziua 13 a perioadei post-partum. Dacă sunt planificate eutanasieri intermediare, numărul ar trebui suplimentat cu numărul de animale planificate să fie eutanasiate înainte de încheierea studiului. În plus, ar trebui să se aibă în vedere un grup satelit suplimentar de cinci animale pe grup pe sex în grupul martor și în grupul cu doza maximă, pentru observații privind reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor sistemice toxice pe parcursul a minimum 14 zile după tratament. Animalele din grupurile satelit nu vor fi împerecheate și, în consecință, nu sunt utilizate pentru evaluarea toxicității pentru reproducere/dezvoltare.

Dozare

28. În general, ar trebui să se utilizeze cel puțin trei grupuri de testare tratate și un grup martor. Dacă nu există date generale adecvate privind toxicitatea, se realizează un studiu de stabilire a intervalului (animale din aceeași sușă și sursă), pentru a contribui la determinarea dozelor care vor fi administrate. Cu excepția tratării cu substanța chimică de testat, animalele din grupul martor ar trebui să fie tratate în mod identic cu animalele din grupul de testare. Dacă pentru administrarea substanței chimice de testat se folosește un vehicul, acesta se administrează grupului martor în volumul maxim utilizat.

29. Dozele ar trebui să fie selectate ținându-se cont de toxicitatea existentă și de datele toxico-cinetice disponibile. De asemenea, ar trebui să se țină seama de faptul că ar putea exista diferențe de sensibilitate între animalele gestante și cele negestante. Ar trebui să fie aleasă doza cea mai mare pentru a induce efecte toxice, însă nu moartea sau o suferință evidentă. Ulterior, ar trebui să se selecteze o serie de doze descrescătoare pentru a demonstra orice răspuns legat de doză și faptul că nu există efecte adverse la doza minimă. Cele mai bună soluții constau de multe ori în alegerea a două sau patru intervale, iar adăugarea unui al patrulea grup de testare este adesea preferabilă utilizării unor intervale foarte mari (de exemplu, care depășesc factorul 10) între dozaje.

30. În prezența toxicității generale observate (de exemplu, greutate corporală redusă, efecte asupra ficatului, plămânilor sau rinichilor etc.) sau a altor schimbări care pot să nu constituie răspunsuri toxice (de exemplu, consum de hrană redus, mărirea ficatului), efectele observate asupra punctelor finale endocrine sensibile ar trebui să fie interpretate cu precauție.

Testul valorilor-limită

31. Dacă un studiu oral efectuat pe baza procedurilor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării împreună cu hrana, la un procent echivalent în hrană sau în apa de băut (în funcție de valorile greutății corporale), nu produce efecte toxice detectabile și dacă datele despre substanțe cu structuri asemănătoare nu indică toxicitatea, atunci este posibil să nu fie necesar să se realizeze un studiu complet cu mai multe doze. Testul la valori-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate. Pentru alte tipuri de administrare, cum sunt inhalarea sau aplicarea dermică, este posibil ca proprietățile fizice și chimice ale substanțelor chimice de testat să determine deseori nivelul maxim posibil al expunerii.

Administrarea dozelor

32. Animalelor li se administrează substanța chimică de testat zilnic, timp de 7 zile pe săptămână. Când substanța chimică de testat este administrată prin gavaj, administrarea ar trebui să fie în doză unică la animale, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. Volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor chimice de testat

iritante sau corozive care vor produc, de regulă, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile de dozare.

33. Pentru substanțele chimice de testat administrate în hrană sau în apa potabilă, este important să se asigure că respectivele cantități de substanță chimică de testat implicate nu influențează nutriția normală sau echilibrul hidric. Dacă substanța chimică de testat se administrează în hrană, aceasta poate fi administrată fie într-o concentrație constantă în alimentație (ppm), fie la o doză constantă în raport cu greutatea corporală a animalelor; alternativa utilizată ar trebui precizată. În cazul unei substanțe chimice de testat administrate prin gavaj, doza ar trebui să se administreze la aproximativ aceeași oră în fiecare zi și să fie ajustată cel puțin săptămânal pentru a menține un nivel constant al dozei în funcție de greutatea corporală a animalului. În cazul în care studiul combinat este utilizat cu titlu preliminar unui studiu de toxicitate pentru reproducere pe termen lung sau complet, în ambele studii ar trebui să se utilizeze o alimentație similară.

Schema de tratament

34. Administrarea dozelor la ambele sexe ar trebui să înceapă cu două săptămâni înainte de împerechere, după ce acestea au fost aclimatizate timp de cel puțin cinci zile, iar femelele au fost supuse unui control privind ciclurile estrale normale (într-o perioadă de pre-tratament de 2 săptămâni). Studiul ar trebui să fie planificat în așa fel încât evaluarea ciclului estral să înceapă de îndată ce animalele au ajuns la maturitatea sexuală deplină. Aceasta ar putea varia ușor între diferite sușe de șobolani din diferite laboratoare, de exemplu, la șobolanii Sprague Dawley aceasta este la vârsta de 10 săptămâni, la șobolanii Wistar la vârsta de aproximativ 12 săptămâni. Femelele cu pui ar trebui să fie eutanasiate în ziua 13 post-partum sau imediat după aceea. Pentru a permite nealimentarea pe timpul nopții a femelelor înainte de recoltarea sângelui (dacă se preferă această opțiune), nu este necesar ca femelele și puii lor să fie eutanasiați în aceeași zi. Ziua nașterii (și anume, atunci când s-a încheiat parturiția) este definită ca fiind ziua 0 post-partum. Femelele care nu prezintă semne ale copulației sunt eutanasiate după 24-26 zile de la ultima zi a perioadei de împerechere. Administrarea dozelor continuă la ambele sexe în perioada de împerechere. Masculilor ar trebui să li se administreze în continuare doze după perioada de împerechere cel puțin până la încheierea perioadei de dozare minime totale de 28 de zile. Apoi aceștia sunt eutanasiați sau, alternativ, sunt reținuți pentru administrarea în continuare a dozelor pentru o posibilă desfășurare a unei a doua împerecheri, dacă se consideră că este cazul.

35. Administrarea de doze zilnice la femelele parentale ar trebui să continue pe întreaga durată a sarcinii și cel puțin până în ziua 13 post-partum inclusiv sau cu o zi înainte de sacrificare. În cazul studiilor în care substanța chimică de testat se administrează prin inhalare sau subcutanat, dozele ar trebui să fie administrate în continuare cel puțin până în ziua 19 de sarcină inclusiv și administrate din nou cât mai curând posibil, dar nu mai târziu de ziua post-fătare (PND) 4.

36. Animalele dintr-un grup satelit planificate pentru observații ulterioare, dacă acestea sunt incluse, nu sunt împerecheate. Acestea ar trebui păstrate timp de cel puțin încă 14 zile după prima eutanasiere programată a femelelor, fără a se aplica un tratament pentru a detecta apariția tardivă sau persistența efectelor toxice ori recuperarea de pe urma acestora.

37. În apendicele 2 este prezentată o diagramă a schemei de tratament.

Cicluri estrale

38. Înainte de a începe tratamentul, ar trebui să se monitorizeze ciclurile estrale pentru femelele studiate cu ciclicitate regulate (a se vedea punctul 27). De asemenea, frotiul vaginal ar trebui să fie monitorizat zilnic de la începutul perioadei de tratament, până la obținerea dovezii împerecherii. În cazul în care există motive de îngrijorare cu privire la efecte de criză acută care ar putea modifica ciclurile estrale odată cu inițierea administrării dozelor, laboratoarele pot să expună animalele de experiență timp de două săptămâni, apoi să colecteze frotiuri vaginale zilnic pentru a monitoriza ciclul estral timp de cel puțin două săptămâni în perioada de pre-împerechere, cu o continuare a monitorizării în perioada de împerechere până când există dovezi ale împerecherii. Atunci când se obțin celule vaginale/cervicale, ar trebui să se evite orice perturbare a mucoasei, care ar putea induce pseudogestația (8) (9).

Procedura de împerechere

39. De regulă, în prezentul studiu ar trebui utilizate împerecheri 1:1 (un mascul la o femelă). Pot exista excepții în cazul deceselor ocazionale ale masculilor. Femela ar trebui să fie plasată împreună cu același mascul până când se observă semne ale copulației sau au trecut două săptămâni. În fiecare dimineață, femelele ar trebui să fie examinate pentru a se constata prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 a gestației este definită ca fiind ziua în care se confirmă dovada împerecherii (se constată existența unui dop vaginal sau a spermei). În cazul în care împerecherea a eșuat, se poate lua în calcul reîmperecherea femelelor în cauză cu masculi din același grup care și-au dovedit capacitatea reproductivă.

Dimensiunea seriei de pui

40. În ziua 4 de după naștere, dimensiunea fiecărei serii de pui poate fi ajustată prin eliminarea puilor suplimentari printr-o selecție aleatorie pentru a obține, pe cât posibil, patru sau cinci pui per sex per serie, în funcție de dimensiunea normală a seriei la sușa de șobolani utilizați. Ar trebui să se recolteze probe de sânge de la doi dintre puii în exces, care să fie grupate și utilizate pentru determinarea nivelurilor de T4 din ser. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu, pe baza greutății corporale sau a distanței anogenitale (AGD) nu este adecvată. Ori de câte ori numărul de pui masculi sau femele împiedică obținerea unui număr de patru sau cinci exemplare din fiecare sex per serie, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, șase masculi și patru femele). Nu se vor elimina pui dacă dimensiunea seriei va scădea sub ținta de sacrificare (8 sau 10 de pui/serie). Dacă există un singur pui peste obiectivul de sacrificare, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

41. Dacă dimensiunea seriei nu este ajustată, se sacrifică doi pui per serie în ziua 4, după naștere, și se iau probe de sânge pentru măsurarea concentrațiilor de hormoni tiroidieni din ser. Dacă este posibil, cei doi pui per serie ar trebui să fie pui de sex feminin pentru a rezerva puii masculi în vederea evaluării retenției mamelonului, cu excepția cazului în care în urma îndepărtării puilor respectivi nu mai rămân femele pentru evaluare la încheierea procesului. Nu se vor elimina pui în cazul în care dimensiunea seriei va scădea sub 8 sau 10 pui/serie (în funcție de dimensiunea normală a seriei în sușa de șobolani utilizată). Dacă există un singur pui peste dimensiunea normală a seriei, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

Observații

42. Ar trebui să se formuleze observații clinice generale cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Ar trebui să se consemneze starea de sănătate a animalelor. Toate animalele sunt examinate cel puțin de două ori pe zi, pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.

43. Toate animalele parentale ar trebui să fie supuse unor observații clinice detaliate înaintea primei expuneri (pentru a permite comparații la nivelul aceluiași individ) și cel puțin o dată pe săptămână în perioada următoare. Aceste observații ar trebui să fie formulate în afara cuștii animalelor, într-o incintă standard, și, de preferință, la aceeași oră în fiecare zi. Acestea ar trebui să fie înregistrate cu atenție; de preferat, utilizând sisteme de punctare definite în mod explicit de laboratorul de testare. Ar trebui să se depună eforturi pentru a se asigura un nivel minim al variațiilor de la nivelul condițiilor de laborator, iar observațiile sunt formulate, de preferință, de către observatori care nu sunt informați asupra tratamentului. Simptomele consemnate ar trebui să includă, printre altele, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, membranelor mucoase, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, mărimea pupilei, respirație anormală). Ar trebui să se consemneze, de asemenea, toate modificările de comportament, modificările posturii sau ale reacțiilor la manipulare, precum și apariția unor mișcări clonice sau tonice, a unor comportamente stereotipe (de exemplu, curățare excesivă, mișcări circulare repetate), parturiția dificilă sau prelungită sau orice comportament bizar (automutilare, mers cu spatele) (10).

44. O singură dată în timpul studiului, ar trebui să fie efectuată reactivitatea senzorială la diferiți stimuli (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali și proprioceptivi) (8) (9) (11), evaluarea forței de prindere (12) și evaluarea activității motorii (13) la cinci masculi și cinci femele, selectați în mod aleatoriu din fiecare grup. Detalii suplimentare referitoare la procedurile care ar putea fi urmate sunt prezentate în referințele bibliografice respective. Însă, ar putea fi utilizate, de asemenea, proceduri alternative celor menționate. La masculi, aceste observații funcționale ar trebui să fie formulate către sfârșitul perioadei de administrare a dozelor, cu puțin timp înainte de momentul programat pentru eutanasiere, dar înainte de recoltarea de sânge pentru analize hematologice sau chimice clinice (a se vedea punctele 53-56, inclusiv nota de subsol 1). Femelele ar trebui să fie într-o stare similară din punct de vedere fiziologic în cursul acestor teste funcționale și ar trebui, de preferință, să fie testate o singură dată în ultima săptămână de lactație (de exemplu, zilele de lactație LD 6-13), cu puțin timp înainte de ziua planificată pentru eutanasiere. În măsura în care este posibil, se reduc la minimum perioadele de separare a femelelor de pui.

45. Observațiile funcționale formulate o singură dată spre sfârșitul studiului ar putea fi omise atunci când studiul este realizat cu titlu preliminar unui studiu subcronic (de 90 de zile) unui studiu pe termen lung. În acest caz, observațiile funcționale ar trebui să facă parte din acest studiu realizat în continuare. Pe de altă parte, disponibilitatea datelor despre observații funcționale formulate ca urmare a acestui studiu cu administrare de doze repetate ar putea spori capacitatea de a alege doze pentru un studiu ulterior subcronic sau pe termen lung.

46. În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi, de asemenea, omise pentru grupuri care prezintă, de altfel, simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar influența semnificativ desfășurarea testului funcțional.

47. Durata gestației ar trebui să fie înregistrată, calculându-se din ziua 0 de gestație. Fiecare serie de pui ar trebui să fie examinată cât mai curând posibil după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, puii născuți morți, puii vii, puii subdezvoltați (puii care sunt semnificativ mai mici decât puii corespunzători din grupul martor) și prezența unor anomalii macroscopice.

48. În termen de 24 de ore de la parturiție, puii vii ar trebui să fie numărați și separați pe sexe, iar seriile de pui cântărite (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Pe lângă observațiile privind animalele părinți (a se vedea punctele 43 și 44), ar trebui să fie consemnat orice comportament anormal al puiului.

49. Este necesar ca AGD a fiecărui pui să fie măsurată în aceeași zi post-natală de la PND 0 până la PND 4. Greutatea corporală a puilor ar trebui să fie consemnează în ziua în care se măsoară AGD, aceasta trebuind să fie normalizată la o valoare aferentă dimensiunii puiului, de preferat, rădăcina cubică a greutății corporale (14). Numărul sfârcurilor/aureolelor la puii masculi ar trebui să fie calculat în PND 12 sau 13, astfel cum se recomandă în Orientarea nr. 151 a OCDE (15).

Greutate corporală și consumul de hrană/apă

50. Masculii și femelele ar trebui să fie cântărite în prima zi a administrării dozelor, apoi cel puțin săptămânal și la sfârșit. În timpul sarcinii, femelele ar trebui să fie cântărite în zilele 0, 7, 14 și 20 și în termen de 24 de ore de la parturiție (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Aceste observații ar trebui să fie consemnate individual pentru fiecare animal adult.

51. În perioada de pre-împerechere, de sarcină și de alăptare, consumul de alimente ar trebui să fie măsurat cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană în timpul împerecherii este opțională. Pe parcursul acestor perioade, consumul de apă ar trebui, de asemenea, să fie măsurat atunci când substanța chimică de testat este administrată în mediul respectiv.

Hematologie

52. O dată pe parcursul studiului, următoarele examinări hematologice ar trebui să fie efectuate la cinci masculi și cinci femele selectate aleatoriu din fiecare grup: hematocritul, concentrațiile de hemoglobină, numărul de eritrocite, reticulocitele, numărul total de leucocite și formula leucocitară diferențiată, numărul de trombocite și timpul/potențialul de coagulare. Printre alte determinări care ar trebui să fie efectuate, în cazul în care substanța chimică de testat sau eventualii săi metaboliți au sau se presupune că au proprietăți oxidante, se numără concentrația de methemoglobină și corpii Heinz.

53. Probele de sânge ar trebui să fie prelevate dintr-un loc desemnat. În timpul eșantionării, femelele ar trebui să se afle într-o stare similară din punct de vedere fiziologic. Pentru a evita dificultățile practice legate de variabilitatea declanșării gestației, recoltarea sângelui la femele se poate face la sfârșitul perioadei de pre-împerechere, ca alternativă la eșantionare imediat înainte de procedura de eutanasiere a animalelor sau în cadrul acesteia. Probele de sânge de la masculi ar trebui să fie prelevate, de preferință, înainte de sau în cadrul procedurii de eutanasiere a animalelor. În mod alternativ, recoltarea de sânge la masculi poate fi realizată, de asemenea, la sfârșitul perioadei de pre-împerechere, atunci când acest moment a fost preferat pentru femele.

54. Probele de sânge ar trebui să fie păstrate în condiții adecvate.

Biochimia clinică

55. Determinările de biochimie clinică în scopul de a investiga efectele toxice majore asupra țesuturilor și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului, ar trebui să fie realizate pe probe de sânge prelevate de la cinci masculi și cinci femele selectați din fiecare grup. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană în noaptea dinaintea recoltării ([1]). Investigațiile plasmei sau ale serului ar trebui să includă analizele pentru sodiu, potasiu, glucoză, colesterolul total, uree, creatinină, proteine totale și albumină, cel puțin pentru două enzime revelatoare ale efectelor hepatocelulare (cum ar fi alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza și sorbitol dezhidrogenaza) și acizii biliari. În anumite împrejurări, valorile de măsurare a unor enzime suplimentare (de origine hepatică sau de altă origine) și a bilirubinei pot furniza informații utile.

56. Sunt prelevate probe de sânge dintr-un anumit loc pe baza următorului calendar:

— de la cel puțin doi pui pe serie în ziua 4, după naștere, în cazul în care numărul puilor permite acest lucru (a se vedea punctele 40-41)

— de la toate femelele și de la cel puțin doi pui pe serie la încheiere, în ziua 13, și

— de la toți masculii adulți, la încheiere

Toate probele de sânge sunt păstrate în condiții adecvate. Sunt analizate probe de sânge de la pui din ziua 13 și de la masculii adulți pentru identificarea nivelurilor de hormoni tiroidieni din ser (T4). Dacă se consideră că este relevant, sunt efectuate analize suplimentare ale T4 din probele de sânge de la femele și de la puii din ziua 4. Opțional, dacă se consideră relevant, ar putea fi măsurați și alți hormoni. Probele de sânge ale puilor pot fi grupate pe serii pentru analize ale hormonilor tiroidieni. Hormonii tiroidieni (T4 și TSH) ar trebui, de preferință, să fie măsurați ca „valoare totală”.

([1]) Pentru o serie de măsurători efectuate pe ser și plasmă, în special pentru glucoză, se recomandă să nu se administreze hrana peste noapte. Motivul principal pentru această preferință este că variabilitatea crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efecte mai subtile și să îngreuneze interpretarea. Pe de altă parte, însă, neadministrarea hranei pe timpul nopții poate să influențeze metabolismul general al animalelor (însărcinate), perturbă alăptarea și comportamentul de alăptare și, mai ales în studiile privind hrănirea, poate să perturbe expunerea zilnică la substanța chimică de testat. Dacă se adoptă decizia de nealimentare pe timpul nopții, ar trebui să fie realizate determinări biochimice clinice după formularea de observații funcționale în săptămâna a patra de studiu pentru masculi. Femelele ar trebui să fie reținute pentru încă o zi după ce au fost eliminați puii, de exemplu, în PND 13. Femelele ar trebui să nu fie alimentate în timpul nopții, între zilele de lactație 13-14, iar sângele terminal ar trebui să fie utilizat pentru identificarea parametrilor de chimie clinică.

57. Opțional, ar putea fi efectuate următoarele analize de urină la cinci masculi selectați aleatoriu din fiecare grup în ultima săptămână a studiului, cu recoltarea urinei într-un interval de timp; aspect, volum, osmolalitate sau densitate specifică, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

58. În plus, ar trebui să fie avute în vedere investigații asupra markerilor din ser care indică lezarea generală a țesuturilor. Alte determinări care ar trebui să fie efectuate dacă proprietățile cunoscute ale substanței chimice de testat pot sau sunt susceptibile de a afecta profilurile metabolice includ măsurarea calciului, a fosfatului, a trigliceridelor măsurate după perioada fără hrană, a glucozei după perioada fără hrană, a hormonilor specifici, a methemoglobinei și a colinesterazei. Acestea trebuie să fie identificate de la caz la caz.

59. Următorii factori pot influența variabilitatea și concentrațiile absolute ale valorilor hormonale determinate:

— momentul eutanasierii, din cauza variației diurne a concentrațiilor hormonale

— metoda de eutanasiere pentru a evita stresul nejustificat exercitat asupra animalelor, care poate afecta concentrațiile hormonale;

— seturile de testare pentru determinările hormonale, care pot varia prin curbele lor standard.

60. Probele de plasmă prevăzute în mod specific pentru determinarea hormonală ar trebui să fie obținute la momente comparabile din zi. Valorile numerice obținute la analiza concentrațiilor hormonale diferă în funcție de diferitele seturi de testare comerciale.

61. Dacă informațiile de referință istorice nu sunt adecvate, ar trebui să se aibă în vedere determinarea variabilelor hematologice și biochimice clinice înaintea începerii administrării dozelor sau, de preferință, la un grup de animale neincluse în grupurile experimentale. În cazul femelelor, datele trebuie să fie asigurate de la animale în lactație.

PATOLOGIE

Autopsie macroscopică

62. Toate animalele adulte cuprinse în studiu ar trebui să fie supuse unei autopsii generale complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavității craniene, toracice și abdominale, precum și a conținutului acestora. Se acordă o atenție deosebită organelor sistemului de reproducere. Ar trebui să se înregistreze numărul de locuri de implantare. Ar trebui să se examineze frotiurile vaginale în ziua autopsiei pentru a determina stadiul ciclului estral și pentru a permite corelarea cu histopatologia organelor de reproducere feminine.

63. Testiculele și epididimitele, precum și prostata și veziculele seminale cu glande coagulante în ansamblu, ale tuturor masculilor adulți ar trebui să fie curățate de țesuturile aderente, după caz, și greutatea umedă a acestora înregistrată cât mai curând posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În plus, greutățile opționale ale organelor ar putea include complexul muscular levatorul ani plus bulbocavernos, glandele Cowper și glandul penisului la masculi și ovarele (greutate umedă) cuplate cu uterul (inclusiv colul uterin) la femele; dacă sunt incluse, aceste greutăți ar trebui să fie colectate cât mai curând posibil după disecție. Ar trebui să se păstreze ovarele, testiculele, epididimurile, organele sexuale conexe și toate organele care prezintă leziuni macroscopice la toate animalele adulte.

64. De la toți masculii și femelele adulte și de la un pui mascul și un pui femelă din ziua 13, din fiecare serie, ar trebui să se păstreze glandele tiroide în cel mai adecvat mediu de fixare pentru examenul histopatologic prevăzut ulterior. După fixare ar putea fi determinată greutatea tiroidei. Curățarea ar trebui să fie făcută, de asemenea, foarte atent și doar după fixare, pentru a evita deteriorarea țesuturilor. Deteriorarea țesuturilor ar putea compromite analiza histopatologică. Ar trebui să se recolteze probe de sânge dintr-un loc desemnat imediat înainte de procedura de eutanasiere a animalelor sau în cadrul acesteia, care să fie păstrate în condiții adecvate (a se vedea punctul 56).

65. În plus, pentru cel puțin cinci masculi și femele adulte, care sunt selectați aleatoriu din fiecare grup (în afară de cele muribunde și/sau eutanasiate înainte de încheierea studiului), ar trebui să se curețe ficatul, rinichii, glandele suprarenale, timusul, splina, creierul și inima de orice țesuturi aderente, după caz, și să se consemneze greutatea umedă a acestora cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. Țesuturile următoare ar trebui să fie păstrate în cel mai adecvat mediu de fixare atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut ulterior: toate țesuturile care prezintă leziuni macroscopice, encefalul (regiuni reprezentative: creierul mare, cerebelul și puntea), măduva spinării, ochiul, stomacul, intestinul subțire, intestinul gros (inclusiv plăcile Peyer), ficatul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, timusul, tiroida, traheea și plămânii (conservați prin umflare cu fixativ și imersie

ulterioară), gonadele (testiculele și ovarele), organele genitale anexe (de exemplu, uterul și colul, epididimul, prostata + veziculele seminale cu glandele coagulante), vaginul, vezica urinară, ganglionii limfatici [în afară de cel mai apropiat ganglion de drenare, ar trebui să fie prelevat încă un ganglion limfatic, conform experienței laboratorului (16)], nervul periferic (sciatic sau tibial), de preferință foarte aproape de mușchi, mușchiul scheletic și osul cu măduvă osoasă (secțiune sau, ca alternativă, aspirat de măduvă osoasă proaspăt fixat pe lamă). Se recomandă fixarea testiculelor prin imersie în fixator Bouin sau Davidson modificat (16) (17) (18); pentru aceste țesuturi nu se recomandă utilizarea formolului. Tunica albuginea ar putea fi perforată ușor și superficial cu un ac la ambii poli ai organului pentru a permite pătrunderea rapidă a fixatorului. Observațiile clinice și cele de altă natură pot sugera necesitatea examinării unor țesuturi suplimentare. Ar trebui conservate și alte organe considerate posibile organe-țintă pentru substanța chimică de testat, având în vedere proprietățile cunoscute ale acesteia.

66. Următoarele țesuturi pot furniza indicații valoroase privind efectele asupra sistemului endocrin: gonadele (ovarele și testiculele), organele sexuale accesorii (uterul, inclusiv colul uterin, epididimul, veziculele seminale cu glandele coagulante, prostata dorso-laterală și ventrală), vaginul, hipofiza, glanda mamară masculină și glanda suprarenală. Modificările glandelor mamare masculine nu au fost suficient documentate dar acest parametru poate fi foarte sensibil la substanțe cu acțiune estrogenică. Observarea organelor/țesuturilor care nu sunt enumerate la punctul 65 este opțională.

67. Puii morți și puii eutanasiați în ziua 13 post-partum, sau imediat după aceea, ar trebui să fie cel puțin examinați cu atenție la exterior pentru identificarea anomaliilor macroscopice. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită organelor genitale de reproducere externe, care ar trebui să fie examinate pentru identificarea unor modificări în dezvoltare.

Histopatologie

68. Ar trebui să se efectueze un examen histopatologic complet al organelor și țesuturilor conservate de la animalele selectate din grupurile martor și grupurile tratate cu doza maximă (se pune un accent deosebit pe fazele spermatogenezei la gonadele masculine și pe histopatologia structurii celulare testiculare interstițiale). Ar putea fi examinată, dacă este necesar, glanda tiroidă la pui la pui și la animalele adulte rămase. Aceste examene ar trebui să fie extinse la animalele din grupuri tratate cu alte doze, dacă se constată modificări legate de tratament la grupul tratat cu doză mare. Ghidul privind histopatologia (10) prezintă detalii suplimentare privind disecția, fixarea, secționarea și histopatologia țesuturilor endocrine.

69. Ar trebui să se examineze toate leziunile macroscopice. Pentru a contribui la identificarea NOAEL, ar trebui să se examineze organele-țintă din alte grupuri de dozare, în special din grupuri pentru care s-a susținut existența NOAEL.

70. Atunci când se folosește un grup satelit, ar trebui să se efectueze un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

71. Ar trebui să fie furnizate date despre fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să fie sintetizate în format tabelar, prezentându-se, pentru fiecare grup de testare, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, data decesului sau a eutanasierii, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de animale care prezintă semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și gravitatea efectelor toxice, tipul de modificări histopatologice și toate datele relevante privind seriile. În apendicele 3 este prezentat un format tabelar de raport de sinteză care s-a dovedit a fi foarte util pentru evaluarea efectelor privind reproducerea/dezvoltarea.

72. Dacă este posibil, rezultatele numerice ar trebui să fie evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Pentru comparațiile efectelor pe un interval de dozare ar trebui să se evite recurgerea la teste t multiple. Metodele statistice ar trebui să fie alese în faza de proiectare a studiului. Analiza statistică a AGD și a retenției sfârcurilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luate în considerare efectele asupra seriei. Dacă este cazul, seria constituie unitatea de analiză. Analiza statistică a greutății corporale a puilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luată în considerare dimensiunea seriei. Din cauza dimensiunilor limitate ale studiului, analizele statistice sub formă de teste de „semnificație" au o valoare limitată pentru multe puncte finale, în special punctele finale privind reproducerea. Unele dintre cele mai utilizate metode, în special testele parametrice pentru măsurarea tendinței centrale, nu sunt adecvate. În cazul în care se utilizează analize statistice, atunci metoda aleasă ar trebui să fie adecvată pentru distribuirea variabilei examinate și să fie aleasă înainte de începerea studiului.

Evaluarea rezultatelor

73. Constatările acestui studiu de toxicitate ar trebui să fie evaluate sub aspectul efectelor observate, al autopsiei și al constatărilor microscopice. Evaluarea va include relația dintre doza de substanță chimică de testat și prezența sau absența, incidența și gravitatea unor anomalii, inclusiv leziuni macroscopice, organe țintă identificate, efecte asupra fertilității, anomalii clinice, efecte asupra performanței de reproducere și a seriei, modificări ale greutății corporale, efecte asupra mortalității și orice alte efecte toxice.

74. Din cauza perioadei scurte de tratament a masculului, histopatologia testiculelor și a epididimitelor ar trebui luată în considerare împreună cu datele privind fertilitatea la evaluarea efectelor de reproducere la masculi. Utilizarea datelor istorice privind martorii cu privire la reproducere/dezvoltare (de exemplu, pentru dimensiunea seriei, AGD, retenția sfârcurilor, nivelurile T4 din ser), dacă există, ar putea fi utile, de asemenea, pentru interpretarea studiului.

75. Pentru controlul calității, se propune colectarea datelor anterioare privind martorii și calcularea coeficienților de variație pentru datele numerice, în special pentru parametrii corelați cu detectarea perturbatorilor endocrini. Aceste date pot fi folosite în scop de comparație la evaluarea studiilor curente.

Raportul testului

76. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB-uri și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului dacă este altul decât apa.

Animale de testare:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

— justificarea, în cazul în care se folosesc alte specii decât șobolanul

Condiții de testare:

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— detalii privind formularea substanței chimice de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— conversia concentrației substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apa potabilă în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— descriere detaliată a procedurii de randomizare pentru selecția puilor pentru sacrificare, dacă aceștia sunt sacrificați.

Rezultate:

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— date privind răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și orice alte semne de

— toxicitate;

— durata gestației; efecte toxice sau de altă natură asupra reproducerii, puilor, creșterii postnatale etc.;

— natura, gravitatea și durata observațiilor clinice (reversibile sau nu);

— evaluările activității senzoriale, a forței de prindere și a activității motorii;

— examenele hematologice și valorile de referință relevante;

— examenele de biochimie clinică și valorile de referință relevante;

— numărul de femele adulte cu ciclu estral normal sau anormal și durata ciclului;

— numărul de pui născuți vii și de pierderi după implantare;

— numărul de pui cu anomalii vizibile macroscopice; evaluarea brută a organelor genitale externe, a numărului de pui subdezvoltați;

— momentul decesului în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— numărul de implantări, dimensiunea seriei și valori ale greutății seriei la momentul înregistrării;

— date privind greutatea corporală a puilor;

— AGD a tuturor puilor (și greutatea corporală în ziua măsurării AGD)

— retenția sfârcurilor la puii masculi;

— nivelurile hormonilor tiroidieni la pui din ziua 13 și masculi adulți (și femele și pui din ziua 4, dacă se măsoară)

— greutatea corporală la sacrificare și date privind greutatea organelor în cazul animalelor părinți;

— rezultatele autopsiei;

— o descriere detaliată a constatărilor histopatologice;

— date privind absorbția (dacă există);

— tratarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

Interpretarea rezultatelor

77. Studiul va furniza evaluări ale toxicității pentru reproducere/dezvoltare, prin corelare cu administrarea de doze repetate. În mod specific, întrucât accentul este plasat atât pe punctele finale de toxicitate generală, cât și pe cele de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, rezultatele studiului vor permite diferențierea între efectele asupra reproducerii/dezvoltării care se produc în absența toxicității generale și cele care se manifestă doar la niveluri care sunt toxice, de asemenea, pentru animalele părinți (a se vedea punctele 7-11). Acesta ar putea indica dacă este necesar să se efectueze investigații suplimentare și ar putea oferi îndrumări în proiectarea studiilor ulterioare. Ar trebui să se consulte Documentul de orientare nr. 43 al OCDE pentru ajutor în interpretarea rezultatelor privind reproducerea și dezvoltarea (19). Documentul de orientare nr. 106 al OCDE privind evaluarea histologică a testelor endocrine și a testelor de reproducere la rozătoare (16) furnizează informații cu privire la pregătirea și evaluarea organelor (endocrine) și a frotiurilor vaginale care pot fi utile pentru această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27-29 octombrie 1992. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. și 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. și Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 martie 1998, Dispponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris

(6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 217), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) OCDE (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, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. și Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, partea B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, în Auston C.R. and Short R.V. (editori), 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 (nr. 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. și 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. și 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 și 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) OCDE (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 (nr. 151). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(16) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 106) Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(17) Hess RA și Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. În: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE și Heindel JJ (editori). 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) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 43), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(20) OCDE (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Apendicele 1

DEFINIȚII [A SE VEDEA, DE ASEMENEA, ORIENTAREA NR. 150 A OCDE PUNCTUL (20)]

Androgenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiandrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiestrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Activitatea antitiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Toxicitate pentru dezvoltare manifestarea toxicității pentru reproducere, reprezentând afecțiuni prenatale, perinatale, postnatale, structurale sau funcționale ale progeniturii.

Doză înseamnă cantitatea de substanță chimică de testat administrată. Doza este exprimată ca greutate a substanței chimice de testat pe unitatea de greutate corporală a animalului de experiență pe zi (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi) sau ca o concentrație constantă în regimul alimentar.

Dozarea este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării dozei.

Toxicitatea evidentă este un termen general care descrie semne clare de toxicitate în urma administrării unei substanțe chimice de testat. Aceste semne ar trebui să fie suficiente pentru a permite o evaluare a pericolelor și ar trebui să fie de așa natură încât o creștere a dozei administrate să poată fi prevăzută a declanșa apariția unor semne de toxicitate severe și probabil moartea.

Afectarea fertilității reprezintă tulburări ale funcțiilor sau capacității de reproducere masculine sau feminine.

Toxicitate maternă efecte adverse asupra femelelor gestante, care apar fie în mod specific (efect direct), fie în mod nespecific (efect indirect) și sunt legate de situația de gestație.

NOAEL este abrevierea pentru nivelul la care nu se observă niciun efect advers. Acesta este cel mai ridicat nivel de dozare la care nu se observă efecte adverse din cauza tratamentului.

Estrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Toxicitate pentru reproducere reprezintă efecte dăunătoare asupra descendenților și/sau afectarea funcțiilor sau a capacității de reproducere masculine și feminine.

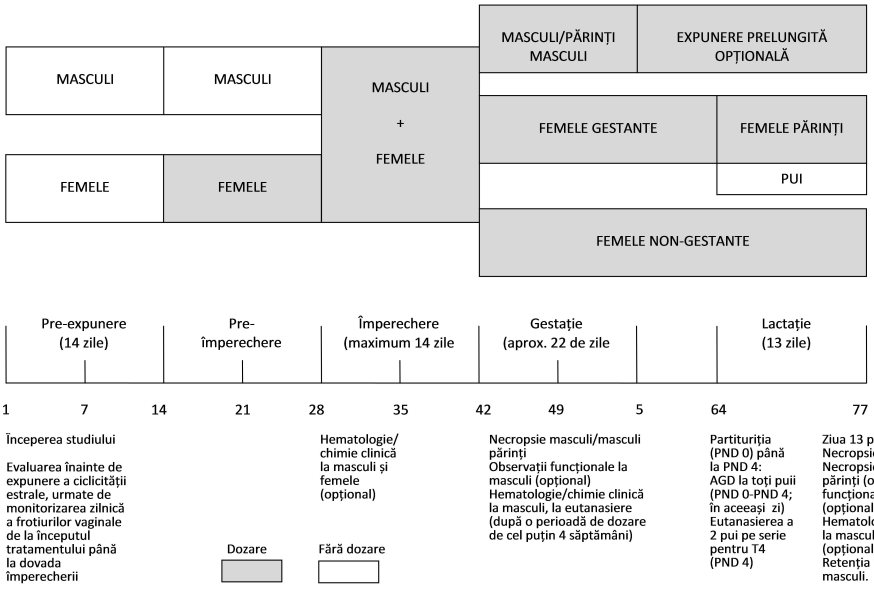
Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec testat(ă) utilizând această metodă de testare.

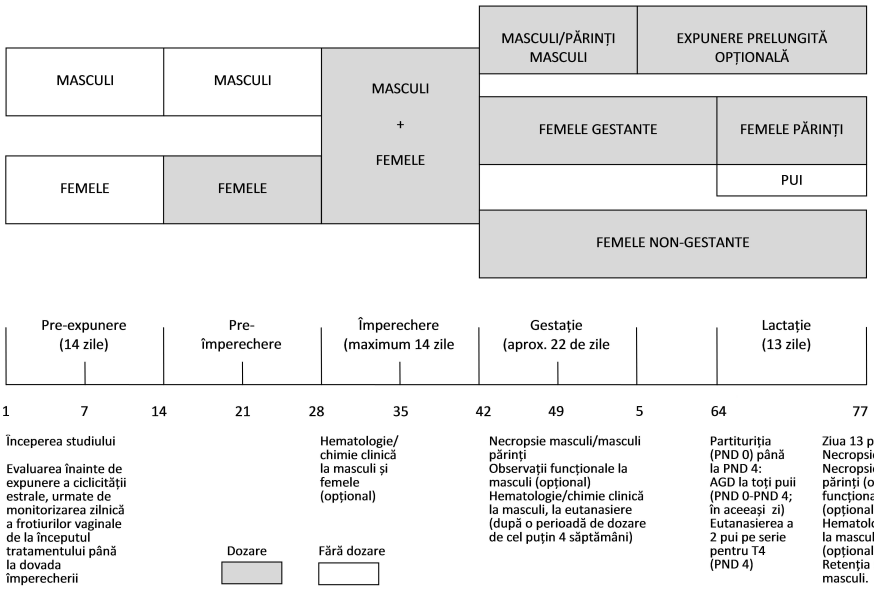
Activitatea tiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Validare înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acesteia pentru un anumit scop.

Apendicele 2

DIAGRAMĂ A SCHEMEI DE TRATAMENT CARE INDICĂ DURATA MAXIMĂ A STUDIULUI, PE BAZA UNEI PERIOADE DE ÎMPERECHERE COMPLETE DE 14 ZILE





Apendicele 3

RAPORT DE SINTEZĂ TABELAR CU EFECTELE ASUPRA REPRODUCERII/DEZVOLTĂRII

OBSERVAȚII	VALORI				
Dozaj (unități)	0 (martor)	…	…	…	…
Perechi începute (N)					
Ciclul estral (cel puțin durata medie și frecvența ciclurilor neregulate)					
Femele la care apare dovada copulației (N)					
Femele care au ajuns în gestație (N)					
Zile de concepție 1-5 (N)					
Zilele de concepție 6-...[[1]] (1) (N)					
Sarcină≤21 de zile (N)					
Sarcină = 22 de zile (N)					
Sarcină ≥ 23 de zile (N)					
Femele cu pui născuți vii (N)					
Femele cu pui născuți vii în ziua 4 pp (N)					
Implanturi/femelă (media)					
Pui vii/femelă la naștere (media)					
Pui vii/femelă în ziua 4 (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) la naștere (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) în ziua 4 (media)					
Greutatea seriei la naștere (media)					
Greutatea seriei în ziua 4 (media)					
Greutatea puilor la naștere (media)					
Greutatea puilor în momentul măsurării AGD (media la masculi, media la femele)					
AGD a puilor în aceeași zi postnatală, la naștere - ziua 4 (media la masculi, media la femele, se notează PND)					

OBSERVAȚII	VALORI				
Greutatea puilor în ziua 4 (media)					
Greutatea puilor în ziua 13 (media)					
Retența sfârcurilor la pui masculi în ziua 13 (media)					
PUI ANORMALI					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu ≥ 2					
PIERDEREA PUILOR					
Prenatal (implantații minus născuți vii)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					
Postnatal (pui născuți vii minus pui vii în ziua postnatală 13)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					

([1]) ultima zi a perioadei de împerechere

B.65 METODA DE TESTARE *IN VITRO* PRIN BARIERĂ CU MEMBRANĂ PENTRU COROZIUNEA CUTANATĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 435 (2015). Corodarea pielii înseamnă producerea de leziuni ireversibile ale pielii, care se manifestă ca o necroză vizibilă ce pătrunde în *epidermă*, ajungând în *dermă*, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare, care este echivalentă cu orientarea nr. 435 a OCDE privind testarea actualizată asigură o metod de testare *in vitro* prin barieră de membrană care poate fi utilizată pentru identificarea substanțelor chimice corozive. Metoda de testare utilizează o membrană artificială prevăzută a răspunde la substanțe chimice corozive în mod similar pielii de animal *in situ*.

2. În mod tradițional, corozivitatea cutanată a fost evaluată prin aplicarea substanței chimice de testat pe pielea animalelor vii și prin evaluarea gradului de lezare a țesuturilor după o perioadă de timp determinată (2). În afară de prezenta metodă de testare, au fost adoptate o serie de alte metode de testare *in vitro* ca alternative (3) (4) la procedura standard *in vivo* pe piele de iepure (capitolul B.4 din prezenta anexă, echivalentă cu Orientarea TG nr. 404 a OCDE) utilizată pentru identificarea substanțelor chimice corozive (2). Strategia de testare și evaluare secvențială a GHS al ONU pentru evaluarea și clasificarea corozivității cutanate și Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (IATA) pentru iritație/coroziune cutanată recomandă utilizarea unor metode de testare *in vitro* validate și acceptate în cadrul modulelor 3 și 4 (1) (5). IATA descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și (i) oferă îndrumări cu privire la modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanată și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare, inclusiv atunci când se identifică rezultate negative (5). În această abordare modulară, rezultatele pozitive ale metodelor de testare *in vitro* pot fi utilizate pentru clasificarea unei substanțe chimice ca fiind corozivă fără necesitatea testării pe animale, astfel fiind redusă și adaptată utilizarea animalelor în acest scop și evitându-se durerea și suferința care ar putea apărea la animale dacă acestea ar fi utilizate în acest scop.

3. Au fost realizate studii de validare pentru modelul de barieră cu membrană *in vitro*, care disponibil în comerț sub denumirea de Corrositex® (6) (7) (8), care indică o precizie generală de estimare a corozivității cutanate de 79 % (128/163), o sensibilitate de 85 % (76/89) și o specificitate de 70 % (52/74) pentru o bază de date cu 163 de substanțe și amestecuri (7). Pe baza valabilității sale recunoscute, această metodă de referință validată (MRV) a fost recomandată pentru utilizare în cadrul unei strategii de testare stratificate pentru evaluarea potențialului de pericol de coroziune cutanată al substanțelor chimice (5) (7). Înainte ca un model de barieră cu membrană *in vitro* pentru coroziunea cutanată să poată fi utilizat în scopuri de reglementare, ar trebui să se stabilească fiabilitatea, relevanța (precizia) și limitările acestuia pentru scopul propus, pentru a asigura faptul că acesta este similar MRV (9), în conformitate cu standardele de performanță prestabilite (SP) (10). Sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE va fi garantat numai după revizuirea și includerea în orientarea OCDE echivalentă privind testarea a oricăror metode de testare noi sau actualizate propuse în urma standardelor de performanță. În prezent, doar o singură metodă *in vitro* este vizată de orientarea nr. 435 a OCDE privind testarea și prezenta metodă de testare, modelul disponibil în comerț Corrositex®.

4. Alte metode de testare pentru testarea corozivității cutanate se bazează pe utilizarea pielii umane reconstituite (orientarea TG nr. 431 a OCDE) (3) și a pielii izolate de șobolan (orientarea TG nr. 430 a OCDE) (4). Această orientare privind testarea prevede, de asemenea, subclasificarea substanțelor chimice corozive în cele trei subcategorii de corozivitate din GHS al ONU și în cele trei grupuri de ambalaje pentru transport ale ONU pentru pericole de corozivitate. Această orientare OCDE privind testarea a fost adoptată inițial în 2006 și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA și a actualiza lista substanțelor de verificare.

DEFINIȚII

5. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendice.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

6. Testul descris în prezenta metodă de testare permite identificarea substanțelor chimice corozive și permite subclasificarea substanțelor chimice de testat corozive în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP (tabelul 1). În plus, o astfel de metodă de testare poate fi utilizată pentru a lua decizii privind caracterul coroziv și necoroziv al anumitor clase de substanțe chimice, de exemplu, acizi organici și anorganici, derivați ai acizilor ([2]) și baze pentru anumite scopuri de testare la transport (7) (11) (12). Prezenta metodă de testare descrie o procedură generică similară cu metoda de testare de referință validată (7). Deși această metodă de testare nu oferă informații adecvate privind iritația cutanată, ar trebui remarcat faptul că MT B.46 (echivalentă cu orientarea TG nr. 439 a OCDE) abordează în

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

([2]) „Derivat de acid" este o denumire de clasă nespecifică și este definit, în general, ca fiind o substanță chimică produsă dintr-un acid, fie în mod direct, fie prin modificare sau înlocuire parțială. Această clasă include anhidridele, acizii halogenați, sărurile și alte tipuri de substanțe chimice.

mod specific efectul iritației cutanate *in vitro*asupra sănătății (13). Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (5).

Tabelul 1

Categoria și subcategoriile de substanțe corozive pentru piele din GHS al ONU ([1])

Categoria de substanțe corozive (categoria 1) (pentru autoritățile care nu utilizează subcategorii)	Subcategorii de substanțe potențial corozive ([1]) (pentru autoritățile care utilizează subcategorii, inclusiv Regulamentul CLP)	Coroziv la ≥ 1 din 3 animale	
		Expunere	Observație
Coroziv	Subcategoria de substanțe corozive 1A	≤ 3 minute	≤ 1 oră
	Subcategoria de substanțe corozive 1B	> 3 minute/≤ 1 oră	≤ 14 zile
	Subcategoria de substanțe corozive 1C	> 1 oră/≤ 4 ore	≤ 14 zile

([1]) Pentru UE, Regulamentul CLP aplică cele trei subcategorii de substanțe corozive pentru piele 1A, 1B și 1C.

7. O limitare a metodei de referință validate (7) este aceea că este posibil ca multe substanțe chimice necorozive și anumite substanțe chimice corozive să nu îndeplinească cerințele pentru a fi testate, pe baza rezultatelor testului de compatibilitate inițial (a se vedea punctul 13). Substanțele chimice apoase cu un pH cuprins în intervalul 4,5-8,5 nu îndeplinesc, de cele mai multe ori, cerințele pentru testare; însă, 85 % dintre substanțele chimice de testat în acest interval de pH au fost necorozive la testele pe animale (7). Metoda barierei cu membrană *in vitro* poate fi utilizată pentru testarea substanțelor solide (solubile sau insolubile în apă) și lichide (apoase sau neapoase) și a emulsiilor. Însă, substanțele chimice de testat care nu cauzează o modificare detectabilă în cadrul testului de compatibilitate (și anume, modificarea culorii în sistemul de detectare a substanțelor chimice (CDS) al metodei de testare de referință validate) nu pot fi testate prin metoda barierei cu membrană și ar trebui să fie testate folosind alte metode de testare.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Sistemul de testare cuprinde două componente: o biobarieră macromoleculară sintetică și un sistem de detectare a substanțelor chimice (CDS); prin această metodă de testare se detectează, prin intermediul barierei de membrană CDS, leziunile provocate de substanțele chimice de testat corozive după aplicarea substanței chimice de testat pe suprafața barierei de membrană macromoleculară sintetică (7), probabil prin același aceleași mecanism(e) de coroziune care funcționează pe piele vie.
9. Penetrarea (sau perforarea) barierei de membrană ar putea fi măsurată printr-o serie de proceduri sau CDS, inclusiv o schimbare a culorii unui colorant indicator al pH-ului sau a unei alte proprietăți a soluției indicatoare sub barieră.
10. Bariera de membrană ar trebui să fie determinată ca fiind validă, și anume, relevantă și fiabilă pentru scopul prevăzut. Aceasta include asigurarea faptului că diferite preparate sunt consecvente în ceea ce privește proprietățile de barieră, de exemplu, că acestea sunt capabile să mențină o barieră în calea substanțelor chimice necorozive, să clasifice proprietățile corozive ale substanțelor chimice în diferitele subcategorii de corozivitate din GHS al ONU (1). Clasificarea atribuită se bazează pe timpul în care o substanță chimică pătrunde prin bariera de membrană în soluția indicatoare.

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

11. Înainte de utilizarea sistematică a metodei cu barieră de membrană *in vitro*, cu respectarea acestei metode de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin clasificarea corectă a celor douăsprezece substanțe de verificare recomandate în tabelul 2. În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (10)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 2

Substanțe de verificare ([1])

Substanță ([2])	NR CAS	Clasă chimică	Subcategoria din GHS al ONU *in vivo* ([3])	Subcategoria din GHS al ONU *in vitro* ([3])
Trifluorură de bor, dihidrat	13319-75-0	Acizi anorganici	1A	1A
Acid nitric	7697-37-2	Acizi anorganici	1A	1A
Pentaclorură de fosfor	10026-13-8	Precursori ai acizilor anorganici	1A	1A
Clorură de valeril	638-29-9	Cloruri de acil	1B	1B
Hidroxid de sodiu	1310-73-2	Baze anorganice	1B	1B
1-(2-aminoetil)piperazină	140-31-8	Amine alifatice	1B	1B
Clorură de benzensulfonil	98-09-9	Cloruri de acil	1C	1C
N, N-Dimetil-benzilamină	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraetilenpentamină	112-57-2	Amine alifatice	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Acrilat de nonil	2664-55-3	Acrilați/metacrilați	NC	NC
Bicarbonat de sodiu	144-55-8	Săruri anorganice	NC	NC

([1]) Cele douăsprezece substanțe enumerate mai sus conțin trei substanțe din fiecare dintre cele trei subcategorii ale GHS al ONU pentru substanțe corozive și trei substanțe necorozive, sunt disponibile imediat în comerț, iar subcategoria din GHS al ONU se bazează pe rezultatele testelor *in vivo* de înaltă calitate. Aceste substanțe sunt preluate din lista de 40 de substanțe de referință care sunt incluse în lista minimală de substanțe chimice identificate pentru a demonstra precizia și fiabilitatea metodelor de testare care sunt similare din punct de vedere structural și funcțional cu metoda de testare de referință validată, fiind selectate dintre cele 163 de substanțe chimice de referință utilizate inițial pentru validarea metodei de testare de referință (Corrositex®) (7) (10) (14). Obiectivul acestui proces de selecție urma să includă, în măsura posibilității, substanțele chimice care: au fost reprezentative pentru gama de răspunsuri privind corozivitatea (de exemplu, substanțe necorozive; substanțele corozive din grupurile de ambalaje I, II și III ale ONU) pe care metoda de testare de referință validată le poate măsura sau prezice; au fost reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în procesul de validare; au structuri chimice care au fost bine definite; au indus rezultate reproductibile în metoda de testare de referință validată; au indus rezultate definitive în testul de referință *in vivo*; au fost disponibile în comerț; și nu sunt asociate cu costuri de eliminare prohibitive (14).

([2]) Substanțe testate ca fiind în stare pură sau cu o puritate de ≥ 90 %

([3]) Grupurile de ambalaje aferente conform ONU sunt I, II și, respectiv, III pentru subcategoriile 1A, 1B și 1C din GHS al ONU. NC; Necoroziv.

PROCEDURA

12. Punctele următoare descriu componentele și procedurile unei metode de testare cu barieră de membrană artificială pentru evaluarea corozivității (7) (15), pe baza actualei MRV, și anume, Corrositex®, care este disponibilă în comerț. Bariera de membrană și soluțiile de compatibilitate/indicare și clasificare pot fi proiectate, preparate sau obținute din comerț, cum ar fi în cazul MRV Corrositex®. Există un model de protocol al metodei de testare pentru metoda de testare de referință validată (7). Testele ar trebui să fie efectuate la temperatura ambiantă (17-25 °C), iar componentele ar trebui să respecte următoarele condiții.

Testul de compatibilitate al substanței chimice de testat

13. Înainte de efectuarea testului cu barieră de membrană, se efectuează un test de compatibilitate pentru a determina dacă substanța chimică de testat poate fi detectată de CDS. În cazul în care CDS nu detectează substanța chimică de testat, metoda de testare cu barieră de membrană nu este adecvată pentru evaluarea corozivității potențiale a respectivei substanțe chimice de testat respective și ar trebui să fie utilizată o altă metodă de testare. CDS și condițiile de expunere utilizate pentru testul de compatibilitate ar trebui să reflecte expunerea în cadrul testului ulterior cu barieră de membrană.

Testul de clasificare a substanțelor chimice după timp

14. Dacă este cazul, pentru metoda de testare, o substanță chimică de testat care a fost calificată în urma testului de compatibilitate ar trebui să fie supusă unui test de clasificare după timp, și anume, un test de depistare care face diferența între acizi sau baze slabe și puternice. De exemplu, în cadrul metodei de testare de referință validate se utilizează un test de clasificare după timp pentru indicarea uneia dintre cele două durate care ar trebui folosită, în funcție de detectarea unei rezerve acide sau alcaline semnificative. Ar trebui să se utilizeze doi timpi diferiți de pătrundere pentru determinarea corozivității și a subcategoriei de corozivitate pentru piele a GHS al ONU, în funcție de rezerva acidă sau alcalină a substanței chimice de testat.

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE CU BARIERĂ DE MEMBRANĂ

Bariera de membrană

15. Bariera de membrană cuprinde două componente: un gel apos macromolecular proteinic și o membrană de susținere permeabilă. Gelul proteinic ar trebui să fie impermeabil la lichide și solide, dar poate să fie corodat și să devină permeabil. Bariera de membrană construită integral ar trebui să fie păstrată în condiții prestabilite care sunt dovedite a împiedica deteriorarea gelului, de exemplu, uscarea, creșterea microbiană, schimbarea, crăparea, care ar degrada performanțele acesteia. Ar trebui să se stabilească perioada de păstrare acceptabilă, iar preparatele barierei de membrană nu nu ar trebui să fie utilizate după această perioadă.

16. Membrana de susținere permeabilă asigură o susținere mecanică pentru gelul proteinic în timpul procesului de coagulare și de expunere la substanța chimică de testat. Membrana de susținere ar trebui să împiedice acumularea sau deplasarea gelului și să fie ușor permeabilă la toate substanțele chimice de testat.

17. Gelul proteinic, care este compus din proteine, de exemplu, cheratină, colagen sau amestecuri de proteine, și care formează o matrice de gel, servește drept obiectiv pentru substanța chimică de testat. Materialul proteinic este plasat pe suprafața membranei de susținere și lăsat să se coaguleze înainte de a așeza bariera de membrană peste soluția indicator. Gelul proteinic ar trebui să aibă o grosime și o densitate uniformă, fără bule de aer sau defecte care ar putea afecta integritatea sa funcțională.

Sistemul de detectare a substanțelor chimice (CDS)

18. Soluția indicator, care este aceeași soluție utilizată pentru testul de compatibilitate, ar trebui să reacționeze la prezența unei substanțe chimice de testat. Ar trebui să se utilizeze un colorant sau o combinație de coloranți indicatori ai pH-ului, de exemplu, roșu crezol și portocaliu de metil, care vor prezenta o modificare a culorii, ca răspuns la prezența substanței chimice de testat. Sistemul de măsurare poate fi vizual sau electronic.

19. Sistemele de detectare care sunt dezvoltate pentru detectarea trecerii substanței chimice de testat prin bariera de membrană ar trebui să fie evaluate pentru relevanță și fiabilitate în vederea demonstrării gamei de substanțe chimice care pot fi detectate și a limitelor cantitative de detecție.

PERFORMANȚA TESTULUI

Asamblarea componentelor metodei de testare

20. Bariera de membrană este introdusă într-un flacon (sau o eprubetă) care conține soluția indicator, astfel încât membrana de susținere să fie cu totul în contact cu soluția indicator și să nu se formeze bule de aer. Ar trebui să se acorde atenție pentru a asigura menținerea integrității barierei.

Aplicarea substanței chimice de testat

21. O cantitate adecvată de substanță chimică de testat, de exemplu, 500 µl dintr-un lichid sau 500 mg de substanță solidă sub formă de pulbere (7), se așează cu atenție pe suprafața superioară a barierei de membrană și se distribuie uniform. Pentru fiecare substanță chimică de testat și martorii aferenți se pregătește un număr adecvat de duplicate, de exemplu patru (7) (a se vedea punctele 23-25). Se înregistrează timpul de aplicare a substanței chimice de testat pe bariera de membrană. Pentru a asigura înregistrarea cu precizie a timpilor scurți de coroziune, timpii de aplicare a substanței chimice de testat în flacoanele duplicate sunt stabiliți separat.

Măsurarea gradului de pătrundere în bariera de membrană

22. Fiecare flacon este monitorizat în mod corespunzător și se înregistrează timpul primei modificări a soluției indicator, și anume, pătrunderea în barieră, determinându-se timpul scurs între aplicare și pătrunderea în bariera de membrană.

Martori

23. La testele care implică utilizarea unui vehicul sau a unui solvent cu substanța chimică de testat, vehiculul sau solventul respectiv ar trebui să fie compatibil cu sistemul barierei de membrană, și anume, să nu modifice integritatea acestui sistem, și nu ar trebui să modifice corozivitatea substanței chimice de testat. După caz, martorul tratat cu solvent (sau cu vehicul) ar trebui să fie testat concomitent cu substanța chimică de testat pentru a demonstra compatibilitatea solventului cu sistemul barierei de membrană.

24. Concomitent cu substanța chimică de testat ar trebui să se testeze un martor pozitiv (coroziv) cu o activitate de corozivitate intermediară, de exemplu, 110 ± 15 mg hidroxid de sodiu (subcategoria de substanțe corozive 1B din GHS al ONU) (7) pentru a evalua dacă sistemul de testare funcționează într-un mod acceptabil. Un al doilea martor pozitiv care este din aceeași clasă chimică ca și substanța chimică de testat poate fi util pentru evaluarea potențialului de corozivitate relativă al unei substanțe chimice de testat corozive. Ar trebui să se aleagă un martor(i) pozitiv(i) cu o corozivitate intermediară (de exemplu, din subcategoria 1B din GHS al ONU) pentru a detecta modificările apărute în timpul de pătrundere care ar putea fi inacceptabil de prelungit sau mai scurt decât valoarea de referință stabilită, ceea ce indică faptul că sistemul de testare nu funcționează în mod corect. În acest scop, substanțele chimice extrem de corozive (subcategoria 1A din GHS al ONU) sau cele necorozive au o utilitate limitată. O substanță chimică corozivă din subcategoria 1B din GHS al Națiunilor Unite ar permite detectarea unui timp de pătrundere prea scurt sau prea mare. O substanță slab corozivă (din subcategoria 1C din GHS al ONU) ar putea fi utilizată ca martor pozitiv pentru măsurarea capacității metodei de testare de a face distincția în mod consecvent între substanțele chimice slab corozive și cele necorozive. Indiferent de metoda utilizată, ar trebui să se dezvolte un interval de răspuns acceptabil al martorilor pozitivi pe baza intervalului istoric al timpilor de pătrundere pentru martorul (martorii) pozitiv(i) utilizați, cum ar fi media ± 2-3 abateri standard. Ar trebui să se determine, în cadrul fiecărui studiu, timpul exact de pătrundere pentru martorul pozitiv, astfel încât să se poată detecta abaterile din afara intervalului acceptabil.

25. De asemenea, ar trebui să se testeze, concomitent cu substanța chimică de testat, un martor negativ (necoroziv), de exemplu, 10 % acid citric, 6 % acid propionic (7), ca o altă măsură de control al calității pentru a demonstra integritatea funcțională a barierei de membrană.

Criterii de acceptare a studiului

26. Conform parametrilor de timp stabiliți pentru fiecare subcategorie de corozivitate din GHS al ONU, timpul (în minute) care s-a scurs între aplicarea unei substanțe chimice de testat pe bariera de membrană și pătrunderea în barieră se folosește pentru a prezice corosivitatea substanței chimice de testat. Pentru ca un studiu să fie considerat acceptabil, martorul pozitiv testat în paralel ar trebui să indice timpul de răspuns prevăzut pentru pătrundere (de exemplu, un timp de pătrundere de 8-16 minute pentru hidroxidul de sodiu dacă acesta este utilizat ca martor pozitiv), martorul negativ testat în paralel nu ar trebui să fie coroziv și, dacă este inclus, martorul tratat cu solvent testat în paralel nu ar trebui nici să fie coroziv, nici să modifice potențialul de corozivitate al substanței chimice de testat. Înainte de utilizarea sistematică a unei metode care respectă prezenta metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele sale tehnice, utilizând cele douăsprezece substanțe recomandate în tabelul 2. Pentru metode noi de tipul „me-too" dezvoltate în cadrul acestei metode de testare, care sunt similare din punct de vedere structural și funcțional cu metoda de referință validată (14), standardele de performanță predefinite ar trebui să fie utilizate pentru a demonstra fiabilitatea și precizia noii metode înainte ca aceasta să fie utilizată pentru testarea de reglementare (10).

Interpretarea rezultatelor și clasificarea substanțelor chimice de testat în funcție de corozivitate

27. Timpul (în minute) scurs între aplicarea substanței chimice de testat pe bariera de membrană și pătrunderea acesteia în barieră este utilizat pentru a clasifica substanța chimică de testat în subcategoriile de substanțe corozive din GHS al ONU (1) și, dacă este cazul, în grupul de ambalaje al ONU (16). Valoril timpului-limită pentru fiecare dintre cele trei subcategorii de substanțe corozive sunt stabilite pentru fiecare metodă de testare propusă. Deciziile finale privind timpul-limită ar trebui să ia în considerare necesitatea de a reduce la minimum subclasificarea pericolului coroziv (și anume, valorile fals negative). În prezenta orientare privind testarea, ar trebui să fie utilizate valorile timpului-limită ale Corrositex®, astfel cum sunt descrise în tabelul 3, deoarece aceasta constituie singura metodă de testare care se încadrează în prezent în orientarea privind testare (7).

Tabelul 3

Modelul predictiv Corrositex®

Timpul mediu de pătrundere (min.)		Predicția GHS al ONU ([3])
Substanțele chimice de testat din categoria 1 ([1]) (determinate prin testul de clasificare al metodei)	Substanțele chimice de testat din categoria 2 ([2]) (determinate prin testul de clasificare al metodei)	
0-3 min.	0-3 min.	Coroziv subcategoria 1A opțională
> 3-60 min.	> 3-30 min.	Coroziv subcategoria 1B opțională
> 60-240 min.	> 30-60 min.	Coroziv subcategoria 1C opțională
> 240 min.	> 60 min.	Necoroziv

([1]) Substanțe chimice de testat cu rezervă acidă/alcalină ridicată (6)
([2]) Substanțe chimice de testat cu rezervă acidă/alcalină redusă (6)
([3]) Subcategoriile 1A, 1B și 1C din GHS al ONU corespund grupurilor de ambalaje I, II și III ale ONU.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

28. Timpul (în minute) scurs între aplicare și pătrunderea în barieră, în cazul substanței chimice de testat și al martorului (martorilor) pozitiv(i), ar trebui să fie consemnat într-un tabel, ca date individuale duplicate, precum și ca medie ± abaterea standard pentru fiecare test.

Raport testului

29. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și substanțe martor

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Vehicul:

— identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;

— justificarea alegerii vehiculului.

Modelul barierei de membrană in vitro și protocolul utilizat, inclusiv precizia și fiabilitatea demonstrate

Condiții de testare:

— descrierea aparaturii și a procedurilor de preparare utilizate;

— sursa și compoziția barierei de membrană *in vitro* utilizate;

— compoziția și proprietățile soluției indicator;

— metoda de detecție;

— cantitățile de substanțe chimice de testat și de substanțe martor;

— numărul duplicatelor;

— descrierea și justificarea testului de clasificare după timp;

— metoda de aplicare;

— timpii de observație.

— descrierea criteriilor de evaluare și de clasificare aplicate;

— demonstrarea competenței de desfășurare a metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor chimice de verificare.

Rezultate:

— prezentarea sub formă tabelară a datelor brute individuale obținute din probe individuale de testare și martori pentru fiecare duplicat;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), a cincea ediție revizuită, ONU New York și Geneva, 2013. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(3) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: metoda de testare pe epidermă umană reconstruită (RHE).

(4) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Rezistența electrică transcutanată (RET).

(5) OCDE (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/ Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 203). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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 (nr. 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. și 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) OCDE (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 (nr. 34).

(10) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: 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, Italia. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (a cincea revizie). (20 septembrie 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Capitolul B.46 din prezenta anexă, Iritația cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication nr. 04-4510. Publicație disponibilă la adresa: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Publicație disponibilă la adresa: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, a 18-a ediție revizuită (partea, capitolul 2.8), UN, 2013. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Anexă

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim «concordanță», pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (9).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Sistemul de detectare a substanțelor chimice (CDS): Un sistem de măsurare vizuală sau electronică cu o soluție indicator care răspunde la prezența unei substanțe chimice de testat, de exemplu, printr-o modificare a unui colorant indicator de pH sau a unei combinații de coloranți, care va indica o schimbare de culoare ca răspuns la prezența substanței chimice de testat sau ca urmare a altor tipuri de reacții chimice sau electrochimice.

Concordanță: Este un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe" și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (9).

GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice):: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare.

Amestec: Un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NC: Necoroziv.

Standarde de performanță: Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) niveluri similare de fiabilitate și acuratețe, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă ar trebui să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe chimice de referință (9).

Relevanță: Descrierea relației dintre metoda de testare și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care metoda de testare măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (9).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (9).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Coroziunea cutanată *in vivo*: Producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

B.66 TESTE *IN VITRO* DE TRANSACTIVARE CU TRANSFECTARE STABILĂ PENTRU DETECTAREA AGONIȘTILOR ȘI ANTAGONIȘTILOR RECEPTORILOR DE ESTROGEN

INTRODUCERE GENERALĂ

Orientarea OCDE privind testarea pe baza performanței

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 455 (2016). TG nr. 455 este o orientare privind testarea pe baza performanței (PBTG), care descrie metodologia testelor *in vitro* de transactivare cu transfectare stabilă pentru detectarea agoniștilor și a antagoniștilor receptorilor de estrogen (testele ER TA). Aceasta cuprinde mai multe metode de testare similare din punct de vedere mecanicist și funcțional pentru identificarea agoniștilor și antagoniștilor receptorilor de estrogen (și anume, ERα și/sau ERβ) și ar trebui să faciliteze dezvoltarea unor metode de testare similare noi sau modificate în conformitate cu principiile de validare prevăzute în documentul de orientare al OCDE privind validarea și acceptarea internațională a metode de testare noi și actualizate pentru evaluarea riscurilor (1). Metodele de testare de referință validate integral (apendicele 2 și apendicele 3), care servesc drept bază pentru această PBTG, sunt:

— Testul AT cu transfectare stabilă (STTA) (2) care utilizează linia celulară (h) ERαHeLa-9903; și

— Testul VM7Luc ER AT (3), care utilizează linia celulară VM7Luc4E2 ([1]), care exprimă predominant hERα cu o oarecare contribuție din partea hERβ(4) (5).

Pentru dezvoltarea și validarea unor teste similare pentru același punct final de pericol există standarde de performanță (SP) (6) (7) care ar trebui să fie utilizate. Acestea permit modificarea prpomptă a PBTG nr. 455, astfel încât să se poată adăuga teste similare noi la o PBTG actualizată; însă testele similare vor fi adăugate doar după revizuirea și confirmarea de către OCDE a respectării standardelor de performanță. Testele incluse în TG nr. 455 pot fi utilizate fără nicio deosebire pentru a răspunde cerințelor statelor membre ale OCDE pentru rezultatele testelor privind transactivarea receptorilor de estrogen, beneficiind în același timp de sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE.

Context și principii ale testelor incluse prezenta metodă de testare

2. În 1998, OCDE a inițiat o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente privind testarea și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin. Cadrul conceptual al OCDE (CC) pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin a fost revizuit în 2012. Cadrele conceptuale inițiale și revizuite sunt incluse ca anexe la documentul de orientare al OCDE privind orientările de testare standardizate pentru evaluarea substanțelor chimice în vederea identificării perturbatorilor endocrini (8). CC cuprinde cinci niveluri, fiecare nivel corespunzând unui nivel diferit de complexitate biologică. Testele de transactivare ER (AT) descrise în această metodă de testare sunt de nivelul 2, care include *teste in vitro care furnizează date cu privire la (un) anumit(e) mecanism(e)/o cale endocrină/anumite căi endocrine*. Această metodă de testare este pentru teste *in vitro* de transactivare (AT) concepute pentru a identifica agoniștii și antagoniștii receptorilor de estrogen (ER).

3. Interacțiunea estrogenilor cu ER poate afecta transcrierea genelor controlate de estrogen, ceea ce poate conduce la inducerea sau inhibarea proceselor celulare, inclusiv a celor necesare pentru proliferare celulară, dezvoltare normală a fătului și funcția de reproducere (9) (10) (11). Perturbarea sistemelor estrogenice normale poate avea potențialul de a declanșa efecte adverse asupra dezvoltării normale (ontogenează), a sănătății reproductive și a integrității sistemului de reproducere.

4. Testele TA *in vitro* se bazează pe o interacțiune directă sau indirectă a substanțelor cu un receptor specific care reglează transcrierea unui produs genetic reporter. Astfel de teste au fost utilizate pe scară largă pentru a evalua expresia genică reglementată de anumiți receptori nucleari, cum ar fi ER (12) (13) (14) (15) (16). Acestea au fost propuse pentru detectarea transactivării estrogenice reglementate de ER (17) (18) (19). Există cel puțin două subtipuri majore de ER nucleari, α și β, care sunt codificați prin gene distincte. Proteinele respective au diferite funcții biologice, precum și diferite distribuții de țesuturi și afinități de legare a liganzilor (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). ERα nuclear mediază răspunsul estrogenic clasic (27) (28) (29) (30) și, prin urmare, cele mai multe modele în curs de elaborare pentru a măsura activarea sau inhibarea ER sunt specifice ERα. Testele sunt utilizate pentru a identifica substanțele chimice care activează (sau inhibă) ER în urma legării lianzilor, după care complexul receptor-ligand se leagă de anumite elemente de răspuns ADN specifice și transactivează o genă reporter, ceea ce determină creșterea expresiei

celulare a unei proteine marker. În aceste teste pot fi utilizate diferite răspunsuri ale reporterilor. În sistemele bazate pe luciferază, enzima luciferază transformă substratul luciferină într-un produs bioluminiscent care poate fi măsurat cantitativ cu un luminometru. Alte exemple de reporteri comuni sunt proteina fluorescentă și gena *LacZ*, care codifică β-galactozidaza, o enzimă care poate transforma substratul incolor X-gal (5-bromo-4-cloro-indol-galactopiranozidă) într-un produs de culoare albastră care poate fi cuantificat cu un spectrofotometru. Acești reporteri pot fi evaluați rapid și cu costuri reduse cu ajutorul unor truse de testare disponibile în comerț.

5. Studiile de validare a testelor STTA și VM7Luc TA și-au demonstrat relevanța și fiabilitatea acestora pentru scopul prevăzut (3) (4) (5) (30). Standardele de performanță pentru testele ER TA bazate pe luminiscență, care folosesc linii celulare din sân, sunt incluse în raportul de evaluare a metodei de testare ICCVAM privind metoda de testare LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Un test *in vitro* pentru identificarea activității substanțelor chimice ca agoniști sau antagoniști ai receptorilor de estrogen (An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Aceste standarde de performanță au fost modificate pentru a fi aplicabile în cazul testelor STTA și VM7Luc TA (2).

6. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

Domeniul de aplicare și limitările aferente testelor TA

7. Aceste teste sunt propuse pentru depistare și stabilirea priorităților, dar pot furniza, de asemenea, informații mecaniciste care pot fi utilizate în cadrul unei abordări bazate pe dovezi. Acestea abordează TA indusă de legarea substanței chimice de ER într-un sistem *in vitro*. Astfel, rezultatele nu ar trebui să fie extrapolate în mod direct cu semnalizarea și reglarea complexă a sistemului endocrin *in vivo*.

8. TA mediată de ER este considerată a fi unul dintre principalele mecanisme de perturbare a sistemului endocrin (ED), deși există și alte mecanisme prin care se poate produce ED, inclusiv (i) interacțiunile cu alți receptori și sisteme enzimatice din sistemul endocrin, (ii) sinteza hormonilor, (iii) activarea metabolică și/sau inactivarea hormonilor, (iv) distribuirea hormonilor la țesuturile țintă și (v) eliminarea hormonilor din corp. Niciunul dintre testele efectuate în cadrul acestei metode de testare nu abordează aceste moduri de acțiune.

9. Această metodă de testare abordează capacitatea substanțelor chimice de a activa (și anume, de a acționa ca agoniștii) și, de asemenea, de a suprima (și anume, de a acționa ca antagoniști) transcrierea dependentă de ER. Unele substanțe chimice pot, într-o manieră dependentă de tipurile de celule, să afișeze atât activitatea agonistă, cât și activitatea antagonistă și sunt cunoscute sub denumirea de modulatori de receptori de estrogen selectivi (SERM). Substanțele chimice negative din aceste teste ar putea fi evaluate în cadrul unui test de legare de ER înainte de a concluziona că substanța chimică nu se leagă de receptor. În plus, este posibil ca testele să ofere informații numai despre activitatea moleculei mamă, ținând seama de capacitatea de metabolizare limitată a sistemelor de celule *in vitro*. Având în vedere că, în timpul validării, au fost utilizate numai substanțe unice, aplicabilitatea pentru amestecuri de testare nu a fost abordată. Metoda de testare este totuși aplicabilă din punct de vedere teoretic pentru testarea substanțelor multicomponente, a UVCB și a amestecurilor. Înainte de utilizarea metodei de testare pe o substanță multicomponentă, UVCB sau un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

10. În scop informativ, tabelul 1 prezintă rezultatele testului de agoniști pentru cele 34 de substanțe care au fost testate în cadrul ambelor metode de testare de referință validate complet descrise în prezenta metodă de testare. Dintre aceste substanțe, 26 sunt clasificate ca fiind agoniști ER definitivi și 8 negative pe baza rapoartelor publicate, inclusiv a testelor *in vitro* pentru legarea de ER și TA, precum și/sau a testului uterotrophic (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Tabelul 2 prezintă rezultatele testului de antagoniști pentru cele 15 substanțe care au fost testate în cadrul ambelor metode de testare de referință validate complet descrise în prezenta metodă de testare. Dintre aceste substanțe, 4 sunt clasificate ca fiind antagoniști ER definitivi/presupuși și 10 negative pe baza rapoartelor publicate, inclusiv a testelor *in vitro* pentru legarea de ER și TA (2) (3) (18) (31). În ceea ce privește datele sintetizate în tabelele 1 și 2, s-a ajuns la un acord de 100 % între cele două metode de testare de referință privind clasificările tuturor substanțelor, cu excepția unei substanțe (Mifepristonă) pentru testul antagonist și fiecare substanță a fost clasificată în mod corect ca agonist/antagonist ER sau negativă. Informații suplimentare privind acest grup de substanțe chimice, precum și alte substanțe chimice testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA în timpul studiilor de validare sunt prezentate în standardele de performanță pentru ERTA (6) (7), apendicele 2 (tabelele 1, 2 și 3).

Tabelul 1

Prezentarea rezultatelor testelor STTA și VM7Luc ER TA pentru substanțele testate în cadrul ambelor teste privind agoniștii și clasificate ca reprezentând agoniști ER (POS) sau negative (NEG)

	Substanță	NR CAS	Testul STTA (1)			Testul VM7Luc ER TA (2)		Sursa datelor pentru clasificare (4)		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} (b) (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} (b), (3) (M)	Alte ER TA (c)	Legare de ER	Uterotrofică
1	17ß-estradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-etinil estradiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-cumilfenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*terț*-octilfenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenină (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT

	Substanță	NR CAS	Testul STTA [1]			Testul VM7Luc ER TA [2]		Sursa datelor pentru clasificare [4]		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} [b], [3] (M)	Alte ER TA [c]	Legare de ER	Uterotrofică
9	Atrazină [a]	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A [a]	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B [a]	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Ftalat de butil benzil [a]	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG
13	Corticosteron [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Cumestrol [a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzeină [a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Dietilstilbestrol [a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Ftalat de di-n-butil	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Etilparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(no PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estronă [a]	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genisteină [a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS

	Substanță	NR CAS	Testul STTA [1]			Testul VM7Luc ER TA [2]		Sursa datelor pentru clasificare [4]		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} [b], [3] (M)	Alte ER TA [c]	Legare de ER	Uterotrofică
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kemferol [a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Keponă [a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol [a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Metiltestosteron [a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Noretinodrel [a]	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	*p,p'*-metoxiclor [a]	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(fără PC_{50}) [b]	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital [a]	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT

	Substanță	NR CAS	Testul STTA [1]			Testul VM7Luc ER TA [2]		Sursa datelor pentru clasificare [4]		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} [b], [3] (M)	Alte ER TA [c]	Legare de ER	Uterotrofică
32	Reserpină	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spironolactonă [a]	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; M = molar; EC_{50} = jumătate din concentrația maximă efectivă a substanței de testat; NEG = negativ; POS = pozitiv; NT = Netestat; PC_{10} (și PC_{50}) = concentrația unei substanțe de testat la care răspunsul este de 10 % (sau 50 % pentru PC_{50}) din răspunsul indus de martorul pozitiv (E2, 1nM) pe fiecare placă.

[a] Substanțe comune testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA care au fost desemnate ca fiind agoniști ER sau negative și utilizate pentru a evalua precizia în studiul de validare VM7Luc ER TA [Raportul de evaluare ICCVAM VM7Luc ER TA, tabelul 4-1) (3)].

[b] Concentrația maximă testată în absența unor limitări datorate citotoxicității sau insolubilității a fost de 1×10^{-5} M (testul STTA) și de 1×10^{-3} M (testul VM7Luc ER TA).

[c] Numărul dintre paranteze reprezintă rezultatele testelor clasificate drept pozitive (POS) sau negative (NEG) din numărul total de studii de referință.

[1] Valori raportate în Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)

[2] ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

[3] Valorile medii IC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

[4] Clasificarea ca substanțe agoniste ER sau negative a fost bazată pe informații din documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru metodele de testare pentru legare de ER și TA (31), precum și pe informații obținute din lucrările publicate și revizuite după finalizarea BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Note: Testele individuale din cadrul acestei metode de testare nu au aceleași măsurători. În unele situații, valoarea EC_{50} nu poate fi calculată, deoarece nu se generează o curbă de răspuns la administrarea unei doze complete. Chiar dacă, odată cu testul STTA, valoarea PC_{10} este o măsură-cheie, pot exista și alte exemple în care o valoare PCx va furniza informații utile.

Tabelul 2

Compararea rezultatelor testelor STTA și VM7Luc ER TA pentru substanțele testate în cadrul ambelor teste privind antagoniștii și clasificate ca reprezentând antagoniști ER (POS) sau negative (NEG)

	Substanță [a]	NR CAS	Testul ER STTA [1]		Testul VM7Luc ER TA [2]		ER STTA efecte candidate [4]	ICCVAM [5] Clasificare prin consens	MeSH [6] Clasă chimică	Clasă de produse [7]
			Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b], [3] (M)				
1	4-hidroxi-tamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
2	Dibenzo[a.h]antracen	53-70-3	POS	Fără IC_{50}	POS	Fără IC_{50}	POS	PP	Compus policiclic	Substanță chimică de laborator, produs natural
3	Mifepristonă	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	ușor POS	NEG	Steroid	Produs farmaceutic
4	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
7	Apigenină	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Compus heterociclic	Colorant, produs natural, produs farmaceutic intermediar

	Substanță [a]	NR CAS	Testul ER STTA [1]		Testul VM7Luc ER TA [2]		ER STTA efecte candidate [4]	ICCVAM [5] Clasificare prin consens	MeSH [6] Clasă chimică	Clasă de produse [7]
			Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b], [3] (M)				
8	Atrazină	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Compus heterociclic	Erbicid
9	Ftalat de di-n-butil	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, acid ftalic	Ingredient cosmetic, substanță chimică industrială, plastifiant
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	netestat	PN	Compus heterociclic, pirimidină	Fungicid
11	Flavonă	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
12	Flutamidă	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amidă	Produs farmaceutic, agent veterinar
13	Genisteină	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	netestat	NEG	Fenol	Substanță chimică intermediară

	Substanță [a]	NR CAS	Testul ER STTA [1]		Testul VM7Luc ER TA [2]		ER STTA efecte candidate [4]	ICCVAM [5] Clasificare prin consens	MeSH [6] Clasă chimică	Clasă de produse [7]
			Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b], [3] (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Hidrocarbură (ciclică)	Produs natural

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; M = molar; IC_{50} = jumătate din concentrația maximă de inhibare a substanței de testat; NEG = negativ; PN = presupus negativă; POS = pozitiv; PP = presupus pozitivă.

[a] Substanțe comune testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA care au fost desemnate ca fiind antagoniști ER sau negative și utilizate pentru a evalua precizia în studiul de validare VM7Luc ER TA (2) (3).

[b] Concentrația maximă testată în absența unor limitări datorate citotoxicității sau insolubilității a fost de 1×10^{-3} M (testul STTA) și de 1×10^{-5} M (testul VM7Luc ER TA).

[1] The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

[2] ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

[3] Valorile medii IC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

[4] Activitatea STTA ER presupusă din efectele raportate ale acestora, care sunt cunoscute din datele istorice ale CERI privind testul de legare de receptorul ER, testul uterotrofic și informații colectate din literatura disponibilă (2)

[5] Clasificarea ca substanțe antagoniste ER sau negative a fost bazată pe informații din documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru testele privind legarea de ER și TA (31), precum și pe informații obținute din lucrările publicate și revizuite după finalizarea BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31).

[6] Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[7] Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Data Bank) a National Library of Medicine din Statele Unite (material disponibil la adresa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

COMPONENTELE TESTULUI ER TA

Componentele esențiale ale testului

11. Prezenta metodă de testare se aplică pentru testele care utilizează un receptor ERα transfectat stabil sau endogen și o structură de gene reporter transfectate stabil sub controlul unuia sau mai multor elemente de răspuns estrogen; însă, pot fi prezenți și alți receptori precum ERβ. Acestea sunt componente esențiale ale tstului.

Martori

12. Ar trebui să se descrie baza pentru standardele de referință propuse în paralel pentru fiecare test agonist și antagonist. Martorii testați în paralel (negativi, tratați cu solvent și pozitivi), după caz, servesc drept indicatori pentru operativitatea testului în condițiile de testare și furnizează o bază pentru comparații între experimente; acestea fac parte, de obicei, din criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (1).

Proceduri standard de control al calității

13. Ar trebui să se desfășoare proceduri standard de control al calității, astfel cum este descris pentru fiecare test, pentru a se asigura faptul că linia celulară rămâne stabilă în urma mai multor treceri, că rămâne fără micoplasme (și anume, fără contaminare bacteriană) și că își menține capacitatea de a furniza în timp răspunsurile mediate de ER preconizate. Ar trebui să se verifice în continuare identitatea corectă a liniilor celulare, precum și a altor contaminanți (de exemplu, fungi, drojdie și virusuri).

Demonstrarea competenței laboratorului

14. Înainte de a testa substanțe chimice necunoscute prin oricare dintre testele realizate în cadrul acestei metode de testare, fiecare laborator ar trebui să își demonstreze capacitatea de a utiliza testul. Pentru a-și demonstra competența, fiecare laborator ar trebui să testeze cele 14 substanțe de verificare enumerate în tabelul 3 pentru testul agoniștilor și 10 substanțe de verificare din tabelul 4 pentru testul antagoniștilor. Această testare a competenței va confirma, de asemenea, capacitatea de răspuns a sistemului de testare. Lista substanțelor de verificare constituie un subset al substanțelor de referință prevăzute în standardele de performanță pentru testele ER TA (6). Aceste substanțe sunt disponibile în comerț, reprezintă clasele de substanțe chimice asociate în mod obișnuit cu activitatea agonistă sau antagonistă ER, prezintă un interval adecvat de putere preconizată pentru agoniștii/antagoniștii ER (și anume, puternice sau slabe) și includ substanțe negative. Testarea substanțelor de verificare ar trebui să fie duplicate cel puțin de două ori, în zile diferite. Performanța este demonstrată prin clasificarea corectă (pozitiv/negativ) a fiecărei substanțe de verificare. Testarea competenței ar trebui să fie repetată de către fiecare tehnician atunci când învață testele. În funcție de tipul de celule, unele dintre aceste substanțe de verificare ar putea să se comporte ca SERM și să manifeste o activitate atât ca agoniști, cât și ca antagoniști. Însă, substanțele de verificare sunt clasificate în tabelele 3 și 4 după activitatea lor predominantă cunoscută care ar trebui utilizată pentru evaluarea competenței.

15. Pentru a demonstra performanța și pentru controlul calității, fiecare laborator ar trebui să compileze baze de date istorice despre agoniști și antagoniști cu standard de referință (de exemplu, 17β-estradiol și tamoxifen) și date despre substanțe chimice martor pozitive și negative și martori tratați cu solvent (de exemplu, DMSO). Pentru început, baza de date ar trebui să fie generată în urma a cel puțin 10 teste independente privind agoniștii (de exemplu, 17β-estradiol) și 10 teste independente privind antagoniștii (de exemplu, tamoxifen). Ar trebui să se adauge rezultatele analizelor viitoare privind aceste standarde de referință și martori tratați cu solvent pentru a extinde baza de date și pentru a asigura consecvența și performanța testului biologic de către laborator în timp.

Tabelul 3

Lista (14) substanțelor de verificare pentru testul agoniștilor (1)

Nr. (8)	Substanță	NR CAS	Răspuns preconizat (2)	Testul STTA			Testul VM7Luc ER TA		Clasa de substanțe chimice MeSH (6)	Clasă de produse (7)
				Valoarea PC_{10} (M) (3)	Valoarea PC_{50} (M) (3)	Interval de concentr. de testare (M)	Valoarea VM7Luc EC_{50} (M) (4)	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) (5)		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	10^{-14} - 10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Hidrocarbură (ciclică)	Agent veterinar, farmaceutic
12	17α-estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Produs farmaceutic, agent veterinar
11	4-*terț*-octilfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	10^{-11} - 10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Substanță chimică intermediară
9	Genisteină	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	10^{-11} - 10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	10^{-11} - 10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Substanță chimică intermediară

Nr. ([8])	Substanță	NR CAS	Răspuns preconizat ([2])	Testul STTA			Testul VM7Luc ER TA		Clasa de substanțe chimice MeSH ([6])	Clasă de produse ([7])
				Valoarea PC_{10} (M) ([3])	Valoarea PC_{50} (M) ([3])	Interval de concentr. de testare (M)	Valoarea VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) ([5])		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	10^{-11} - 10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural
3	Ftalat de butil benzil	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Acid carboxilic, ester, acid ftalat	Plastifiant, substanță chimică industrială
4	*p,p'*- Metoxiclor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Hidrocarbură (halogenată)	Pesticid, agent veterinar
1	Etilparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	10^{-11} - 10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Acid carboxilic, fenol	Produs farmaceutic, conservant
17	Atrazină	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10} - 10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Compus heterociclic	Erbicid
20	Spironolactonă	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lactonă, steroid	Produs farmaceutic

Nr. ([8])	Substanță	NR CAS	Răspuns preconizat ([2])	Testul STTA			Testul VM7Luc ER TA		Clasa de substanțe chimice MeSH ([6])	Clasă de produse ([7])
				Valoarea PC_{10} (M) ([3])	Valoarea PC_{50} (M) ([3])	Interval de concentr. de testare (M)	Valoarea VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) ([5])		
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Compus heterociclic	Produs farmaceutic
22	Reserpină	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Compus heterociclic, indol	Produs farmaceutic, agent veterinar

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; EC_{50} = jumătate din concentrația maximă efectivă a substanței de testat; NEG = negativ; POS = pozitiv; PC_{10} (și PC_{50}) = concentrația unei substanțe de testat la care răspunsul este de 10 % (sau 50 % pentru PC_{50}) din răspunsul indus de martorul pozitiv (E2, 1nM) pe fiecare placă.

([1]) Clasificarea ca substanță pozitivă sau negativă pentru activitatea de agonist ER s-a bazat pe documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru testele de legare de ER și TA (31), precum și pe datele empirice și pe alte informații obținute din studii de referință publicate și revizuite după finalizarea documentelor BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Valori raportate în Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30).

([3]) Valorile medii EC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

([4]) Concentrațiile raportate au fost concentrațiile cele mai mari testate (identificarea intervalelor) în timpul validării testului VM7Luc ER TA. În cazul în care există diferențe de concentrații între laboratoare, se consemnează cea mai mare concentrație. A se vedea tabelul 4-10 din Raportul de evaluare a metodei de testare ICCVAM; Metoda de testare LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Un test *in vitro* pentru identificarea activității substanțelor chimice ca agoniști sau antagoniști ai receptorilor de estrogen (An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Database) a National Library of Medicine din Statele Unite (material disponibil la adresa: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Din tabelul 1 [Lista substanțelor chimice de referință (22) pentru evaluarea preciziei agoniștilor ER] din standardele de performanță (6)

([8]) Dacă o substanță de verificare nu mai este disponibilă în comerț, poate fi utilizată o substanță cu aceeași clasificare și cu o putere, mod de acțiune și clasă de substanțe chimice comparabile.

Tabelul 4

Lista (10) substanțelor de verificare pentru testul antagoniștilor

	Substanță [2]	NR CAS	Testul ER STTA [3]			Testul VM7Luc ER TA [4]			Efectele candidate ER STTA [3]	ICCVAM [6] Clasificare prin consens	MeSH [7] Clasă chimică	Clasă de produse [8]
			Activitatea ER TA	IC_{50} (M)	Interval de concentr. de testare (M)	Activitatea ER TA	IC_{50} [5] (M)	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) [6]				
1	4-hidroxitamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12} – 10^{-7}	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
2	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12} – 10^{-7}	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10} – 10^{-5}	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	spre negativ (*)	PN	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
5	Apigenină	520-36-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Compus heterociclic	Colorant, produs natural, produs farmaceutic intermediar
6	Ftalat de di-n-butil	84-74-2	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, acid ftalic	Ingredient cosmetic, substanță chimică industrială, plastifiant

	Substanță (2)	NR CAS	Testul ER STTA (3)			Testul VM7Luc ER TA (4)			Efectele candidate ER STTA (3)	ICCVAM (6) Clasificare prin consens	MeSH (7) Clasă chimică	Clasă de produse (8)
			Activitatea ER TA	IC_{50} (M)	Interval de concentr. de testare (M)	Activitatea ER TA	IC_{50} (5) (M)	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) (6)				
7	Flavonă	525-82-6	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	spre negativ (*)	PN	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
8	Genisteină	446-72-0	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	spre negativ (*)	NEG	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
9	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	netestat	NEG	Fenol	Substanță chimică intermediară
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	spre negativ (*)	NEG	Hidrocarbură (ciclică)	Produs natural

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; M = molar; IC_{50} = jumătate din concentrația maximă de inhibare a substanței de testat; NEG = negativ; PN = presupus negativă; POS = pozitiv.

(*) clasificată ca fiind negativă analizei literaturii de specialitate (2).

(2) Substanțe comune testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA care au fost desemnate ca fiind antagoniști ER sau negative și utilizate pentru a evalua precizia în studiul de validare VM7Luc ER TA (2) (3).

(3) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

(4) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

(5) Valorile medii IC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

(6) Concentrațiile raportate au fost concentrațiile cele mai mari testate (identificarea intervalelor) în timpul validării testului VM7Luc ER TA. În cazul în care există diferențe de concentrații între laboratoare, se consemnează cea mai mare concentrație. A se vedea tabelul 4-11 din Raportul de evaluare a metodei de testare ICCVAM; Metoda de testare LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Un test *in vitro* pentru identificarea activității substanțelor chimice ca agoniști sau antagoniști ai receptorilor de estrogen (An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

(6) Clasificarea ca substanțe antagoniste ER sau negative a fost bazată pe informații din documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru metodele de testare privind legarea de ER și TA (31), precum și pe informații obținute din lucrările publicate și revizuite după finalizarea BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31).

(7) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(8) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Data Bank) a National Library of Medicine din Statele Unite (material disponibil la adresa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Criteriile de acceptabilitate a unui test

16. Acceptarea sau respingerea unui test se bazează pe evaluarea rezultatelor obținute pentru standardele și martorii de referință utilizați pentru fiecare experiment. Valorile pentru PC_{50} (EC_{50}) sau IC_{50} pentru standardele de referință ar trebui să îndeplinească criteriile de acceptabilitate prevăzute pentru testul selectat (pentru STTA, a se vedea apendicele 2, pentru VM7Luc ER TA, a se vedea apendicele 3) și toți martorii pozitivi/negativi ar trebui să fie clasificați în mod corect pentru fiecare experiment acceptat. Capacitatea de a efectua în mod consecvent testul ar trebui să fie demonstrată prin dezvoltarea și întreținerea unei baze de date istorice pentru standardele de referință și martori (a se vedea punctul 15). Ca o măsură a reproductibilității în cadrul laboratorului, pot fi utilizate abateri standard (SD) sau coeficienți de variație (CV) pentru mediile de pe curba standardelor de referință care corelează parametrii din cadrul mai multor experimente. În plus, ar trebui să fie îndeplinite următoarele principii referitoare la criteriile de acceptabilitate:

— Datele ar trebui să fie suficiente pentru o evaluare cantitativă a activării ER (pentru testul de agonist) sau a suprimării ER (pentru testul de antagonist) (și anume, eficacitate și putere).

— Activitatea medie a reporterilor pentru concentrația de referință a estrogenului de referință ar trebui să fie cel puțin egală cu valoarea minimă specificată în teste, raportat la valoarea martorului tratat cu vehicul (solvent) pentru a asigura o sensibilitate adecvată. Pentru testele STTA și VM7Luc ER TA, aceasta este de patru ori mai mare decât media martorului tratat cu vehicul de pe fiecare placă.

— Concentrațiile testate ar trebui să rămână în intervalul de solubilitate al substanțelor chimice de testat și să nu demonstreze citotoxicitate.

Analiza datelor

17. Ar trebui să se recurgă la procedura specifică de interpretare a datelor pentru fiecare test pentru clasificarea unui răspuns pozitiv și negativ.

18. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate (punctul 16) indică faptul că testul funcționează în mod corespunzător, dar nu asigură faptul că orice testare specifică va genera date precise. Reproducerea rezultatelor primei testări indică cel mai bine faptul că au fost generate date precise. Dacă sunt generate rezultate reproductibile în urma a două testări (de exemplu, rezultatele ambelor testări indică faptul că o substanță chimică de testat este pozitivă), nu este necesar să se efectueze o a treia testare.

19. Dacă două testări nu generează rezultate reproductibile (de exemplu, o substanță chimică de testat este pozitivă într-un test și negativă în celălalt test) sau în cazul în care este necesar un grad mai mare de certitudine în ceea ce privește rezultatul acestui test, ar trebui să fie efectuate cel puțin trei testări independente. În acest caz, clasificarea se bazează pe cele două rezultate concordante din trei.

Criterii generale de interpretare a datelor

20. În prezent, nu există nicio metodă convenită în mod universal pentru interpretarea datelor ER TA. Însă ambele evaluări calitative (de exemplu, pozitiv/negativ) și/sau cantitative (de exemplu, EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) ale activității mediate de ER ar trebui să fie bazate pe date empirice și un raționament științific solid. Dacă este posibil, rezultatele pozitive ar trebui să fie caracterizate atât de magnitudinea efectului față de martorul tratat cu vehicul (solvent) sau de estrogenul de referință, cât și de concentrația la care se produce efectul (de exemplu, EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} etc.).

Raport testului

21. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Test:

— test utilizat;

— martor/standard de referință/substanță chimică de testat;

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent/vehicul:

— caracterizare (natură, furnizor și lot);

— justificarea alegerii solventului/vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Celule:

— tipul și sursa celulelor:

  • Este ER exprimat din punct de vedere endogen? Dacă nu, ce receptor(i) a/au fost transfectat (transfectați)?

  • structura (structurile) de reporter utilizată (utilizate) (inclusiv specii sursă);

  • metoda de transfectare;

  • metoda de selecție pentru menținerea stabilității transfectării (dacă este cazul);

  • Metoda de transfectare este relevantă pentru liniile stabile?

— numărul trecerilor de celule (de la decongelare);

— numărul trecerilor de celule la decongelare;

— metode de întreținere a culturilor de celule.

Condiții de testare:

— limite de solubilitate;

— descrierea metodelor de evaluare a viabilității aplicate;

— compoziția mediilor, concentrația CO_2;

— concentrațiile substanței chimice de testat;

— volumul vehiculului și al substanței chimice de testat adăugate;

— temperatura și umiditatea de incubație;

— durata tratamentului;

— densitatea celulară la începutul și în timpul tratamentului;

— standarde de referință pozitive și negative;

— reactivii reporter (denumirea produsului, furnizor și lot);

— criterii utilizate la aprecierea testelor ca fiind pozitive, negative sau echivoce.

Verificarea de acceptabilitate:

— inducții multiple pentru fiecare placă de testare și dacă acestea respectă cerințele minime ale testului pe baza martorilor testați anterior;

— valorile efective pentru criteriile de acceptabilitate, de exemplu, $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ și valorile Hillslope, pentru martorii pozitivi testați în paralel/standardele de referință.

Rezultate:

— date brute și normalizate;

— nivelul maxim de multiplicare a inducției;

— date privind citotoxicitatea;

— dacă există, cea mai redusă valoare a concentrației efective (LEC);

— valorile RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} și/sau EC_{50}, după caz;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— analize statistice, dacă există, împreună cu o măsurare a erorii și a încrederii (de exemplu, SEM, SD, CV sau 95 % CI) și o descriere a modului în care au fost obținute aceste valori.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (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, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 225), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. și 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) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 173), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 174), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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. 173187.

(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. și 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. și 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. Apendicele D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (nr. 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 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. și 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.

Apendicele 1

DEFINIȚII ȘI ABREVIERI

Criterii de acceptabilitate: Standarde minime pentru efectuarea de controale experimentale și standarde de referință. Toate criteriile de acceptabilitate ar trebui să fie îndeplinite pentru ca un experiment să fie considerat valabil.

Precizie (concordanță): Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (1).

Agonist: O substanță care produce un răspuns, de exemplu, transcriere, atunci când se leagă de un anumit receptor.

Antagonist: Un tip de receptor ligand sau substanță chimică ce nu provoacă un răspuns biologic ea însăși la legarea de un receptor, însă blochează sau atenuează răspunsurile mediate de agonist.

Activitate antiestrogenică: capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea substanței 17β-estradiol mediate prin receptori estrogeni.

Morfologia celulei: forma și aspectul celulelor cultivate într-un monostrat într-un singur godeu de pe placa de cultură a țesutului. Celulele care mor prezintă adesea o morfologie celulară anormală.

CF: Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea disruptorilor endocrini.

Tratare cu cărbune/dextran: Tratarea serului utilizat în cultura celulară. Tratarea cu cărbune/dextran (denumită adesea „stripare") elimină hormonii endogeni și proteinele care leagă hormonii.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Citotoxicitate: Efecte dăunătoare asupra structurii sau funcției celulelor care pot provoca, în cele din urmă, moartea celulelor și se pot reflecta printr-o reducere a numărului de celule prezente în godeu la sfârșitul perioadei de expunere sau o reducere a capacității de măsurare a funcției celulare comparativ cu martorul tratat cu vehicul testat în paralel.

CV: Coeficient de variație

DCC-FBS: Ser fetal bovin tratat cu cărbune acoperit cu dextran.

DMEM: Modificarea de către Dulbecco a mediului lui Eagle

DMSO: Dimetil sulfoxid

E2: 17β-estradiol

EC50: Jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat.

ED: Perturbare endocrină

hERα: Receptor alfa de estrogen uman

hERß: Receptor beta de estrogen uman

EFM: Mediu fără estrogen. Modificarea de către Dulbecco a mediului lui Eagle (DMEM) suplimentată cu soluție 4,5 % FBS tratată cu cărbune/dextran, 1,9 % L-glutamină și 0,9 % Pen-Strep.

ER: Receptor de estrogen

ERE: Element de răspuns estrogen

Activitate estrogenă: Capacitatea unei substanțe chimice de a imita 17β-estradiol în capacitatea sa de a se lega de receptorii de estrogen și de a-i activa. Cu această metodă de testare se poate detecta activitatea estrogenă mediată de hERα.

ERTA: Transactivare a receptorului de estrogen

FBS: Ser fetal bovin

HeLa: O linie celulară cervicală umană nemuritoare

HeLa9903: O subclonă de celule HeLa în care au fost transfectate în mod stabil hERαα și o genă luciferază reporter

IC_{50}: Jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat inhibitoare.

ICCVAM: Comitetul de coordonare între agenții cu privire la validarea metodelor alternative (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Reproductibilitatea între laboratoare: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproductibilitatea între laboratoare este determinată în timpul proceselor de pre-validare și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes între laboratoare, denumită de asemenea, reproductibilitate între laboratoare (1).

Reproductibilitatea în cadrul laboratorului: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (1).

LEC: Concentrația efectivă cea mai scăzută este concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testat care produce un răspuns (și anume, cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat la care inducția multiplă este statistic diferită de martorul tratat cu vehicul testat în paralel).

Testul „me-too”: O expresie colocvială utilizată pentru un test care este, din punct de vedere structural și funcțional, similar cu o metodă de testare de referință validată și acceptată. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară.

MT: Metalotioneină

MMTV: Virusul tumorilor mamare la șoareci

OHT: 4-hidroxi-tamoxifen

PBTG: Orientarea privind testarea pe baza performanței

MP (Martor pozitiv): o substanță puternic activă, de preferință 17ß-estradiol, care este inclusă în toate testele pentru a contribui la buna funcționare a testului.

PC_{10}: concentrația unei substanțe chimice de testat la care activitatea măsurată într-un test de agonist este de 10 % din activitatea maximă indusă de MP (E2 la 1nM pentru testul STTA) pe fiecare placă.

PC_{50}: concentrația unei substanțe chimice de testat la care activitatea măsurată într-un test de agonist este de 50 % din activitatea maximă indusă de MP (E2 la concentrația de referință specificată în metoda de testare) pe fiecare placă.

PC_{Max}: concentrația unei substanțe chimice de testat care induce valoarea RPCMax

Standarde de performanță: Standarde bazate pe un test validat, care asigură baza pentru evaluarea comparabilității unui test propus similar din punct de vedere al mecanismului și funcțional. Sunt incluse (1) componente esențiale ale testului; (2) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanța acceptabilă a metodei de testare validate; și (3) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin testul propus la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (1).

Substanțe de verificare: Un subset de substanțe de referință incluse în standardele de performanță, care pot fi utilizate de către laboratoare pentru a demonstra competența tehnică cu o metodă de testare standardizată. Criteriile de selecție pentru aceste substanțe includ, de regulă, faptul că acestea reprezintă intervalul de răspunsuri, sunt disponibile în comerț și pentru acestea există date de referință de înaltă calitate.

Competență: Capacitatea demonstrată de a efectua în mod corespunzător un test înainte de a testa substanțe necunoscute.

Estrogen de referință (martor pozitiv, MP): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Standard de referință: O substanță de referință utilizată pentru a demonstra caracterul adecvat al unui test. 17β-estradiol este standardul de referință pentru testele STTA și VM7Luc ER TA.

Metode de testare de referință: Testele pe care se bazează PBTG 455.

Relevanță: Descrierea relației dintre un test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (1).

Fiabilitate: Un indicator al faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare.

RLU: Unități de lumină relative

ARN: Acid ribonucleic

RPC_{Max}: nivelul maxim de răspuns indus de o substanță chimică de testat, exprimat ca procent din răspunsul indus de 1 nM E2 pe aceeași placă

RPMI: Un mediu RPMI 1 640 completat cu soluție de 0,9 % Pen-Strep și 8,0 % ser fetal bovin (FBS)

Test: Un experiment individual care evaluează acțiunea chimică asupra rezultatului biologic al testului. Fiecare test constituie un experiment complet realizat în godeuri duplicate de celule așezate în placă dintr-o rezervă comună de celule în același timp.

Test independent: Un experiment separat, independent, care evaluează acțiunea chimică asupra rezultatului biologic al testului, utilizând celule dintr-o rezervă diferită, substanțe chimice diluate recent, și care este realizat în zile diferite sau în aceeași zi de către persoane diferite.

SD: Abatere standard.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor pozitive/active clasificate corect în urma testului. Aceasta măsoară precizia în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (1).

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor negative/inactive clasificate corect în urma testului. Aceasta măsoară precizia în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (1).

Transfectare stabilă: Atunci când ADN-ul este transfectat în celule cultivate, astfel încât este integrat în mod stabil în genomul celulelor, ceea ce conduce la manifestarea stabilă a genelor transfectate. Clonele celulelor transfectate stabil sunt selectate prin markeri stabili (de exemplu, rezistența la G418).

Testul STTA: Test de transactivare cu transfectare stabilă, test de activare transcripțională ERα utilizând linia celulară HeLa 9 903.

Studiu: Întreaga serie de lucrări experimentale realizate pentru evaluarea unei singure substanțe specifice, utilizând un anumit test. Un studiu cuprinde toate etapele, inclusiv testele de diluare a substanței de testat în mediile de testare, testele preliminare de identificare a intervalelor, toate testele complexe necesare, analize ale datelor, asigurarea calității, evaluările ale citotoxicității etc. Finalizarea unui studiu permite clasificarea activității substanței chimice de testat asupra obiectivului de toxicitate (și anume, activă, inactivă sau neconcludentă) care este evaluat prin testul utilizat și o estimare a puterii cu raportare la substanța chimică de referință pozitivă.

Substanță: În cadrul REACH ([1]), o substanță este definită ca fiind un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru păstrarea stabilității acesteia și orice impurități care derivă din procesul utilizat, cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția. O definiție foarte similară este utilizată în contextul GHS al ONU (1).

TA (Transactivare): Inițierea sintezei mRNA ca răspuns la semnalul unei anumite substanțe chimice, cum ar fi legarea unui estrogen de receptorul de estrogen

Test: În contextul prezentei metode de testare, un test constituie una dintre metodologiile acceptate ca fiind valabile pentru îndeplinirea criteriilor de performanță prezentate. Componentele testului includ, de exemplu, linia celulară specifică, cu condiții de creștere asociate, medii specifice în care se desfășoară testul, condiții de pregătire a plăcii, dispunerea și diluțiile substanțelor chimice de testat, împreună cu orice alte măsuri de control al calității impuse și etapele conexe de evaluare a datelor.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Transcriere: sinteza mARN

UVCB: substanțe chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă și materiale biologice

Metodă de testare validată: Un test pentru care au fost realizate studii de validare pentru determinarea relevanței (inclusiv a preciziei) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de precizat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (1).

Validare: Procesul prin care se stabilește fiabilitatea și relevanța unei anumite abordări, metode, test, proces sau evaluări specifice pentru un scop definit (1).

VC (Martor tratat cu vehicul): Solventul utilizat pentru dizolvarea substanțelor chimice de testat și a celor martor este testat numai ca vehicul, fără substanța chimică dizolvată.

VM7: O celulă de adenocarcinom imortalizat care exprimă în mod endogen receptorul de estrogen.

VM7Luc4E2: Linia celulară VM7Luc4E2 a fost derivată din celule de adenocarcinom VM7 imortalizate de la om care exprimă în mod endogen ambele forme ale receptorului de estrogen (ERα și ERβ) și au fost transfectate stabil cu plasmidă pGudLuc7.ERE. Această plasmidă conține patru copii ale unei oligonucleotide sintetice care conține elementul de răspuns estrogen în amonte de promotorul virusului tumoral mamar (MMTV) la șoareci și de gena luciferazei la licurici.

Martor slab pozitiv: O substanță slab activă selectată din lista substanțelor chimice de referință, care este inclusă în toate testele pentru a contribui la buna funcționare a testului.

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei (JO L 304, 22.11.2007, p. 1).

Apendicele 2

TESTUL DE TRANSACTIVARE A RECEPTORULUI A DE ESTROGEN UMAN TRANSFECTAT STABIL PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII AGONISTE ȘI ANTAGONISTE A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE UTILIZEAZĂ LINIA CELULARĂ HERA-HELA-9903

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Acest test de transactivare (TA) utilizează linia celulară hERα-HeLa-9 903 pentru a detecta activitatea agonistă estrogenă mediată prin receptorul alfa de estrogen uman (hERα). Studiul de validare a testului de transactivare cu transafectare stabilă (STTA) realizat de către Institutul Japonez de Cercetare și Evaluare a Substanțelor Chimice (CERI) folosind linia celulară hERα-HeLa-9 903 pentru a detecta activitatea agonistă și antagonistă estrogenă mediată prin receptorul de estrogen uman (hERα) a demonstrat relevanța și fiabilitatea testului pentru scopul prevăzut (1).

2. Acest test este conceput special pentru a detecta TA mediată de hERα prin măsurarea chemiluminiscenței ca punct final. Însă au fost raportate semnalele de luminescență nemediate de receptori la concentrații de fitoestrogen mai mari de 1 μM din cauza supraactivării genei luciferază reporter (2) (3). În timp ce curba doză-răspuns indică faptul că o reală activare a sistemului ER se produce la concentrații mai mici, expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau compuși similari susceptibili de a produce o supra-activare a genei luciferază reporter similară fitoestrogenilor trebuie să fie atent examinată în cadrul sistemelor de testare ER TA transfectat stabil (apendicele 1).

3. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „INTRODUCERE GENERALĂ” și „COMPONENTE ALE ANALIZEI ER TA” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta orientare privind testarea sunt descrise în apendicele 2.1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

4. Testul este utilizat pentru a indica legarea receptorului de estrogen cu un ligand. După legarea cu ligand, complexul receptor-ligand circulă spre nucleu unde leagă anumite elemente de răspuns ADN și transactivează o genă luciferază reporter de licurici, ceea ce determină o expresie celulară crescută a enzimei luciferază. Luciferina este un substrat care este transformat de enzima luciferază într-un produs de bioluminiscență care poate fi măsurat cantitativ cu un luminometru. Activitatea luciferazei poate fi evaluată rapid și cu costuri reduse cu ajutorul unor truse de testare disponibile în comerț.

5. Sistemul de testare utilizează linia celulară hERα-HeLa-9 903, care provine de la o tumoră cervicală umană, cu două structuri inserate în mod stabil: (i) structura expresiei hERαα (codificând receptorul uman complet) și (ii) o structură reporter de luciferază de la licurici care poartă cinci repetiții în tandem de un element de vitelogenină reactiv la estrogen (ERE) activat de un element TATA promotor de metalotioneină (MT) de la șoarece. S-a demonstrat că structura genei TATA MT de la șoarece are cele mai bune performanțe și, prin urmare, este folosită în mod frecvent. În consecință, această linie celulară hERα-HeLa-9 903 poate măsura capacitatea unei substanțe chimice de testat de a induce transactivarea mediată de hERα a expresiei genei luciferază.

6. În cazul testului de agonist ER, interpretarea datelor se bazează pe problema dacă nivelul maxim de răspuns indus de o substanță chimică de testat este mai mare decât sau egală cu răspunsul unui agonist echivalent cu 10 % din răspunsul indus de o concentrație cu inducere maximă (1 nM) a martorului pozitiv (MP) 17β-estradiol (E2) (și anume, PC10). În cazul testului de antagonist al ER, interpretarea datelor se bazează pe problema dacă răspunsul indică cel puțin o reducere de 30 % a activității pe baza răspunsului indus de creșterea bruscă a concentrației martorului (25 pM din E2) fără citotoxicitate. Analiza datelor și interpretarea sunt discutate în detaliu la punctele 34-48.

PROCEDURA

Linii celulare

7. Pentru test ar trebui să se utilizeze linia celulară hERα-HeLa-9 903 transfectată stabil. Linia celulară poate fi obținută din colecția japoneză Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank [1], la semnarea unui acord de transfer de material (MTA).

8. Pentru testare ar trebui să se utilizeze numai celule caracterizate ca fiind fără micoplasme. RT-PCR (reacție de polimerizare în lanț în timp real) reprezintă metoda aleasă pentru detectarea sensibilă a infecției cu micoplasme (4) (5) (6).

Stabilitatea liniei celulare

9. Pentru a monitoriza stabilitatea liniei celulare, E2, ar trebui să se utilizeze 17α-estradiol, 17αmetiltestosteron și corticosteron ca standarde de referință pentru testul agonist și ar trebui să se măsoare o curbă concentrație-răspuns completă în intervalul de concentrații de testare prevăzut în tabelul 1 cel puțin o dată la fiecare testare, iar rezultatele ar trebui să fie consecvente cu rezultatele prezentate în tabelul 1.

10. În cazul testului antagonist, ar trebui să se măsoare simultan, la fiecare testare, curbele complete ale concentrației pentru două standarde de referință, tamoxifen și flutamidă. Ar trebui să se monitorizeze clasificarea calitativă corectă ca fiind pozitivă sau negativă pentru cele două substanțe chimice.

Cultura celulară și condiții de aranjare pe placă

11. Celulele ar trebui să fie păstrate în mediul esențial minim al lui Eagle (EMEM) fără roșu de fenol, suplimentat cu 60 mg/l de antibiotic kanamicină și 10 % ser fetal bovin tratat cu cărbune și acoperit cu dextran (DCC-FBS), într-un incubator CO2 (5 % CO2) la 37 ± 1˚C. La atingerea unei confluențe de 75-90 %, celulele pot fi subcultivate la 10 din 0,4 x 105 – 1 x 105 celule/ml pentru un vas de cultură a celulelor de 100 mm. Celulele ar trebui să fie suspendate în soluție de 10 % FBS-EMEM (care este identic cu EMEM cu DCC-FBS) și apoi aranjate în godeurile unei microplăci la o densitate de 1 x 104 celule/(100 µl x godeu). Apoi, celulele ar trebui să fie preincubate într-un incubator cu 5 % CO2 la 37˚ ± 1 ˚C timp de 3 ore înainte de expunerea la substanțe chimice. Materialul din plastic ar trebui să fie fără activitate estrogenă.

12. Pentru a menține integritatea răspunsului, celulele ar trebui să fie cultivate pentru mai multe pasaje din stocul congelat în mediu condiționat, dar nu pentru mai mult de 40 de pasaje. Pentru linia celulară hERα-HeLa-9 903, această perioadă va fi mai mică de trei luni. Însă performanța celulelor poate fi redusă dacă acestea sunt cultivate în condiții de cultură necorespunzătoare.

13. Soluția DCC-FBS poate fi preparată conform descrierii din apendicele 2.2 sau poate fi obținută din surse comerciale.

Criterii de acceptabilitate

Standarde de referință pozitive și negative pentru testul de agonist ER

14. Înaintea și în timpul studiului, capacitatea de răspuns a sistemului de testare ar trebui să fie verificată utilizând concentrațiile adecvate ale unui estrogen puternic: E2, un estrogen slab (17α-estradiol), un agonist foarte slab (17α-metiltestosteron) și o substanță negativă (corticosteron). Valorile din intervalul acceptabil derivate din studiul de validare (1) sunt date în tabelul 1. Aceste patru standarde de referință concurente ar trebui să fie incluse în fiecare experiment, iar rezultatele ar trebui să se încadreze în limitele acceptabile date. În caz contrar, ar trebui să se identifice cauza neîndeplinirii criteriilor de acceptabilitate (de exemplu, manipularea celulelor, precum și serul și antibioticele pentru calitate și concentrație), iar testul se repetă. Odată ce au fost îndeplinite criteriile

[1] Banca de celule JCRB: Institutul Național de Inovație Biomedicală (National Institute of Biomedical Innovation), 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonia Fax: +81-72-641-9812

de acceptabilitate, pentru a se asigura variabilitatea minimă a valorilor EC_{50}, PC_{50} and PC_{10}, este esențială utilizarea consecventă a materialelor pentru cultura celulară. Cele patru standarde de referință concurente, care ar trebui să fie incluse în fiecare experiment (realizat în aceleași condiții, inclusiv cu aceleași materiale, nivel de trecere a celulelor și tehnicieni) pot asigura sensibilitatea testului, deoarece valorile PC_{10} dintre cele trei standarde de referință pozitive ar trebui să se încadreze în intervalul acceptabil, la fel ca și valorile PC_{50}și EC_{50}, în cazul în care acestea pot fi calculate (a se vedea tabelul 1).

Tabelul 1

Valori din intervalul acceptabil ale celor patru standarde de referință pentru testul de agonist ER

Denumire	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Panta Hill	Interval de testare
17β-estradiol (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-estradiol 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
Corticosteron CAS nr.: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10} ~ 10^{-4}M
17α-metiltestosteron CAS nr.: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	–	–	10^{-11} ~ 10^{-5}M

Standarde de referință pozitive și negative pentru testul de antagonist ER

15. Înaintea și în timpul studiului, capacitatea de răspuns a sistemului de testare ar trebui să fie verificată utilizând concentrațiile adecvate ale unui substanțe pozitive (tamoxifen) și ale unei substanțe negative (flutamidă). Valorile din intervalul acceptabil derivate din studiul de validare (1) sunt date în tabelul 2. Aceste două standarde de referință concurente ar trebui să fie incluse în fiecare experiment, iar rezultatele ar trebui să fie evaluate ca fiind corecte conform criteriilor. În caz contrar, ar trebui să se identifice cauza neîndeplinirii criteriilor (de exemplu, manipularea celulelor, precum și serul și antibioticele pentru calitate și concentrație), iar testul se repetă. În plus, ar trebui să fie calculate valorile IC_{50} pentru o substanță pozitivă (tamoxifen), iar rezultatele ar trebui să se încadreze în limitele acceptabile date. Odată ce au fost îndeplinite criteriile de acceptabilitate, pentru a se asigura variabilitatea minimă a valorilor IC50, este esențială utilizarea consecventă a materialelor pentru cultura celulară. Cele două standarde de referință concurente care trebuie incluse în fiecare experiment (realizat în aceleași condiții, inclusiv cu aceleași materiale, nivel de trecere a celulelor și tehnicieni) pot asigura sensibilitatea testului (a se vedea tabelul 2).

Tabelul 2

Criterii și valori din intervalul acceptabil ale celor două standarde de referință pentru testul de antagonist ER

Denumire	Criterii	$LogIC_{50}$	Interval de testare
Tamoxifen CAS nr.: 10 540-29-1	Pozitiv: Ar trebui să se calculeze IC50	-5,942 -7,596	10-10 10-5 M
Flutamidă CAS nr.: 13 311-84-7	Negativ: Nu ar trebui să se calculeze IC30	—	10-10 10-5 M

Martori pozitivi și martori tratați cu vehicule

16. Martorul pozitiv (MP) pentru testul de agonist ER (1 nM din E2) și pentru testul de antagonist ER (10 μM TAM) ar trebui să fie testat de cel puțin trei ori pe fiecare placă. Vehiculul care se utilizează pentru a dizolva o substanță chimică de testat ar trebui să fie testat ca martor tratat cu vehicul (VC) de cel puțin trei ori pe fiecare placă. în plus față de acest VC, dacă MP utilizează un vehicul diferit de cel al substanței chimice de testat, un alt VC ar trebui testat de cel puțin trei ori pe aceeași placă cu MP.

Criterii de calitate pentru testul de agonist ER

17. Activitatea medie a luciferazei la martorul pozitiv (1 nM E2) ar trebui să fie de cel puțin patru ori mai mare decât media VC pe fiecare placă. Acest criteriu se stabilește pe baza fiabilității valorilor punctelor finale din studiul de validare (istoric de patru până la 30 de ori).

18. În ceea ce privește controlul calității testului, inducția multiplicată corespunzătoare valorii PC10 a martorului MP testat în paralel (1 nM E2) ar trebui să fie mai mare de 1 + 2 SD din valoarea inducției multiplicate (= 1) a martorului VC testat în paralel. Pentru stabilirea priorităților, valoarea PC10 poate fi utilă pentru a simplifica analiza datelor, care este necesară în comparație cu o analiză statistică. Deși o analiză statistică oferă informații privind semnificația, o astfel de analiză nu constituie un parametru cantitativ în ceea ce privește potențialul bazat pe concentrație, și astfel este mai puțin utilă în scopul stabilirii priorităților.

Criterii de calitate pentru testul de antagonist ER

19. Activitatea medie a luciferazei la creșterea bruscă a concentrației martorului (25 pM E2) ar trebui să fie de cel puțin patru ori mai mare decât media VC pe fiecare placă. Acest criteriu se stabilește pe baza fiabilității valorilor punctelor finale din studiul de validare.

20. În ceea ce privește controlul calității testului, activarea transcripțională relativă (RTA) de 1 nM E2 ar trebui să fie mai mare de 100 %, RTA de 1μM 4-hidroxitamoxifen (OHT) ar trebui să fie mai mică de 40,6 % , iar RTA de 100 μM digitonină (Dig) ar trebui să fie mai mică de 0 %.

Demonstrarea performanțelor laboratorului (a se vedea punctul 14 și tabelele 3 și 4 de la secțiunea «COMPONENTELE TESTULUI ER TA» din prezenta metodă de testare).

Vehicul

21. Ca și VC testat în paralel ar trebui să se utilizeze dimetilsulfoxid (DMSO) sau un solvent adecvat, la aceeași concentrație utilizată pentru diferiții martori pozitivi și negativi, iar substanțele chimice de testat ar trebui să fie utilizate ca VC testat în paralel. Substanțele chimice de testat ar trebui să se dizolve într-un solvent care solubilizează substanța chimică de testat și este miscibil cu mediul celular. Vehicule adecvate sunt apa, etanolul (puritate de 95-100 %) și DMSO. În cazul în care se utilizează DMSO, nivelul nu ar trebui să depășească 0,1 % (v/v). Pentru orice vehicul, ar trebui să se demonstreze că volumul maxim utilizat nu este citotoxic și nu interferează cu performanțele testului.

Prepararea substanțelor chimice de testat

22. În general, substanțele chimice de testat ar trebui să fie dizolvate în DMSO sau într-un alt solvent adecvat și diluate în serie cu același solvent la un raport comun de 1:10 în vederea preparării soluțiilor pentru diluare cu medii.

Solubilitate și citotoxicitate: Considerații pentru identificarea intervalului.

23. Ar trebui efectuat un test preliminar pentru a determina intervalul adecvat de concentrații pentru substanța chimică ce urmează să fie testată și pentru a confirma dacă substanța chimică de testat ar putea avea probleme de solubilitate și citotoxicitate. Inițial, substanțele chimice sunt testate până la concentrația maximă de 1 μl/ml, 1 mg/ml sau 1 mM, luându-se în considerare cea mai mică valoare. În funcție de gradul de citotoxicitate sau de lipsa solubilității observată la testul preliminar, prima testare specifică ar trebui să testeze substanța chimică la diluții log în serie, începând de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, 1 mM, 100 μM, 10 μM etc.) și se consemnează prezența aspectului cețos sau a precipitatului sau citotoxicitatea. Concentrațiile în cadrul celei de a doua și, dacă este necesar, celei de a treia testări ar trebui să fie ajustate, după caz, pentru a caracteriza mai bine curba concentrație-răspuns și pentru a evita concentrațiile care se dovedesc a fi insolubile sau a induce o citotoxicitate excesivă.

24. Agoniștii și antagoniștii de ER și prezența unor niveluri tot mai mari ale citotoxicității pot să modifice în mod semnificativ sau să elimine răspunsul sigmoidal tipic și ar trebui să fie luate în considerare la interpretarea datelor. Ar trebui să se folosească metode de testare a citotoxicității care pot oferi informații cu privire la viabilitatea celulară de 80 %, utilizând un test adecvat bazat pe experiența de laborator.

25. În cazul în care rezultatele testului de citotoxicitate arată că concentrația substanței chimice de testat a redus numărul celulelor cu 20 % sau mai mult, această concentrație ar trebui să fie considerată ca fiind citotoxică, iar concentrațiile la nivelul concentrației citotoxice sau peste aceasta ar trebui să fie excluse de la evaluare.

Expunerea la substanțe chimice și organizarea plăcilor pentru testare

26. Procedura pentru diluții chimice (etapele 1 și 2) și expunerea la celule (etapa 3) pot fi realizate după cum urmează:

Etapa 1: Fiecare substanță chimică de testat ar trebui să fie diluată în serie în DMSO sau înr-un solvent adecvat și adăugată în godeurile unei plăci de microtitrare pentru a realiza concentrații în serie finale, astfel cum sunt determinate prin testul preliminar de identificare a intervalului [de regulă, într-o serie, de exemplu, de 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, and 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)] pentru teste triple.

Etapa 2: Diluție chimică: Mai întâi se diluează 1,5 μl din substanța chimică de testat în solvent la un volum de 500 μl de medii.

Etapa 3: Expunerea celulelor la substanțe chimice: Se adaugă 50 μl de diluție cu medii (preparată în etapa 2) într-un godeu de analiză care conține 10^4 celule/100 μl/godeu.

Volumul final recomandat de medii necesar pentru fiecare godeu este de 150 μl. Eșantioanele de testare și standardele de referință pot fi distribuite astfel cum este indicat în tabelele 3 și 4.

Tabelul 3

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a standardelor de referință pe placa de testare în cadrul testului de agonist ER

Rând	17α-metiltestosteron			Corticosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO); MP: Martor pozitiv (1 nM E2)

27. Standardele de referință (E2, 17α-estradiol, 17−μετιλμτεστοστερονττιιχορτιχοστερονχχαρατρεβυιτο©©φιεφτεστατεττννχαδρυλχφιεχ©ρειρτεστ©ριρρταβελ υλααααα Godeurile cu MP tratați cu 1 nM de E2 și care pot produce o inducție maximă a E2 și VC tratați doar cu DMSO (sau un solvent adecvat) ar trebui să fie incluse pe fiecare placă de testare din cadrul analizei (tabelul 4). Dacă se utilizează celule din surse diferite (de exemplu, un număr de trecere diferit, un lot diferit etc.) în cadrul aceluiași experiment, ar trebui să se testeze standardele de referință pentru fiecare sursă celulară.

Tabelul 4

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a substanțelor chimice martor pe placa de testare în cadrul analizei de agonist ER

Rând	Substanța chimică de testat 1			Substanța chimică de testat 2			Substanța chimică de testat 3			Substanța chimică de testat 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO); MP: Martor pozitiv (1 nM E2)

Tabelul 5

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a standardelor de referință pe placa de testare în cadrul testului de antagonist ER

Rând	Tamoxifen			Flutamidă			Substanța chimică de testat 1			Substanța chimică de testat 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**conc 1 (10 μM)**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→
B	**conc 2 (1 μM)**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→
C	**conc 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**conc 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**conc 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**conc 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 μM OHT**	→	→	**100 μM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**MP**	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO), MP: Martor pozitiv (1 nM E2), OHT :4-hidroxitamoxifen, Dig: digitonină.

= completat cu 25 pM E2

28. Pentru a evalua activitatea de antagonist a substanțelor chimice, în godeurile de analiză de pe rândurile A-G ar trebui să se introducă 25 pm E2. Standardele de referință (tamoxifen și flutamidă) ar trebui să fie testate la fiecare testare. Godeurile cu MP tratate cu 1 nM de E2 care pot fi utilizate în vederea controlului calității liniei celulare hERα-HeLa-9 903, godeurile cu VC tratate cu DMSO (sau un solvent adecvat), godeurile cu 0,1 % DMSO tratate cu adăugare de DMSO la E2 completat corespunzător cu „Spike-in-control" , godeurile tratate cu o concentrație finală de 1 μM OHT și godeuri tratate cu 100 μM Dig ar trebui să fie adăugate la fiecare placă de testare (tabelul 5). Placa de testare ulterioară ar trebui să urmeze același plan de aranjare a plăcii fără godeuri standard de referință (tabelul 6). Dacă se utilizează celule din surse diferite (de exemplu, un număr de trecere diferit, un lot diferit etc.) în cadrul aceluiași experiment, ar trebui să se testeze standardele de referință pentru fiecare sursă celulară.

Tabelul 6

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a substanțelor chimice martor pe placa de testare în cadrul analizei de antagonist ER

Rând	Substanța chimică de testat 1			Substanța chimică de testat 2			Substanța chimică de testat 3			Substanța chimică de testat 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO), MP: Martor pozitiv (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifen, Dig: digitonină.

: Completat cu 25 pM E2

29. Lipsa efectelor extreme ar trebui să fie confirmată, după caz, iar dacă se suspectează prezența acestora, modul de aranjare pe placă ar trebui să fie schimbat pentru a evita astfel de efecte. De exemplu, se poate utiliza un mod de aranjare pe placă care să excludă godeurile de pe margini.

30. După adăugarea substanțelor chimice, plăcile de testare ar trebui să fie incubate într-un incubator de 5 % CO2 la temperatura de 37 ± 1 °C pentru 20-24 de ore pentru a induce produsele genei reporter.

31. Pentru compușii care sunt foarte volatili va fi necesar să se aplice considerații speciale. În astfel de cazuri, godeurile cu martori din apropiere pot genera valori fals pozitive și acest lucru ar trebui să fie analizat în contextul valorilor estimate și a celor istorice ale martorilor. În cele câteva cazuri în care volatilitatea poate fi o problemă, ar putea fi util să se recurgă la „agenți de etanșeizare a plăcii" pentru a izola în mod eficace godeurile individuale în timpul testării și, prin urmare, aceștia sunt recomandați în astfel de cazuri.

32. Ar trebui să se efectueze teste definitive repetate pentru aceeași substanță chimică în zile diferite, pentru asigurarea independenței.

Analiza luciferazei

33. Pentru efectuarea analizei poate fi utilizat un reactiv de analiză a luciferazei din comerț [de exemplu, Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 sau un produs echivalent)] sau un sistem de analiză a luciferazei standard (de exemplu, Promega, E1500 sau un produs echivalent), atâta timp cât sunt îndeplinite criteriile de acceptabilitate. Reactivii de analiză ar trebui să fie selectați pe baza sensibilității luminometrului care va fi utilizat. Atunci când se utilizează sistemul de analiză a luciferazei standard, ar trebui să se utilizeze Cell Culture Lysis Reagent (de exemplu, Promega, E1531 sau un produs echivalent) înainte de adăugarea substratului. Reactivul de luciferază ar trebui să fie aplicat conform instrucțiunilor producătorului.

ANALIZA DATELOR

Testul de agonist ER

34. În cazul testului de agonist ER, pentru a obține activitatea transcripțională relativă pe MP (1 nM de E2), se pot analiza semnalele de luminiscență de la aceeași placă cu respectarea următoarelor etape (sunt acceptabile, de asemenea, alte procese matematice echivalente):

Etapa 1. Se calculează valoarea medie pentru VC.

Etapa 2. Se scade valoarea medie a VC din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3. Se calculează media valorii MP normalizate.

Etapa 4. Se împarte valoarea normalizată a fiecărui godeu din placă la media valorii MP normalizate (MP = 100 %).

Valoarea finală a fiecărui godeu constituie activitatea transcripțională relativă pentru godeul respectiv în comparație cu răspunsul MP.

Etapa 5. Se calculează valoarea medie a activității transcripționale relative pentru fiecare grup de concentrații al substanței chimice de testat. Există două dimensiuni la răspuns: media activității transcripționale (răspuns) și concentrația la care se produce răspunsul (a se vedea secțiunea următoare).

Considerații privind inducția EC_{50}, PC_{50} și PC_{10}

35. Curba concentrație-răspuns completă este necesară pentru calcularea EC50, dar este posibil ca acest lucru să nu fie întotdeauna realizabil sau practic din cauza limitărilor intervalului de concentrații de testare (de exemplu, din cauza unor probleme de citotoxicitate sau de solubilitate). Însă, întrucât EC50 și nivelul maxim de inducție (corespunzător valorii superioare a ecuației Hill) sunt parametri informativi, acești parametri ar trebui să fie consemnați, dacă este posibil. Pentru calcularea EC50 și a nivelului maxim de inducție ar trebui să se utilizeze un software adecvat de statistică (de exemplu, software-ul statistic Graphpad Prism). În cazul în care ecuația logistică a lui Hill este aplicabilă pentru datele de răspuns la concentrații, valoarea EC50 ar trebui să fie calculată prin următoarea ecuație (7):

Y=Inferior+ (Superior-Inferior) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x panta Hill)) unde:

X este logaritmul concentrației; și,

Y este răspunsul și Y pornește din partea inferioară și ajunge în partea superioară într-o curbă sigmoidă. Partea inferioară este fixată la zero în ecuația logistică a lui Hill.

36. Pentru fiecare substanță chimică de testat, ar trebui să se prezinte:

valoarea RPCMax care este nivelul maxim de răspuns indus de o substanță chimică de testat, exprimată ca procent din răspunsul indus de 1 nM E2 de pe aceeași placă, precum și PC_{Max} (concentrație asociată cu RPCMax); și

În cazul substanțelor chimice pozitive, concentrațiile care induc PC10 și, dacă este cazul, PC50.

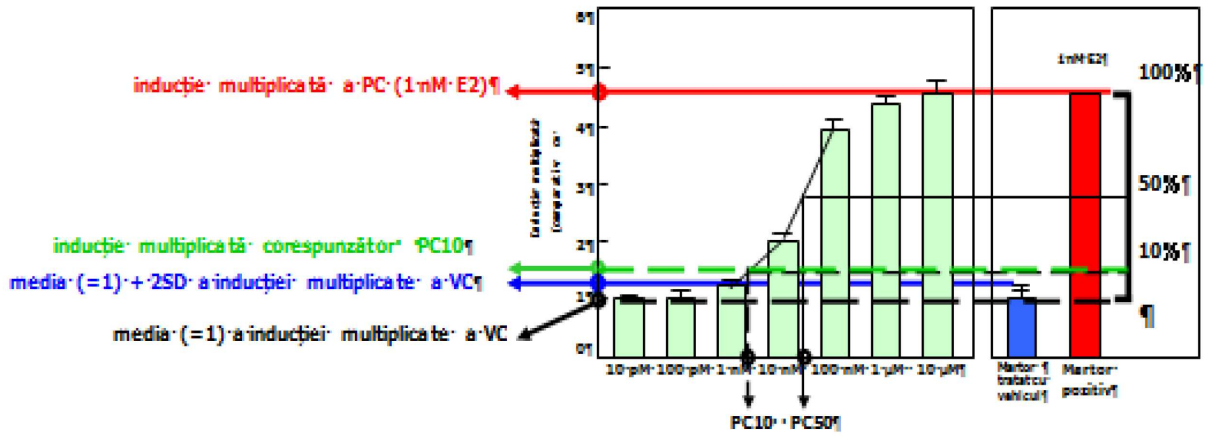
37. Valoarea PCx poate fi calculată prin interpolarea dintre 2 puncte pe axa coordonatelor X-Y, unul situat imediat deasupra și altul imediat sub o valoare PCx. În cazul în care punctele de date situate imediat deasupra și sub valoarea PCx au coordonatele (a, b) și, respectiv, (c, d), atunci valoarea PCx poate fi calculată folosind următoarea ecuație:

$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. Descrierile valorilor PC sunt prezentate în figura 1 de mai jos.

Figura 1

Exemplu de metodă de obținere a valorilor PC. PC (1 nM de E2) se adaugă pe fiecare placă de testare.



Testul de antagonist ER

39. În cazul testului de antagonist ER, pentru a obține activitatea transcripțională relativă (RTA) pentru adăugarea de martor (25 pM de E2), se pot analiza semnalele de luminiscență de la aceeași placă cu respectarea următoarelor etape (sunt acceptabile, de asemenea, alte procese matematice echivalente):

Etapa 1. Se calculează valoarea medie pentru VC.

Etapa 2. Se scade valoarea medie a VC din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele. Etapa 3. Se calculează media martorului de adăugat normalizat.

Etapa 4. Se împarte valoarea normalizată a fiecărui godeu din placă la media valorii martorului de adăugat normalizat (martor de adăugat = 100 %).

Valoarea finală a fiecărui godeu constituie activitatea transcripțională relativă pentru godeul respectiv în comparație cu răspunsul martorului de adăugat.

Etapa 5. Se calculează valoarea medie a activității transcripționale relative pentru fiecare tratament.

Considerații privind inducția IC_{30} și IC_{50}

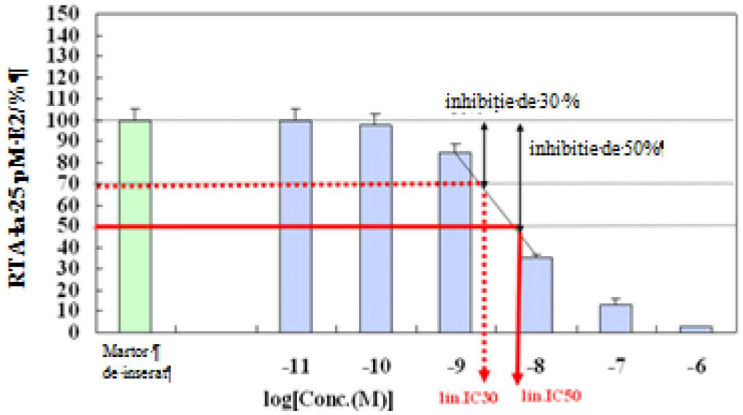
40. În cazul substanțelor chimice pozitive, ar trebui să se prezinte concentrațiile care induc IC30 și, dacă este cazul, IC50.

41. Valoarea ICx poate fi calculată prin interpolarea dintre 2 puncte pe axa coordonatelor X-Y, unul situat imediat deasupra și altul imediat sub o valoare ICx. În cazul în care punctele de date situate imediat deasupra și sub valoarea ICx au coordonatele (c, d) și, respectiv, (a, b), atunci valoarea ICx poate fi calculată folosind următoarea ecuație:

în ICx = a-[b-(100-x)] (a-c) /(b-d)

Figura 2

Exemplu de metodă de obținere a valorilor IC. Martorul de adăugat (25 nM de E2) se adaugă pe fiecare placă de testare.



RTA: activitate transcripțională relativă

42. Rezultatele ar trebui să fie bazate pe două (sau trei) testări independente. Dacă două testări generează rezultate comparabile și, prin urmare, reproductibile, nu este necesar să se efectueze o a treia testare. Pentru ca rezultatele să fie acceptabile, acestea ar trebui:

— să îndeplinească criteriile de acceptabilitate (a se vedea Criteriile de acceptabilitate de la punctele 14-20),

— să fie reproductibile.

Criterii de interpretare a datelor

Tabelul 7

Criterii de decizie pozitivă și negativă în testul de agonist ER

Pozitivă	În cazul în care se obține o valoare RPC_{Max} mai mare decât sau egală cu 10 % din răspunsul martorului pozitiv în cel puțin două din două sau două din trei testări.
Negativă	În cazul în care valoarea RPC_{Max} nu ajunge la cel puțin 10 % din răspunsul martorului pozitiv în două din două sau două din trei testări.

Tabelul 8

Criterii de decizie pozitivă și negativă în testul de antagonist ER

Pozitivă	Dacă valoarea IC30 este calculată în cel puțin două din două sau două din trei testări.
Negativă	Dacă valoarea IC30 nu este calculată în două din două sau două din trei testări.

43. Criteriile de interpretare a datelor sunt prezentate în tabelele 7 și 8. Rezultatele pozitive vor fi caracterizate atât prin amploarea efectului, cât și prin concentrația la care se produc efecte. Exprimarea rezultatelor ca o concentrație la care se atinge 50 % (PC50) sau 10 % (PC10) din valorile PC pentru testul de agonist, iar 50 % (IC50) sau 30 % (IC30) din valoarea martorului de adăugat este inhibată pentru testul antagonist, înseamnă că sunt îndeplinite ambele obiective. Cu toate acestea, o substanță chimică de testat este considerată a fi pozitivă dacă răspunsul maxim indus de substanța chimică de testat (RPCMax) este mai mare decât sau egal cu 10 % din PC în cel puțin două din două sau două din trei testări, iar o substanță chimică de testat este considerată a fi negativă în cazul în care RPCMax nu reușește să atingă cel puțin 10 % din răspunsul martorului pozitiv în două din două sau două din trei teste.

44. Calculele pentru PC10, PC50 and PCMax în testul de agonist ER și IC30 și IC50 în testul antagonist ER al ER pot fi realizate utilizând o fișă disponibilă împreună cu Orientarea privind testarea pe site-ul public al OCDE ([2]).

45. Ar trebui să fie suficient să se obțină valori ale PC10 sau PC50 și IC30 sau IC50 cel puțin de două ori. Însă, în cazul în care valoarea de referință rezultată pentru date din același interval de concentrații indică o variabilitate cu un coeficient inacceptabil de ridicat de variație (CV; %), este posibil ca datele să nu fie considerate fiabile și ar trebui să se identifice sursa variabilității ridicate. Valoarea CV a datelor brute triple (și anume, date privind intensitatea luminiscenței) ale punctelor de date care sunt utilizate pentru calcularea PC10 ar trebui să fie sub 20 %.

46. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate indică faptul că sistemul de analiză funcționează corect, dar nu asigură faptul că orice testare specifică va genera date precise. Duplicarea rezultatelor primei testări reprezintă cea mai bună asigurare a faptului că au fost generate date precise.

47. În cazul testului de agonist ER, unde sunt necesare mai multe informații, în plus față de scopurile de depistare și stabilire a priorităților ale prezentei TG pentru substanțele chimice pozitive, în special pentru substanțele chimice PC10-PC49, precum și pentru substanțe chimice suspectate a supra-stimulata luciferaza, se poate confirma că activitatea de luciferază observată este doar un răspuns specific ERα, folosind un antagonist ERα (a se vedea apendicele 2.1).

RAPORTUL TESTULUI

48. A se vedea punctul 20 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA".

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 225), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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. și 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.

Apendicele 2.1

REZULTATE FALS POZITIVE: EVALUAREA SEMNALELOR DE LUMINISCENȚĂ CARE NU SUNT MEDIATE DE RECEPTORI

1. Rezultatele pozitive false din analiza activității agoniste a ER ar putea fi generate prin activarea nemediată de ER a genei luciferază sau prin activarea directă a produsului genei sau prin fluorescență nespecifică. Astfel de efecte sunt indicate printr-o curbă incomplete doză-răspuns incompletă sau neobișnuită. Dacă se suspectează existența unor astfel de efecte, ar trebui să se examineze efectul unui antagonist al ER (de exemplu, 4-hidroxitamoxifen (OHT) la o concentrație netoxică) asupra răspunsului. Este posibil ca antagonistul ICI 1827 80 pur să nu fie adecvat pentru acest scop, deoarece o concentrație suficientă de ICI 1827 80 ar putea diminua valoarea VC, iar acest lucru va afecta analiza datelor.

2. Pentru a asigura validitatea acestei abordări, următoarele trebuie să fie testate pe aceeași placă:

   — Activitatea agonistă a substanței chimice necunoscute cu/fără 10 μM de OHT

   — VC (în trei probe)

   — OHT (în trei probe)

   — 1 nM de E2 (în trei probe) ca și agonist al PC

   — 1 nM de E2 + OHT (în trei probe)

Criterii de interpretare a datelor

Notă: Toate godeurile ar trebui să fie tratate cu aceeași concentrație de vehicul.

— Dacă activitatea agonistă a substanței chimice necunoscute NU este afectată de tratamentul cu antagonistul ER, aceasta este clasificată ca fiind „Negativă".

— Dacă activitatea agonistă a substanței chimice necunoscute este complet inhibată, se aplică criteriile de decizie.

— Dacă activitatea agonistă la cea mai scăzută concentrație este egală cu sau mai mare decât răspunsul PC10, substanța chimică necunoscută este inhibată în valoare egală cu sau mai mare decât răspunsul PC10. Se calculează diferența dintre răspunsurile dintre godeurile netratate și cele tratate cu antagonistul ER, iar această diferență ar trebui să fie considerată ca fiind răspunsul real și ar trebui utilizată pentru calcularea parametrilor adecvați pentru a permite luarea unei decizii de clasificare.

Analiza datelor

Se verifică standardul de performanță.

Se verifică valorile VC dintre godeurile tratate în aceleași condiții.

1. Se calculează media VC

2. Se scade media VC din valoarea fiecărui godeu care **nu** este tratat cu OHT

3. Se calculează media OHT

4. Se scade media VC din valoarea fiecărui godeu care este tratat cu OHT

5. Se calculează media PC

6. Se calculează activitatea transcripțională relativă a tuturor celorlalte godeuri în raport cu PC.

Apendicele 2.2

PREPARAREA SERULUI TRATAT CU CĂRBUNE ACOPERIT CU DEXTRAN (DCC)

1. Tratarea serului cu cărbune acoperit cu dextran (DCC) este o metodă generală de îndepărtare a compușilor estrogeni din serul care se adaugă în mediul celular, pentru a exclude un răspuns subiectiv asociat cu estrogeni reziduali din ser. un volum de 500 ml de ser fetal bovin (FBS) poate fi tratat prin această procedură.

Componente

2. Vor fi necesare următoarele materiale și aparate:

Materiale

Cărbune activ

Dextran

Clorură de magneziu hexahidrat (MgCl2·6H2O)

Zaharoză

1 M soluție tampon HEPES (pH 7,4)

Apa ultrapură obținută printr-un sistem de filtrare

Aparatură

Un recipient din sticlă autoclavizat (dimensiunea ar trebui să fie adaptată, după caz) General Laboratory Centrifuge (care poate stabili temperatura la 4 °C)

Procedura

3. Următoarea procedură este adaptată pentru utilizarea de eprubete pentru centrifugă de 50 ml:

[Ziua 1] Se prepară suspensia din cărbune acoperit cu dextran cu 1 l de apă ultrapură care conține 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 M zaharoză, 2,5 g de cărbune, 0,25 g de dextran și 5 mM de HEPES și se agită la 4 °C peste noapte.

[Ziua 2] Se golește suspensia într-o eprubetă pentru centrifugă de 50 ml și se centrifughează la 10 000 rpm la 4 °C timp de 10 minute. Se îndepărtează supranatantul și se păstrează jumătate din sedimentul cu cărbune la 4 °C pentru a fi utilizat în Ziua 3. Cealaltă jumătate din cantitatea de cărbune cu FBS care a fost decongelată încet pentru a se evita precipitarea și inactivată termic la 56 °C timp de 30 de minute se suspendă, apoi se transferă într-un recipient din sticlă autoclavizat, cum ar fi un balon Erlenmeyer. Se agită ușor această suspensie la 4 °C, peste noapte.

[Ziua 3] Se golește suspensia cu FBS în eprubete pentru centrifugă pentru centrifugare la 10 000 rpm la 4 °C timp de 10 minute. FBS este colectat și transferat în noul sediment de cărbune preparat și păstrat în Ziua 2. Se suspendă sedimentul cu cărbune și se agită ușor această suspensie într-un recipient din sticlă autoclavizat la 4 °C, peste noapte.

[Ziua 4] Se golește suspensia pentru centrifugare la 10 000 rpm la 4 °C timp de 10 minute și se sterilizează supernatantul prin filtrare printr-un filtru steril de 0,2 μm. Acest FBS tratat cu DCC ar trebui să fie păstrat la o temperatură de −20 °C și poate fi utilizat pe o perioadă de maxim un an.

Apendicele 3

ANALIZA DE TRANSACTIVARE A RECEPTORULUI DE ESTROGEN VM7LUC PENTRU IDENTIFICAREA AGONIŞTILOR şI ANTAGONIŞTILOR RECEPTORILOR DE ESTROGEN

CONSIDERAŢII ŞI LIMITĂRI INIŢIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Această analiză utilizează linia celulară VM7Luc4E2 ([1]). Aceasta a fost validată de National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICAETM) şi de Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Liniile celulare VM7Luc exprimă în mod predominant o valoare ERα endogenă şi o cantitate redusă de ERβ endogenă (2) (3) (4).

2. Această analiză este aplicabilă pentru o gamă largă de substanţe, cu condiţia ca acestea să poată fi dizolvate în dimetilsulfoxid (DMSO; CASRN 67-68-5), să nu reacţioneze cu DMSO sau cu mediul de cultură a celulelor şi să nu fie citotoxice la concentraţiile care sunt testate. Dacă nu este posibilă utilizarea DMSO, se poate utiliza un alt vehicul cum ar fi etanolul sau apa (a se vedea punctul 12). Performanţa demonstrată a analizei activităţii agoniste (antagoniste) VM7Luc ER TA sugerează faptul că datele generate prin această analiză ar putea oferi informaţii cu privire la mecanismele de acţiune mediate de ER şi ar putea fi luate în considerare la stabilirea priorităţii substanţelor prevăzute pentru teste suplimentare.

3. Această analiză este concepută special pentru a detecta TA mediată de hERα şi hERß prin măsurarea chemiluminiscenţei ca punct final. Utilizarea chemiluminiscenţei în bio-analize este larg răspândită, deoarece luminiscenţa are un raport semnal/fond ridicat. Însă activitatea luciferazei de licurici în analizele bazate pe celule poate fi confundată de substanţe care inhibă enzima luciferază, cauzând inhibarea aparentă sau luminiscenţa crescută ca urmare a stabilizării proteinelor. În plus, în unele analize pe gene reporter ER bazate pe luciferază au fost raportate semnale de luminescenţă nemediate de receptori la concentraţii de fitoestrogen mai mari de 1 μM din cauza supraactivării genei luciferază reporter. În timp ce curba doză-răspuns indică faptul că o reală activare a sistemului ER se produce la concentraţii mai mici, expresia luciferazei obţinută la concentraţii ridicate de fitoestrogeni sau compuşi similari susceptibili de a produce o supra-activare a genei luciferază reporter similară fitoestrogenilor trebuie să fie atent examinată în cadrul sistemelor de testare ER TA transfectat stabil.

4. Ar trebui să se parcurgă secţiunile „INTRODUCERE GENERALĂ” şi „COMPONENTE ALE ANALIZEI ER TA” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definiţiile şi abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Analiza este utilizată pentru a indica legarea ligand de ER, urmată de translocarea complexului receptor-ligand în nucleu. În nucleu, complexul receptor-ligand se leagă de aumite elemente de răspuns ADN şi transactivează gena reporter (*luc*), determinând producerea luciferazei şi emisia ulterioară de lumină, care poate fi cuantificată cu ajutorul unui luminometru. Activitatea luciferazei poate fi evaluată rapid şi cu costuri reduse cu ajutorul unei serii de truse de testare disponibile în comerţ. Analiza VM7Luc ER TA utilizează o linie celulară de adenocarcinom de sân umană reactivă, VM7, care a fost transfectată în mod stabil cu o structură de reporter *luc* de licurici sub controlul a patru elemente de răspuns estrogen aşezate în amonte de promotorul virusului tumoral mamar la şoarece (MMTV)

([1]) Înainte de iunie 2016, această linie celulară a fost desemnată drept linia celulară BG1Luc. Celulele BG-1 au fost iniţial descrise de Geisinger et al. (1998) (12) şi au fost caracterizate ulterior de cercetători din cadrul Institutului Naţional de Ştiinţe ale Sănătăţii Mediului (NIEHS) (13). Relativ recent, s-a descoperit că există două variante diferite de celule BG-1 utilizate de cercetători, şi anume, BG-1 Fr şi BG-1 NIEHS. O analiză aprofundată, inclusiv o testare ADN, a acestor două linii celulare variante BG-1, care a fost efectuată de Li şi colaboratorii (2014) (14), a arătat că BG-1 Fr este unică şi că BG-1 NIEHS, adică linia celulară iniţială utilizată pentru test, nu era linia celulară BG1 de carcinom ovarian la om, ci era, în schimb, o variantă a liniei celulare MCF7 de cancer de sân la om. Linia celulară utilizată în cadrul testului, denumită iniţial BG1Luc4E2 (15), va fi denumită acum VM7Luc4E2 („V” = variantă; „M7” = celule MCF7). De asemenea, testul va fi denumit acum VM7Luc ER TA. Deşi prin aceasta se modifică originea liniei celulare pe care se bazează testul, acest lucru nu afectează studiile de validare publicate şi nici utilitatea şi aplicarea acestui test pentru depistarea substanţelor chimice estrogenice/anti-estrogenice.

pentru a detecta substanțe cu activitate agonistă sau antagonistă ER *in vitro*. Acest promotor MMTV prezintă doar o reactivitate încrucișată minoră cu alți hormoni steroizi și nesteroizi (8). Criteriile pentru interpretarea datelor sunt descrise în detaliu la punctul 41. Pe scurt, un răspuns pozitiv este identificat prin curba concentrație-răspuns care conține cel puțin trei puncte cu bare de eroare care nu se suprapun (media ± SD), precum și o variație a amplitudinii (unitate de lumină relativă normalizată [RLU]) de cel puțin 20 % din valoarea maximă pentru standardul de referință (17β-estradiol [E2; CASRN 50-28-2] pentru analiza activității agoniste, raloxifen HCl [Ral; CASRN 84 449-90-1]/E2 pentru analiza activității antagoniste).

PROCEDURA

Linia celulară

6. Pentru analiză ar trebui să se utilizeze linia celulară VM7Luc4E2 transfectată stabil. În prezent, linia celulară este disponibilă doar prin intermediul unui acord tehnic de licență de la Universitatea din California, Davis, California, SUA ([2]) și de la Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA ([3]).

Stabilitatea liniei celulare

7. Pentru a menține stabilitatea și integritatea liniei celulare, celulele ar trebui să fie cultivate pentru mai multe pasaje din stocul congelat în mediu de păstrare a celulelor (a se vedea punctul 9). Celulele nu ar trebui să fie cultivate pentru mai mult de 30 de pasaje. Pentru linia celulară VM7Luc4E2, 30 de pasaje vor însemna o durată de aproximativ trei luni.

Cultura celulară și condiții de aranjare pe placă

8. Ar trebui să fie urmate procedurile prevăzute în Orientarea privind bunele practici de cultură a celulelor (5) (6) pentru a asigura calitatea tuturor materialelor și metodelor pentru a menține integritatea, valabilitatea și reproductibilitatea oricărei activități desfășurate.

9. Celulele VM7Luc4E2 sunt menținute în mediu RPMI 1 640, la care se adaugă 0,9 % PenStrep și 8,0 % ser fetal bovin (FBS) într-un incubator de cultură tisulară specific la temperatura de 37 °C ± 1°C, 90 % ± 5 % umiditate și 5,0 % ± 1 % CO_2/aer.

10. La atingerea unei confluențe de aproximativ 80 %, celulele VM7Luc4E2 sunt subcultivate și condiționate într-un mediu fără estrogen pentru o perioadă de 48 de ore înainte de introducerea celulelor în plăci cu 96 de godeuri pentru expunerea la substanțe chimice de testat și analiza inducției dependente de estrogen a activității luciferazei. Mediul fără estrogen (EFM) conține modificarea de către Dulbecco a mediului lui Eagle (DMEM) fără roșu de fenol, la care se adaugă soluție 4,5 % FBS tratat cu cărbune/dextran, 1,9 % Lglutamină și 0,9 % Pen-Strep. Toate articolele din plastic ar trebui să fie fără activitate estrogenă [a se vedea protocolul detaliat (7)].

Criterii de acceptabilitate

11. Acceptarea sau respingerea unui test depinde de evaluarea rezultatelor standardelor de referință și ale martorilor din cadrul fiecărui experiment realizat pe o placă cu 96 de godeuri. Fiecare standard de referință este testat în concentrații multiple și există mai multe eșantioane din fiecare concentrație de referință și martor. Rezultatele sunt comparate cu

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

valorile de control al calității (CC) pentru acești parametri care au fost derivați din bazele de date istorice de agoniști și antagoniști generate de fiecare laborator cu ocazia demonstrării competenței. Bazele de date istorice sunt actualizate permanent cu valori ale standardelor de referință și ale martorilor. Modificările legate de echipamentele sau condițiile de laborator ar putea necesita generarea de baze de date istorice actualizate.

Testarea activității agoniste

Testul pentru identificarea intervalului

- Inducție: Inducția plăcii ar trebui să fie măsurată prin împărțirea valorii medii a celei mai mari unități de lumină relativă standard de referință (RLU) E2 la valoarea medie a RLU cu martor DMSO. De obicei, se obține o inducție multiplicată de cinci ori, dar, în scopul acceptării, inducția ar trebui să fie mai mare decât sau egală cu valoarea multiplicată de patru ori.

- Rezultatele martorului DMSO: Valorile RLU ale martorului tratat cu solvent ar trebui să fie în limita de 2,5 ori abaterea standard a valorii medii istorice RLU a martorului tratat cu solvent.

- Un experiment care nu îndeplinește niciunul dintre criteriile de acceptare ar trebui să fie eliminat și repetat.

Testul complex

Acesta include criterii de acceptabilitate din testul de identificare a intervalului de activitate agonistă și următoarele:

- Rezultatele standardelor de referință: Curba standard de referință E2 concentrație-răspuns ar trebui să aibă o formă sigmoidală și cel puțin trei valori în porțiunea lineară a curbei concentrație-răspuns.

- Rezultatele martorului pozitiv: Valorile RLU ale martorului metoxiclor ar trebui să fie peste media DMSO plus de trei ori abaterea standard de la media DMSO.

- Un experiment care nu îndeplinește oricare dintre criteriile de acceptare ar trebui să fie eliminat și repetat.

Testul activității antagoniste

Testul pentru identificarea intervalului

- Reducție: Reducția plăcii este măsurată prin împărțirea valorii medii RLU standard de referință Ral/E2 la valoarea medie a RLU cu martor DMSO. De obicei, se obține o reducție multiplicată de cinci ori, dar, în scopul acceptării, reducția ar trebui să fie mai mare decât sau egală cu valoarea multiplicată de trei ori.

- Rezultatele martorului E2: Valorile RLU ale martorului E2 ar trebui să fie în limita de 2,5 ori abaterea standard a valorii medii istorice RLU a martorului E2.

- Rezultatele martorului DMSO: Valorile RLU ale martorului DMSO ar trebui să fie în limita de 2,5 ori abaterea standard a valorii medii istorice RLU a martorului tratat cu solvent.

• Un experiment care nu îndeplinește oricare dintre criteriile de acceptare va fi eliminat și repetat.

Testul complex

Acesta include criterii de acceptare din testul de identificare a intervalului de activitate antagonistă și următoarele:

• Rezultatele standardelor de referință: Curba standard de referință Ral/E2 concentrație-răspuns ar trebui să aibă o formă sigmoidală și cel puțin trei valori în porțiunea lineară a curbei concentrație-răspuns.

• Rezultatele martorului pozitiv: Valorile RLU ale martorului tamoxifen/E2 ar trebui să fie sub media martorului E2 minus de trei ori abaterea standard de la media martorului E2.

• Un experiment care nu îndeplinește oricare dintre criteriile de acceptare va fi eliminat și repetat.

Standarde de referință, martori pozitivi și martori tratați cu vehicule

Martor tratat cu vehicul (analize ale activității agoniste și antagoniste)

12. Vehiculul care se utilizează pentru a dizolva substanțele chimice de testat ar trebui să fie testat ca martor tratat cu vehicul. Vehiculul utilizat în timpul validării analizei VM7Luc ER TA a fost de 1 % (v/v) dimetilsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (a se vedea punctul 24). Dacă se utilizează un alt vehicul decât DMSO, toate standardele de referință, martorii și substanțele chimice de testat ar trebui să fie testați în același vehicul, dacă este cazul.

Standard de referință (identificatorul intervalului pentru activitate agonistă)

13. Standardul de referință este E2 (CASRN 50-28-2). Pentru testul de identificare a intervalului, standardul de referință constă într-o diluție în serie de patru concentrații de E2 (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} și 2,87 x 10^{-12} M), fiecare concentrație fiind testată în godeuri duplicate.

Standard de referință (testul complex pentru activitate agonistă)

14. E2 pentru testare complexă cuprinde o diluție în serie de 1:2 constând în 11 concentrații (cuprinse între 3,67 x 10^{-10} și 3,59 x 10^{-13} M) de E2 în godeuri duplicate.

Standard de referință (identificatorul intervalului pentru activitate antagonistă)

15. Standardul de referință reprezintă o combinație de Ral (CASRN 84 449-90-1) și E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pentru testul de identificare a intervalului cuprinde o diluție în serie din trei concentrații de Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} și 1,92 x 10^{-10}M) plus o concentrație fixă (9,18 × 10^{-11} M) de E2 în godeuri duplicate.

Standard de referință (testul complex pentru activitate antagonistă)

16. Ral/E2 pentru testul complex cuprinde o diluție în serie 1:2 de Ral (între 2,45x 10^{-8} și 9,57 x 10^{-11}M) plus o concentrație fixă (9,18 × 10^{-11} M) de E2 care cuprinde nouă concentrații de Ral/E2 în godeuri duplicate.

Martor slab pozitiv (agonist)

17. Martorul slab pozitiv este 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoxiclor (metoxiclor; CASRN 72-43-5) în EFM.

Martor slab pozitiv (antagonist)

18. Martorul slab pozitiv constă în tamoxifen (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M cu 9,18 × 10^{11} M E2 în EFM.

Martorul E2 (doar analiza activității antagoniste)

19. Martorul E2 este 9,18 × 10^{-11} M E2 din EFM și este utilizat ca martor negativ de referință.

Inducție multiplicată (agonist)

20. Inducția activității luciferazei la standardul de referință (E2) se măsoară prin împărțirea mediei celei mai mari valori RLU a standardului de referință E2 la valoarea medie RLU a martorului DMSO, iar rezultatul ar trebui să fie mai mare decât valoarea multiplicată de patru ori.

Inducție multiplicată (antagonist)

21. Activitatea medie a luciferazei la standardul de referință (Ral/E2) se măsoară prin împărțirea mediei celei mai mari valori RLU a standardului de referință Ral/E2 la valoarea medie RLU a martorului DMSO și ar trebui să fie mai mare decât valoarea multiplicată de trei ori.

Demonstrarea performanțelor laboratorului (a se vedea punctul 14 și tabelele 3 și 4 de la secțiunea « COMPONENTELE ANALIZEI ER TA» din prezenta metodă de testare).

Vehicul

22. Substanțele chimice de testat ar trebui să se dizolve într-un solvent care solubilizează substanța chimică de testat și este miscibil cu mediul celular. Vehicule adecvate sunt apa, etanolul (puritate de 95-100 %) și DMSO. În cazul în care se utilizează DMSO, nivelul nu ar trebui să depășească 1 % (v/v). Pentru orice vehicul, ar trebui să se demonstreze că volumul maxim utilizat nu este citotoxic și nu interferează cu performanțele testului. Standardele de referință și martorii sunt dizolvați în solvent 100 %, apoi diluați în concentrații corespunzătoare în EFM.

Prepararea substanțelor chimice de testat

23. Substanțele chimice de testat sunt dizolvate în DMSO 100 % (sau un solvent adecvat), apoi diluate în concentrații corespunzătoare în EFM. Toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie lăsate să se echilibreze la temperatura camerei înainte de a fi dizolvate și diluate. Soluțiile cu substanțe chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate pentru fiecare experiment. Soluțiile nu ar trebui să prezinte precipitat sau tulburare vizibilă. Stocurile de standarde de referință și de martori pot fi preparate în cantitate mare; însă, standardul de referință final, diluțiile cu martori și substanțele chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate pentru fiecare experiment și utilizate în termen de 24 de ore de la preparare.

Solubilitate și citotoxicitate: Considerații pentru identificarea intervalului

24. Testul de identificare a intervalului constă în diluții în serie de 1:10 în șapte puncte testate în duplicat. Inițial, substanțele chimice de testat sunt testate până la concentrația maximă de 1 mg/ml (~ 1 mM) pentru testarea activității agoniste și de 20 µg/ml (~10µM) pentru testarea activității antagoniste. Sunt utilizate experimente de identificare a intervalului pentru a determina următoarele:

— Concentrațiile inițiale ale substanței chimice de testat care urmează să fie utilizate în timpul testării complexe

— Diluțiile substanței chimice de testat (1:2 sau 1:5) care urmează să fie utilizate în timpul testării complexe

25. O evaluare a viabilității/citotoxicității celulare este inclusă în protocoalele de analiză a activității agoniste și antagoniste (7) și este integrată în testul de identificare a intervalului și în testul complex. Metoda de citotoxicitate folosită pentru a evalua viabilitatea celulară în timpul validării VM7Luc ER TA (1) a fost o metodă de observare vizuală calitativă dimensionată; însă, se poate utiliza o metodă cantitativă pentru determinarea citotoxicității [a se vedea protocolul (7)]. Datele privind concentrațiile substanțelor chimice de testat care provoacă o reducere mai mare de 20 % a viabilității nu pot fi utilizate.

Expunerea la substanțe chimice de testat și organizarea plăcilor pentru testare

26. Celulele sunt numărate și așezate pe plăcile de cultură tisulară cu 96 de godeuri (2 x 10^5 de celule pe godeu) în EFM și incubate timp de 24 de ore pentru a permite celulelor să se prindă de placă. EFM este eliminat și înlocuit cu substanțe chimice de testat și de referință în EFM și incubat timp de 19-24 de ore. Va fi necesar să se acorde o atenție specială substanțelor extrem de volatile, întrucât godeurile cu martori din apropiere ar putea genera rezultate fals pozitive. În astfel de cazuri, „agenții de etanșeizare a plăcii" ar putea ajuta la izolarea godeurilor individuale în timpul testării și, prin urmare, se recomandă.

Testele pentru identificarea intervalului

27. În testul pentru identificarea intervalului sunt folosite toate cele 96 de godeuri de pe placă pentru a testa până la șase substanțe chimice de testat ca diluții de 1:10 în serie în șapte puncte în duplicat (a se vedea figurile 1 și 2).

— Testul pentru identificarea intervalului *agonistului* folosește patru concentrații ale E2 în duplicat ca standard de referință și patru godeuri duplicate pentru martorul DMSO.

— Testul pentru identificarea intervalului *antagonistului* folosește trei concentrații ale Ral/E2 cu 9,18 × 10^{-11} M E2 în duplicat ca standard de referință și trei godeuri duplicate pentru martorii E2 și DMSO.

Figura 1

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul pentru identificarea intervalului agonistului

	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

Abrevieri: E2-1-E2-4 = concentrațiile standardului de referință E2 (în ordine descrescătoare); TC1-1-TC1-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1 (TC1); TC2-1-TC2-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2 (TC2); TC3-1-TC3-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 3 (TC3); TC4-1-TC4-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 4 (TC4); TC51TC5-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 5 (TC5); TC6-1-TC6-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 6 (TC6); VC = martor tratat cu vehicul (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Figura 2

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul pentru identificarea intervalului antagonistului

	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

Abrevieri: E2 = martorul E2; Ral-1-Ral-3 = concentrațiile standardului de referință raloxifen/E2 (în ordine descrescătoare); TC1-1-TC1-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1 (TC1); TC2-1-TC2-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2 (TC2); TC3-1-TC3-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 3 (TC3); TC4-1-TC4-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 4 (TC4); TC5-1-TC5-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 5 (TC5); TC6-1-TC6-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 6 (TC6); VC = martor tratat cu vehicul (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Notă: Toate substanțele chimice de testat sunt testate în prezența M E2 9,18 × 10-11.28.
Volumul final recomandat de medii necesar pentru fiecare godeu este de 200 µl. Se utilizează numai plăci de testare în care celulele din toate godeurile prezintă o viabilitate de cel puțin 80 %.

29. Determinarea concentrațiilor inițiale pentru testul complex al ***agonistului*** este descrisă în detaliu în protocolul privind agonistul (7). Pe scurt, se utilizează următoarele criterii:

— Dacă nu există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mari decât media plus de trei ori abaterea standard a martorului DMSO, va fi efectuat un test complex utilizând o diluție în serie 1:2 în 11 puncte pornind de la concentrația maximă solubilă.

— Dacă există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mari decât media plus de trei ori abaterea standard a martorului DMSO, concentrația inițială care trebuie utilizată pentru sistemul de diluare în 11 puncte, în cadrul testului complex, ar trebui să fie cu un log mai mare decât concentrația care indică cea mai mare valoare RLU ajustată în testul de identificare a intervalului. Sistemul de diluare în 11 puncte se va baza pe diluția 1:2 sau 1:5 în conformitate cu următoarele criterii:

Ar trebui să fie utilizată o diluție de 1:2 în serie în 11 puncte dacă intervalul de concentrații rezultant va cuprinde întreaga serie de răspunsuri pe baza curbei concentrație-răspuns generate în cadrul testului de identificare a intervalului. În caz contrar, se utilizează o diluție de 1:5.

— În cazul în care o substanță chimică de testat prezintă o curbă concentrație-răspuns bifazică în cadrul testului de identificare a intervalului, ambele faze ar trebui să fie abordate, de asemenea, în cadrul testului complex.

30. Determinarea concentrațiilor inițiale pentru testul complex al ***antagonistului*** este descrisă în detaliu în protocolul privind antagonistul (7). Pe scurt, se utilizează următoarele criterii:

— Dacă nu există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mici decât media minus de trei ori abaterea standard a martorului E2, va fi efectuat un test complex utilizând o diluție în serie 1:2 în 11 puncte pornind de la concentrația maximă solubilă.

— Dacă există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mici decât media minus de trei ori abaterea standard a martorului E2, concentrația inițială care trebuie utilizată pentru sistemul de diluare în 11 puncte, în cadrul testului complex, ar trebui să fie una dintre următoarele:

• concentrația care prezintă cea mai mică valoare RLU ajustată în cadrul testului de stabilire a intervalului

• concentrația maximă solubilă [a se vedea Protocolul privind antagonistul (7), figura 14-2]

• concentrația citotoxică minimă [a se vedea Protocolul privind antagonistul (7), figura 14-3 pentru un exemplu aferent].

— Sistemul de diluare în 11 puncte se va baza pe o diluție 1:2 sau 1:5 în serie sau pe o diluție care respectă următoarele criterii:

Ar trebui să fie utilizată o diluție de 1:2 în serie în 11 puncte dacă intervalul de concentrații rezultant va cuprinde întreaga serie de răspunsuri pe baza curbei concentrație-răspuns generate în cadrul testului de identificare a intervalului. În caz contrar, ar trebui să se utilizeze o diluție de 1:5.

Teste complexe

31. Testul complex constă în diluții în serie în 11 puncte (diluții în serie de 1:2 sau 1:5 pe baza concentrației inițiale pentru criteriile de testare complexă), fiecare concentrație fiind testată în trei godeuri de pe placa cu 96 de godeuri (a se vedea figurile 3 și 4).

— Testul complex privind *agonistul* utilizează 11 concentrații de E2 în duplicat ca standard de referință. Pe fiecare placă sunt incluse patru godeuri replicate pentru martorul DMSO și patru godeuri replicate pentru martorul metoxiclor (9,06 x 10^{-6} M).

— Testul complex al *antagonistului* utilizează nouă concentrații de Ral/E2 cu 9,18 × 10^{-11} M E2 în duplicat ca standard de referință, cu patru godeuri replicate pentru martorul E2 9,18 x 10^{11} M, patru godeuri replicate pentru martorii DMSO și patru godeuri replicate pentru tamoxifen 3,36 x 10^{-6}M.

Figura 3

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul complex al agonistului

	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

Abrevieri: TC1-1 - TC1-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1; TC2-1-TC2-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2; E2-1-E2-11 = concentrațiile standardului de referință E2 (în ordine descrescătoare); Meth = martor slab pozitiv metoxiclor p,p'; VC = martor DMSO tratat cu vehicul EFM (1 % v/v)

Figura 4

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul complex al antagonistului

	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

Abrevieri: E2 = martorul E2; Ral-1-Ral-9 = concentrațiile standardului de referință raloxifen/E2 (în ordine descrescătoare); Tam = Martor slab pozitiv tamoxifen/E2; TC1-1-TC1-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1 (TC1); TC2-1-TC2-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2 (TC2); VC = martor tratat cu vehicul (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Notă: După cum s-a menționat, toate godeurile de referință și de testare conțin o concentrație fixă de E2 (9,18 x 10-11M).32.

Ar trebui să se efectueze teste complexe repetate pentru aceeași substanță chimică în zile diferite, pentru asigurarea independenței. Ar trebui să se efectueze cel puțin două teste complexe. Dacă rezultatele testelor sunt contradictorii (de exemplu, un test este pozitiv, celălalt negativ) sau dacă unul dintre teste este inadecvat, ar trebui efectuat un al treilea test suplimentar.

Măsurarea luminiscenței

33. Luminiscența este măsurată în intervalul 300-650 nm, cu ajutorul unui luminometru cu injectare și al unui software care controlează volumul de injecție și intervalul de măsurare (7). Emisia de lumină din fiecare godeu este exprimată în RLU pe godeu.

ANALIZA DATELOR

Determinarea EC_{50} /IC_{50}

34. Valoarea EC_{50} (jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat [agoniști)] și valoarea IC_{50} (jumătate din concentrația de inhibare maximă a unei substanțe chimice de testat [antagoniști]) sunt determinate din datele concentrație-răspuns. Pentru substanțele chimice de testat care sunt pozitive la una sau mai multe concentrații, concentrația substanței chimice de testat care provoacă un răspuns semi-maximal (IC_{50} sau EC_{50}) se calculează utilizând o analiză a funcției Hill sau o alternativă adecvată. Funcția Hill este un model matematic logistic cu patru parametri care raportează concentrația substanței chimice de testat la răspuns (de regulă, pe baza unei curbe sigmoidale) cu ajutorul ecuației de mai jos:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

Unde:

Y= răspuns (și anume, valori RLU);

X= logaritmul concentrației;

Nivel inferior= răspunsul minim;

Nivel superior= răspunsul maxim;

lg EC_{50} (sau lg IC_{50})= logaritmul X ca mediana răspunsului între partea superioară și cea inferioară;

Hillslope= caracterul abrupt al curbei.

Modelul calculează cea mai bună încadrare pentru nivelul superior, nivelul inferior, Hillslope și parametrii IC_{50} și EC_{50}. Pentru calcularea valorilor EC_{50} și IC_{50}, ar trebui să se utilizeze un software statistic adecvat (de exemplu, software-ul statistic Graphpad Prism®).

Determinarea valorilor neconforme

35. Un bun raționament statistic ar putea fi facilitat prin includerea, printre altele, a testului Q (a se vedea protocoalele privind agonistul și antagonistul (7) pentru determinarea godeurilor „inutilizabile" care vor fi excluse din analiza datelor.

36. Pentru replicile standardului de referință E2 (mărime eșantion la două replici), orice valoare RLU ajustată pentru o replică la o anumită concentrație de E2 este considerată a fi o valoare neconformă dacă valoarea acesteia este peste sau sub 20 % din valoarea RLU ajustată pentru concentrația respectivă în baza de date istorice.

Colectarea și adaptarea datelor luminometrului pentru testul de stabilire a intervalului

37. Datele brute obținute din luminometru ar trebui să fie transferate pe o fișă model prevăzută pentru analiză. Ar trebui să se stabilească dacă există puncte de date neconforme care ar trebui eliminate. (a se vedea criteriile de acceptare a testului pentru parametrii determinați în cadrul analizelor.) Ar trebui să se efectueze următoarele calcule:

Agonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru martorul cu vehicul DMSO (VC).

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează inducția multiplicată medie pentru standardul de referință (E2).

Etapa 4 Se calculează media valorii EC_{50} pentru substanțele chimice de testat.

Antagonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru VC DMSO.

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează reducția multiplicată medie pentru standardul de referință (Ral/E2).

Etapa 4 Se calculează valoarea medie a standardului de referință E2.

Etapa 5 Se calculează media valorii IC50 pentru substanțele chimice de testat.

Colectarea și adaptarea datelor luminometrului pentru testul complex

38. Datele brute obținute din luminometru ar trebui să fie transferate pe o fișă model prevăzută pentru analiză. Ar trebui să se stabilească dacă există puncte de date neconforme care ar trebui eliminate. (a se vedea criteriile de acceptare a testului pentru parametrii determinați în cadrul analizelor.) Sunt efectuate următoarele calcule:

Agonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru VC DMSO.

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează inducția multiplicată medie pentru standardul de referință (E2).

Etapa 4 Se calculează media valorii EC_{50} pentru E2 și substanțele chimice de testat.

Etapa 5 Se calculează media valorii ajustate RLU pentru metoxiclor.

Antagonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru VC DMSO.

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează inducția multiplicată medie pentru standardul de referință (Ral/E2).

Etapa 4 Se calculează media valorii IC_{50} pentru Ral/E2 și substanțele chimice de testat.

Etapa 5 Se calculează media valorii ajustate RLU pentru tamoxifen.

Etapa 6 Se calculează valoarea medie a standardului de referință E2.

Criterii de interpretare a datelor

39. Testul VM7Luc ER TA este prevăzut în cadrul abordării bazate pe dovezi, pentru a contribui la stabilirea priorității substanțelor la testarea ED *in vivo*. Din această procedură de stabilire a priorităților va face parte clasificarea substanței chimice de testat ca fiind pozitivă sau negativă pentru activitatea agonistă sau antagonistă a ER. Criteriile de decizie pozitivă și negativă utilizate în studiul de validare VM7Luc ER AT sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 1

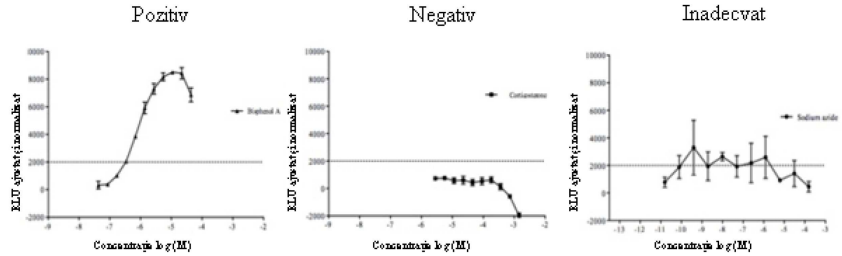
Criterii de decizie pozitivă și negativă

ACTIVITATEA AGONISTĂ	
Pozitivă	— Toate substanțele chimice de testat clasificate ca fiind *pozitive pentru* activitatea agonistă a ER ar trebui să prezinte o curbă concentrație-răspuns care să cuprindă o bază de referință, să urmeze o pantă pozitivă și să culmineze cu un platou sau un vârf. În unele cazuri, pot fi definite numai două dintre aceste caracteristici (bază de referință-pantă sau pantă-vârf). — Linia care definește panta pozitivă ar trebui să conțină cel puțin trei puncte cu bare de eroare care nu se suprapun (media ± SD). Sunt excluse punctele care alcătuiesc baza de referință, dar porțiunea liniară a curbei poate include vârful sau primul punct al platoului. — O clasificare pozitivă necesită o amplitudine a răspunsului, diferența dintre baza de referință și vârf de cel puțin 20 % din valoarea maximă a standardului de referință E2 [și anume, 2 000 RLU sau mai mult atunci când valoarea maximă de răspuns a standardelor de referință (E2) este ajustată la 10 000 RLU]. — Dacă este posibil, ar trebui să se calculeze o valoare EC_{50} pentru fiecare substanță chimică de testat pozitivă.
Negativă	Valoarea medie ajustată a RLU pentru o concentrație dată este egală cu sau sub valoarea medie RLU a DMSO plus de trei ori abaterea standard a RLU DMSO.
Inadecvată	Datele care nu pot fi interpretate ca fiind valabile pentru a demonstra prezența sau absența activității din cauza limitărilor calitative sau cantitative majore sunt considerate a fi inadecvate și nu pot fi utilizate pentru a determina dacă substanța chimică de testat este pozitivă sau negativă. Substanțele chimice ar trebui să fie testate din nou.
ACTIVITATEA ANTAGONISTĂ	
Pozitivă	— Datele despre substanțele chimice de testat generează o curbă concentrație-răspuns care constă într-o bază de referință, urmată de o pantă negativă. — Linia care definește panta negativă ar trebui să conțină cel puțin trei puncte cu bare de eroare care nu se suprapun; sunt excluse punctele care alcătuiesc baza de referință, dar porțiunea liniară a curbei poate include primul punct al platoului. — Ar trebui să existe o reducere de cel puțin 20 % a activității de la valoarea maximă pentru standardul de referință Ral/E2 [și anume, cel mult 8 000 RLU atunci când valoarea maximă de răspuns a standardului de referință (Ral/E2) este ajustată la 10 000 RLU]. — Cele mai mari concentrații necitotoxice ale substanței chimice de testat ar trebui să fie mai mici decât sau egale cu 1×10^{-5} M. — Dacă este posibil, ar trebui să se calculeze o valoare IC_{50} pentru fiecare substanță chimică de testat pozitivă.
Negativă	Toate punctele de date sunt peste valoarea EC_{80} (80 % din răspunsul E2 sau 8 000 RLU) la concentrații sub $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Inadecvată	Datele care nu pot fi interpretate ca fiind valabile pentru a demonstra prezența sau absența activității din cauza limitărilor calitative sau cantitative majore sunt considerate a fi inadecvate și nu pot fi utilizate pentru a determina dacă substanța chimică de testat este pozitivă sau negativă. Substanța chimică ar trebui să fie testată din nou.

40. Rezultatele pozitive vor fi caracterizate atât prin amploarea efectului, cât și prin concentrația la care se produc efecte, dacă este posibil. Exemple de date pozitive, negative și inadecvate sunt prezentate în figurile 5 și 6.

Figura 5

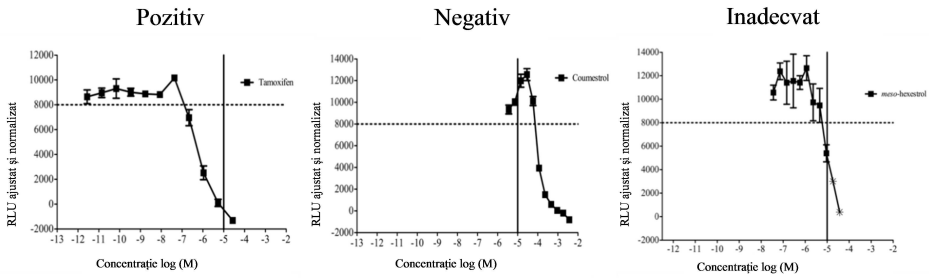
Exemple de agoniști: Date pozitive, negative și inadecvate



Linia întreruptă indică 20 % din răspunsul E2, valoarea de 2 000 RLU ajustată și normalizată.

Figura 6

Exemple de antagonist: Date pozitive, negative și inadecvate



Linia întreruptă indică 80 % din răspunsul Ral/E2, valoarea de 8 000 RLU ajustată și normalizată.

O linie continuă indică 1,00 x 10-5 M. Pentru ca un răspuns să fie considerat pozitiv, acesta ar trebui să se situeze sub valoarea de 8 000 RLU și la concentrații mai mici de 1,00 x 10-5M.

Concentrațiile marcate cu asterisc în graficul pentru mezo-hexestrol indică punctaje de viabilitate de „2” sau mai mari.

Rezultatele testelor pentru mezo-hexestrol sunt considerate date inadecvate deoarece singurul răspuns care se situează sub 8 000 RLU se produce la 1,00 x 10-5M.

41. Calculele EC_{50} și IC_{50} pot fi efectuate utilizând o funcție Hill cu patru parametri [a se vedea Protocolul privind agonistul și protocolul privind antagonistul pentru mai multe detalii (7)]. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate indică faptul că sistemul funcționează corect, dar nu asigură faptul că orice testare specifică va genera date precise. Duplicarea rezultatelor primei testări reprezintă cea mai bună asigurare a faptului că au fost generate date precise (a se vedea punctul 19 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”).

RAPORTUL TESTULUI

42. A se vedea punctul 20 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(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 nr. 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. și 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.

Apendicele 4

TESTUL DE TRANSACTIVARE A RECEPTORULUI A DE ESTROGEN UMAN TRANSFECTAT STABIL PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII AGONISTE ȘI ANTAGONISTE A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE UTILIZEAZĂ LINIA CELULARĂ ERA CALUX

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Analiza de transactivare hERα CALUX utilizează linia celulară umană U2OS pentru a detecta activitatea agonistă și antagonistă estrogenă mediată prin receptorul alfa de estrogen uman (hERα). Studiul de validare a bioanalizei cu transfectare stabilă a ERα CALUX al BioDetection Systems BV (Amsterdam, Țările de Jos) a demonstrat relevanța și fiabilitatea analizei pentru scopul său prevăzut (1). Linia celulară ERα CALUX exprimă doar ERα uman transfectat stabil (2) (3).

2. Această analiză este concepută special pentru a detecta transactivarea mediată de hERα prin măsurarea bioluminiscenței ca punct final. Bioluminiscența este utilizată în mod frecvent în bioanalize datorită ratei semnal-zgomot ridicate (4).

3. Au fost raportate concentrații de fitoestrogen mai mari de 1 μM pentru supra-activarea genei luciferază reporter, determinând o luminescență nemediată de receptor (5) (6) (7). Prin urmare, trebuie să se examineze cu atenție concentrații mai mari de fitoestrogeni sau alți compuși similari care pot să supra-activeze expresia luciferazei în cadrul analizelor de transactivare a ER transfectat stabil (a se vedea apendicele 2).

4. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „INTRODUCERE GENERALĂ” și „COMPONENTE ALE ANALIZEI ER TA” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Bioanaliza este utilizată pentru a indica legarea ligand de ER, urmată de translocarea complexului receptor-ligand în nucleu. În nucleu, complexul receptor-ligand leagă anumite elemente de răspuns ADN și transactivează o genă luciferază reporter de licurici, ceea ce determină o expresie celulară crescută a enzimei luciferază. Ca urmare a adaosului de luciferină ca substrat pentru luciferază, luciferina se transformă într-un produs bioluminiscent. Lumina produsă poate fi detectată și cuantificată cu ușurință cu ajutorul unui luminometru.

6. Sistemul de testare utilizează celule ERα CALUX transfectate stabil. Celulele ERα CALUX au provenit de la linia celulară umană de osteosarcom osteoblastic U2OS. Celulele U2OS umane au fost transfectate stabil cu 3 x HRE-TATA-Luc și pSG5-neo-hERα, utilizând metoda coprecipitării fosfatului de calciu. Linia celulară U2OS a fost selectată drept cel mai bun candidat pentru a servi ca linie celulară reporter reactivă la estrogen (și alți hormoni steroizi), pe baza observației conform căreia linia celulară U2OS a indicat o activitate redusă a receptorului endogen sau nu a manifestat nicio astfel de activitate. Absența receptorilor endogeni a fost evaluată folosind exclusiv plasmide reporter pentru luciferază, nefiind indicată nicio activitate atunci când au fost adăugați liganzi de receptor. De asemenea, această linie celulară a susținut răspunsuri puternice mediate de hormoni atunci când au fost introduși în mod tranzitoriu receptori conecși (2) (3) (8).

7. Substanțele chimice de testat pentru activitatea estrogenă sau anti-estrogenă, care utilizează linia celulară ERα CALUX, includ un test de depistare prealabilă și teste complexe. În timpul testului de depistare prealabilă, se determină solubilitatea, citotoxicitatea și un interval ajustat de concentrații ale substanțelor chimice de testat pentru testul complex. În timpul testelor complexe, intervalele de concentrații ajustate ale substanțelor chimice de testat sunt testate în cadrul bioanalizelor ERα CALUX, urmate de clasificarea substanțelor chimice de testat pentru agonism sau antagonism.

8. Criteriile pentru interpretarea datelor sunt descrise în detaliu la punctul 59. Pe scurt, o substanță chimică de testat este considerată pozitivă pentru agonism în cazul în care cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat indică un răspuns egal cu sau mai mare de 10 % din răspunsul maxim al standardului de referință 17β-estradiol (PC_{10}). O substanță chimică de testat este considerată pozitivă pentru antagonism în cazul în care cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat indică un răspuns egal cu sau mai mic de 80 % din răspunsul maxim al standardului de referință tamoxifen (PC_{80}).

PROCEDURA

Linii celulare

9. Pentru analiză ar trebui să se utilizeze linia celulară ERα CALUX U2OS transfectată stabil. Linia celulară poate fi obținută de la BioDetection Systems BV, Amsterdam, Țările de Jos, împreună cu un acord tehnic de licență.

10. Ar trebui să se utilizeze numai culturi de celule fără micoplasme. Loturile de celule utilizate ar trebui să fie certificate ca fiind negative pentru contaminare cu micoplasmă sau ar trebui să se efectueze un test pentru micoplasme înainte de utilizare. Ar trebui să se recurgă la RTPCR (reacție de polimerizare în lanț în timp real) pentru detectarea sensibilă a infecției cu micoplasme (9).

Stabilitatea liniei celulare

11. Pentru a menține stabilitatea și integritatea celulelor CALUX, celulele ar trebui să fie păstrate în azot lichid (-80^{0}C). După decongelarea celulelor pentru începerea unei noi culturi, celulele ar trebui să fie subcultivate cel puțin de două ori înainte de a fi utilizate pentru evaluarea activității agoniste și antagoniste estrogene a substanțelor chimice. Celulele nu ar trebui să fie subcultivate pentru mai mult de 30 de pasaje.

12. Pentru a monitoriza stabilitatea liniei celulare în timp, capacitatea de răspuns a sistemului de testare agonistă și antagonistă ar trebui verificată prin evaluarea EC_{50} sau IC_{50} a standardului de referință. În plus, ar trebui să fie monitorizată inducția relativă a eșantionului de martor pozitiv (MP) și a eșantionului de martor negativ (MN). Rezultatele ar trebui să fie în concordanță cu criteriile de acceptare pentru bioanaliza agonistă (tabelul 3C) sau antagonistă ERα CATLUX (tabelul 4C). Standardele de referință, martorii pozitivi și negativi sunt prezentați în tabelele 1 și 2 pentru modul agonist și, respectiv, antagonist.

Cultura celulară și condiții de aranjare pe placă

13. Celulele U2OS ar trebui să fie cultivate în mediu de creștere [DMEM/F12 (1:1) cu roșu de fenol ca indicator al pH-ului, completat cu ser fetal bovin (7,5 %), aminoacizi neesențiale (1 %), 10 unități/ml de penicilină, streptomicină și geneticină (G-418) ca marker de selecție]. Celulele ar trebui să fie introduse într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2) la 37^{0}C și umiditate de 100 %. Atunci când celulele ating o confluență de 85-95 %, acestea ar trebui să fie subcultivate sau pregătite pentru însămânțare în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri. În cazul acestora din urmă, celulele ar trebui să fie resuspendate într-o cantitate de 1 x 10^5 celule/ml în mediu de testare fără estrogen [mediu fără roșu de fenol DMEM/F12 (1:1), la care se adaugă un ser fetal bovin tratat cu dextran și cărbune acoperit (5 % v/v), aminoacizi neesențiali (1 % v/v), 10 unități/ml de penicilină și streptomicină] și introduse în plăcile de microtitrare de 96 de godeuri fiecare (100 µl de suspensie celulară omogenizată). Celulele ar trebui să fie incubate în prealabil într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2, 37^{0}C, umiditate de 100 %) timp de 24 de ore înainte de expunere. Articolele din plastic ar trebui să nu conțină estrogen.

Criterii de acceptabilitate

14. Activitatea agonistă și cea antagonistă a substanței (substanțelor) chimice de testat sunt testate în cadrul unei serii de teste. O serie de teste cuprinde maxim șase plăci de microtitrare. Fiecare serie de teste conține cel puțin o serie completă de diluții ale unui standard de referință, un eșantion de martor pozitiv, un eșantion de martor negativ și martori tratați cu solvent. Figurile 1 și 2 prezintă configurația plăcii pentru seriile de teste agoniste și antagoniste.

15. Fiecare diluție a standardelor de referință, a substanțelor chimice de testat, toți martorii tratați cu solvent, precum și martorii pozitivi și negativi ar trebui să fie analizați în trei replici. Fiecare analiză a datelor efectuată în trei replici ar trebui să îndeplinească cerințele prevăzute în tabelele 3A și 4A.

16. Se măsoară o serie completă de diluții ale standardului de referință (17β-estradiol pentru agonism; tamoxifen pentru antagonism) pe prima placă în cadrul fiecărei serii de teste. Pentru a putea compara rezultatele analizelor aferente celor cinci plăci de microtitrare rămase cu prima placă de microtitrare care conține curba concentrație-răspuns completă a standardului de referință, toate plăcile ar trebui să conțină trei eșantioane de martori: martor tratat cu solvent, cea mai mare concentrație a standardului de referință testat și concentrația aproximativă EC_{50} (agonism) sau IC_{50} (antagonism) a standardului de referință. Raportul dintre valorile medii ale eșantioanelor de martori de pe prima placă și cele cinci plăci rămase ar trebui să îndeplinească cerințele indicate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

17. Pentru fiecare dintre plăcile de microtitrare din cadrul unei serii de teste, se calculează factorul z (10). Factorul z ar trebui să fie calculat utilizând răspunsurile la concentrația cea mai mare și cea mai mică a standardului de referință. O placă de microtitrare este considerată valabilă în cazul în care îndeplinește cerințele menționate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

18. Standardul de referință ar trebui să demonstreze o curbă doză-răspuns sigmoidală. Valoarea EC_{50} sau IC_{50} derivată din răspunsul seriei de diluții a standardului de referință ar trebui să îndeplinească cerințele indicate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

19. Fiecare serie de teste ar trebui să conțină un eșantion de martor pozitiv și un eșantion de martor negativ. Inducția relativă calculată a eșantionului de martor pozitiv și a celui de martor negativ ar trebui să îndeplinească cerințele indicate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

20. În timpul tuturor măsurătorilor, factorul de inducție al celei mai mari concentrații a standardului de referință ar trebui să fie măsurat prin împărțirea mediei celor mai mari valori ale răspunsului ca unitate de lumină relativă (RLU) al standardului de referință 17β-estradiol la media valorilor răspunsului RLU al martorului tratat cu solvent de referință. Acest factor de inducție ar trebui să îndeplinească cerințele minime pentru inducția multiplicată, astfel cum este indicat în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

21. Numai plăcile de microtitrare care îndeplinesc toate criteriile de acceptare menționate mai sus sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat.

22. Criteriile de acceptare sunt aplicabile atât pentru testele de depistare prealabilă, cât și pentru cele complexe.

Tabelul 1

Concentrațiile standardului de referință, ale martorului pozitiv (MP) și ale martorului negativ (MN) pentru bioanaliza agonistă CALUX

	Substanță	NR. CAS	Interval de testare (M)
Standard de referință	17β-estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Martor pozitiv (MP)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Martor negativ (MN)	corticosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabelul 2

Concentrațiile standardului de referință, ale martorului pozitiv (MP) și ale martorului negativ (MN) pentru bioanaliza antagonistă CALUX

	Substanță	NR. CAS	Interval de testare (M)
Standard de referință	tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Martor pozitiv (MP)	4-hidroxi-tamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Martor negativ (MN)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabelul 3

Criterii de acceptare pentru bioanaliza agonistă ERα CALUX

	A - eșantioane individuale pe o placă	**Criterii**
1	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori (pentru MP, MN, fiecare diluție a substanței chimice de testat și a standardului de referință, cu excepția C0)	< 15 %
2	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori [pentru standardul de referință și martorii tratați cu solvent ai substanțelor chimice de testat (C0, SC)]	< 30 %
3	Scăpare LDH maximă, ca măsură a citotoxicității.	< 120 %
	B - în cadrul unei singure plăci de microtitrare	
4	Raportul dintre martorul standard de referință tratat cu solvent (C0; placa 1) și martorul tratat cu solvent al substanței chimice de testat (SC; plăci 2-x)	0,5-2,0
5	Rata concentrației aproximative EC50 și a celei mai mari concentrații standard de referință pe placa 1 și a concentrației aproximative EC50 și a celei mai mari concentrații standard de referință pe plăcile 2-x (C4, C8)	0,70-1,30
6	Factorul Z pentru fiecare placă	> 0,6
	C - în cadrul unei singure serii de analize (toate plăcile în cadrul unei serii)	
7	Curba sigmoidală a standardului de referință	Da (17ß-estradiol)
8	Standardul de referință pentru intervalul EC50 17ß-estradiol	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Inducția multiplicată minimă a celei mai mari concentrații de 17ß-estradiol, în ceea ce privește martorul tratat cu solvent standard de referință.	5
10	Inducție relativă (%) MP.	> 30 %
11	Inducție relativă (%) MN	< 10 %

Aprox.: aproximativ; MP: martor pozitiv; MN: martor negativ; SC: martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat; C0: martor standard de referință tratat cu solvent; SD: abatere standard; LDH: lactat dehidrogenază

Tabelul 4

Criterii de acceptare pentru bioanaliza antagonistă ERα CALUX

	A - eșantioane individuale pe o placă	**Criterii**
1	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori [pentru MN, MP, fiecare diluție a substanței chimice de testat și a standardului de referință, a martorului tratat cu solvent (C0)]	< 15 %
2	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori [pentru martorul tratat cu vehicul (VC) și cea mai mare concentrație standard de referință (C8)]	< 30 %
3	Scăpare LDH maximă, ca măsură a citotoxicității.	< 120 %
	B - în cadrul unei singure plăci de microtitrare	
4	Raportul dintre martorul standard de referință tratat cu solvent (C0; placa 1) și martorul tratat cu solvent al substanței chimice de testat (SC; plăci 2-x)	0,70-1,30
5	Rata concentrațiilor aproximative standard de referință IC50 pe placa 1 și a concentrațiilor aproximative standard de referință IC50 pe plăcile 2-x (C4)	0,70-1,30
6	Raportul dintre cele mai mari concentrații standard de referință de pe placa 1 și cele mai mari concentrații standard de referință de pe plăcile 2-x (C8)	0,50-2,0
7	Factorul Z pentru fiecare placă	> 0,6
	C - în cadrul unei singure serii de analize (toate plăcile în cadrul unei serii)	
8	Curba sigmoidală a standardului de referință	Da (tamoxifen)
9	Standardul de referință pentru intervalul IC50 (tamoxifen)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Inducția minimă multiplicată a martorului tratat cu solvent standard de referință față de cea mai mare concentrație a tamoxifenului.	2,5
11	Inducție relativă (%) MP.	< 70 %
12	Inducție relativă (%) MN	> 85 %

Aprox.: aproximativ; MP: martor pozitiv; MN: martor negativ; VC: martorul tratat cu vehicul (martorul tratat cu solvent fără concentrație fixă a standardului de referință agonist); SC: martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat; C0: martor standard de referință tratat cu solvent; SD: abatere standard; LDH: lactat dehidrogenază

Martor tratat cu solvent/vehicul, standarde de referință, martori pozitivi, martori negativi

23. Pentru testul de depistare prealabilă și pentru testele complexe ar trebui să se utilizeze același martor tratat cu solvent/vehicul, aceleași standarde de referință și aceiași martori pozitivi și martori negativi. În plus, concentrația standardelor de referință, a martorilor pozitivi și a martorilor negativi ar trebui să fie aceeași.

Martorul tratat cu solvent

24. Solventul utilizat pentru a dizolva substanțele chimice de testat ar trebui să fie testat ca martor tratat cu solvent. Dimetilsulfoxidul [DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5] a fost utilizat ca vehicul în timpul validării bioanalizei ERα CALUX. Dacă se utilizează un alt solvent decât DMSO, toate standardele de referință, martorii și substanțele chimice de testat ar trebui să fie testați în același vehicul. Este de remarcat faptul că martorul tratat cu solvent pentru studiile antagoniste conține o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17βestradiol (aproximativ concentrația EC_{50}). Pentru a testa solventul utilizat pentru studii antagoniste, ar trebui să se prepare și să se testeze un martor tratat cu vehicul.

Martor tratat cu vehicul (antagonism)

25. Pentru testarea antagonismului, mediul de analiză este suplimentat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol (aproximativ concentrația EC_{50}). Pentru a testa solventul utilizat pentru a dizolva substanțele chimice de testat pentru antagonism, ar trebui preparat un mediu de analiză fără o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17βestradiol. Acest eșantion de martor este indicat ca fiind martorul tratat cu vehicul. Dimetilsulfoxidul [DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5] a fost utilizat ca vehicul în timpul validării bioanalizei ERα CALUX. Dacă se utilizează un alt solvent decât DMSO, toate standardele de referință, martorii și substanțele chimice de testat ar trebui să fie testați în același vehicul.

Standarde de referință

26. Standardul de referință agonist este 17β-estradiol (tabelul 1). Standardele de referință cuprind o serie de diluții de opt concentrații de 17β-estradiol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Standardul de referință antagonist este tamoxifenul (tabelul 2). Standardele de referință cuprind o serie de diluții de opt concentrații de tamoxifen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Fiecare dintre concentrațiile standardului de referință antagonist este coincubat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Martor pozitiv

28. Martorul pozitiv pentru studii agoniste este 17α-metiltestosteron (tabelul 1).

29. Martorul pozitiv pentru studii antagoniste este 4-hidroxitamoxifen (tabelul 2). Martorul pozitiv antagonist este coincubat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Martor negativ

30. Martorul negativ pentru studii agoniste este corticosteronul (tabelul 1).

31. Martorul negativ pentru studii antagoniste este resveratrolul (tabelul 2). Martorul negativ antagonist este coincubat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17βestradiol ($3*10^{-12}$ M).

Demonstrarea performanțelor laboratorului (a se vedea punctul 14 și tabelele 3 și 4 de la secțiunea „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA" din prezenta metodă de testare)

Vehicul

32. Solventul utilizat pentru dizolvarea substanței chimice de testat ar trebui să solubilizeze complet substanța chimică de testat și să fie miscibil cu mediul celular. DMSO, apa și etanolul (puritate de 95 %-100 %) sunt solvenți adecvați. În cazul în care se folosește DMSO ca solvent, concentrația maximă de DMSO în timpul incubației nu ar trebui să depășească 1 % (v/v). Înainte de utilizare, solventul ar trebui să fie testat pentru absența citotoxicității și interferența cu analizele de performanță.

Pregătirea standardelor de referință, a martorilor pozitivi, a martorilor negative și a substanțelor chimice de testat

33. Standardele de referință, martorii pozitivi, martorii negativi și substanțele chimice de testat se dizolvă în DMSO 100 % (sau un solvent adecvat). Apoi ar trebui să se prepare diluții (în serie) adecvate în același solvent. Înainte de a fi dizolvate, toate substanțele ar trebui să fie lăsate să se echilibreze la temperatura camerei. Soluțiile mamă proaspăt preparate ale standardelor de referință, ale martorilor pozitivi, ale martorilor negativi și ale substanțelor chimice de testat nu ar trebui să prezinte precipitat sau tulburare vizibilă. Stocurile de standarde de referință și de martori pot fi preparate în cantitate mare. Soluțiile mamă ale substanțelor chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate înainte de fiecare experiment. Diluțiile finale ale standardelor de referință, martorii pozitivi, martorii negativi și substanțele chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate pentru fiecare experiment și utilizate în termen de 24 de ore de la preparare.

Solubilitate, citotoxicitate și stabilirea intervalului

34. În timpul testului de depistare prealabilă, se stabilește solubilitatea substanțelor chimice de testat în solventul ales. Se prepară o concentrație maximă a stocului de 0,1 M. În cazul în care această concentrație indică probleme de solubilitate, ar trebui să fie preparate soluții mamă cu concentrații mai mici până la solubilizarea completă a substanței chimice de testat. În timpul testului de depistare prealabilă, se testează diluții de 1: 10 în serie ale substanței chimice de testat. Concentrația maximă de testare pentru testarea agonistă sau antagonistă este de 1 mM. În urma testului de depistare prealabilă, se obține un interval al concentrațiilor ajustat corespunzător pentru substanțele chimice de testat care ar trebui să fie testate în cadrul testelor complexe. Diluțiile utilizate pentru testul complex ar trebui să fie de 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x și 3000x.

35. Testarea citotoxicității este inclusă în protocolul de testare agonistă și antagonistă (11). Testarea citotoxicității este inclusă atât în testul de depistare prealabilă, cât și în testele complexe. Metoda utilizată pentru a evalua citotoxicitatea în timpul validării bioanalizei ERα CALUX a fost testul de scăpare a lactatului dehidrogenază (LDH) în combinație cu inspecția vizuală calitativă a celulelor (a se vedea apendicele 4.1) în urmare expunerii la substanțele chimice de testat. Însă pot fi utilizate alte metode cantitative pentru determinarea citotoxicității [de exemplu, analiza colorimetrică (MTT) bazată pe tetrazolif (MTT) sau bioanaliza citotoxicității CALUX]. În general, concentrațiile substanțelor chimice de testat care indică o reducere mai mare de 20 % a viabilității celulare sunt considerate citotoxice și, prin urmare, nu pot fi utilizate pentru evaluarea datelor. În ceea ce privește analiza scăpărilor de LDH, concentrația substanței chimice de testat este considerată citotoxică atunci când procentul de scăpare a LDH este mai mare de 120 %.

Expunerea la substanța chimică de testat și organizarea plăcilor pentru testare

36. În urma tripsinizării unui balon confluent cu celule cultivate, celulele se suspendă din nou la $1x10^5$ celule/ml în mediu de analiză fără estrogen. În godeurile interioare de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri se introduc o sută de µl de celule re-suspendate. Godeurile exterioare sunt umplute cu 200 µl de soluție salină tamponată de fosfat (PBS) (a se vedea figurile 1 și 2). Celulele introduse sunt incubate în prealabil, timp de 24 de ore, într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, umiditate de 100 %).

37. După pre-incubare, plăcile sunt inspectate pentru citotoxicitate vizuală (a se vedea apendicele 4.1), contaminare și confluență. Sunt utiliate pentru testare doar plăcile care nu prezintă vizual citotoxicitate sau contaminare și au o confluență de cel puțin 85 %. Mediul din godeurile interioare se îndepărtează cu grijă și se înlocuiește cu 200 µl de mediu de testare fără estrogen conținând serii de diluții adecvate de standarde de referință, substanțe chimice de testat, martori pozitivi, martori negativi și martori tratați cu solvent (tabelul 5: studii agoniste; Tabelul 6: studii antagoniste). Toate standardele de referință, substanțele chimice de testat, martorii pozitivi, martorii negativi și

martorii tratați cu solvent sunt testați în trei replici. Figura 1 prezintă distribuția pe placă pentru testarea agonistă. Figura 2 prezintă distribuția pe placă pentru testarea antagonistă. Distribuția pe placă pentru testul de depistare prealabilă și testul complex este identică. Pentru testul antagonist, toate godeurile interioare, cu excepția godeurilor cu martor tratat cu vehicul (VC) conțin, de asemenea, o concentrație fixă de standard de referință agonist 17β-estradiol ($3{,}0*10^{-12}$ M). Este de remarcat faptul că standardele de referință C8 și C4 ar trebui să fie adăugate pe fiecare placă cu TC.

38. După expunerea celulelor la toate substanțele chimice, plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri ar trebui să fie incubate timp de încă 24 de ore într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2, 37°C, umiditate de 100 %).

Figura 1

Configurația plăcii de microtitrare cu 96 de godeuri pentru depistare prealabilă și evaluarea efectului agonist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	MP	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	MP	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	MP	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	MN	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	MN	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	MN	
H												

Plăci ulterioare

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = solvent standard de referință

C(1-8) = serii de diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale standardului de referință.

MP = martor pozitiv.

MN = martor negativ.

TCx-(1-8) = diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale substanței chimice de testat pentru testul de depistare prealabilă și evaluarea efectului agonist al substanței chimice de testat x.

SC = martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat (în mod optim, același solvent ca și în C0, dar, posibil, din alt lot).

Celule de culoare gri: = Godeuri exterioare, umplute cu 200 µl de PBS.

Figura 2

Configurația plăcii de microtitrare cu 96 de godeuri pentru depistarea prealabilă antagonistă și evaluarea efectului antagonist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		MN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	MP	
F		MN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	MP	
G		MN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	MP	
H												

Plăci ulterioare

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = solvent standard de referință

C(1-8) = serii de diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale standardului de referință.

MN = martor negativ.

MP = martor pozitiv.

TCx-(1-8) = diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale substanței chimice de testat pentru testul de depistare prealabilă și evaluarea efectului agonist al substanței chimice de testat x.

SC = martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat (în mod optim, același solvent ca și în C0, dar, posibil, din alt lot).

VC = martor tratat cu vehicul (martorul tratat cu solvent fără concentrație fixă a standardului de referință agonist).

Celule de culoare gri: = Godeuri exterioare, umplute cu 200 µl de PBS.

Notă: toate godeurile interioare, cu excepția godeurilor cu martor tratat cu vehicul (VC) conțin, de asemenea, o concentrație fixă de standard de referință agonist 17β-estradiol (3,0*10-12 M)

Măsurarea luminiscenței

39. Măsurarea luminiscenței este descrisă în detaliu în protocolul privind analiza agonistă și antagonistă (10). Mediul din godeuri ar trebui să fie eliminat, iar celulele ar trebui să fie lizate după 24 de ore de incubare pentru a deschide membrana celulară și a permite măsurarea activității luciferazei.

40. Pentru măsurarea luminiscenței, această procedură necesită un luminometru prevăzut cu două injectoare. Reacția luciferazei se pornește prin injectarea substratului luciferină. Reacția se oprește prin adăugarea a 0,2 M NaOH. Reacția este oprită pentru a împiedica transmiterea luminescenței de la un godeu la altul.

41. Lumina emisă din fiecare godeu este exprimată în unități relative de lumină (RLU) pentru fiecare godeu.

Testul de depistare prealabilă

42. Rezultatele analizei de depistare prealabilă sunt utilizate pentru a determina un interval de concentrații a substanțelor chimice de testat ajustat pentru testarea complexă. Evaluarea rezultatelor analizei de depistare prealabilă și determinarea intervalului de concentrații de substanțe chimice de testat ajustat pentru testul complex sunt descrise în detaliu în protocolul privind analiza agonistă și antagonistă (10). Aici se prezintă un scurt rezumat al procedurilor de determinare a intervalului de concentrații al substanțelor chimice de testat pentru testele agoniste și antagoniste. A se vedea tabelele 5 și 6 pentru îndrumări privind conceperea diluției în serie.

Selecția concentrațiilor pentru evaluarea efectelor agoniste

43. În timpul testului de depistare prealabilă, substanțele chimice de testat ar trebui să fie testate utilizând seriile de diluții indicate în tabelele 5 (agonism) și 6 (antagonism). Toate concentrațiile ar trebui să fie testate în trei godeuri replicate de trei ori conform configurației plăcii indicate în figura 1 (agonism) sau 2 (antagonism).

44. Numai rezultatele analizei care îndeplinesc criteriile de acceptare (tabelul 3) sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat. În cazul în care una sau mai multe plăci de microtitrare dintr-o serie de analize nu îndeplinesc (îndeplinește) criteriile de acceptare, respectivele microplăci ar trebui să fie analizate din nou. În cazul în care prima placă care conține seriile complete de diluții ale standardului de referință nu respectă criteriile de acceptare, întreaga serie de teste (6 plăci) trebuie să fie analizate din nou.

45. Ar trebui să se ajusteze intervalele inițiale ale concentrațiilor substanțelor chimice de testat, iar testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat dacă:

— se observă citotoxicitatea. Procedura de depistare prealabilă ar trebui să fie repetată folosind concentrații necitotoxice ale substanței chimice de testat mai scăzute.

— testul de depistare prealabilă asupra substanței chimice de testat nu prezintă o curbă doză-răspuns completă, deoarece concentrațiile testate generează o inducție maximă. Testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat folosind concentrații ale substanței chimice de testat mai scăzute.

46. Atunci când se observă un răspuns valabil privind doza, ar trebui să se selecteze concentrația (cea mai scăzută) la care se observă o inducție maximă și care nu prezintă citotoxicitate. Cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat în cadrul testelor complexe ar trebui să fie de trei ori această concentrație selectată.

47. Ar trebui să se prepare o serie completă de diluții ajustate ale substanței chimice de testat cu respectarea etapelor de diluție indicate în tabelul 5, începând cu cea mai mare concentrație, astfel cum este stabilită mai sus.

48. O substanță chimică de testat care nu prezintă un efect agonist ar trebui testată în cadrul testelor complexe începând cu cea mai mare concentrație necitotoxică identificată în timpul testului de depistare prealabilă.

Selecția concentrațiilor pentru evaluarea efectelor antagoniste

49. Numai rezultatele analizei care îndeplinesc criteriile de acceptare (tabelul 4) sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat. În cazul în care una sau mai multe plăci de microtitrare dintr-o serie de analize nu îndeplinesc (îndeplinește) criteriile de acceptare, respectivele microplăci ar trebui să fie analizate din nou. În cazul în care prima placă care conține seriile complete de diluții ale standardului de referință nu respectă criteriile de acceptare, întreaga serie de teste (6 plăci) trebuie să fie analizate din nou.

50. Ar trebui să se ajusteze intervalele inițiale ale concentrațiilor substanțelor chimice de testat, iar testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat dacă:

— se observă citotoxicitatea. Procedura de depistare prealabilă ar trebui să fie repetată folosind concentrații necitotoxice ale substanței chimice de testat mai scăzute.

— testul de depistare prealabilă asupra substanței chimice de testat nu prezintă o curbă dozărăspuns completă, deoarece concentrațiile testate generează o inhibiție maximă. Testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat folosind concentrații ale substanței chimice de testat mai scăzute.

51. Atunci când se identifică un răspuns valabil privind doza, ar trebui să se selecteze concentrația (cea mai scăzută) la care se observă o inhibiție maximă și care nu prezintă citotoxicitate. Cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat în cadrul testelor complexe ar trebui să fie de trei ori această concentrație selectată.

52. Ar trebui să se prepare o serie completă de diluții ajustate ale substanței chimice de testat cu respectarea etapelor de diluție indicate în tabelul 6, începând cu cea mai mare concentrație, astfel cum este stabilită mai sus.

53. Substanțele chimice de testat care nu prezintă efecte antagoniste ar trebui testate în cadrul testelor complexe începând cu cea mai mare concentrație necitotoxică verificată prin testul de depistare prealabilă.

Teste complexe

54. În urma selecției intervalelor de concentrații ajustate, substanțele chimice de testat ar trebui să fie testate în mod cuprinzător utilizând seriile de diluții indicate în tabelele 5 (agonism) și 6 (antagonism). Toate concentrațiile ar trebui să fie testate în trei godeuri replicate de trei ori conform configurației plăcii indicate în figura 1 (agonism) sau 2 (antagonism).

55. Numai rezultatele analizei care îndeplinesc criteriile de acceptare (tabelele 3 și 4) sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat. În cazul în care una sau mai multe plăci de microtitrare dintr-o serie de analize nu îndeplinesc (îndeplinește) criteriile de acceptare, respectivele microplăci ar trebui să fie analizate din nou. În cazul în care prima placă care conține seriile complete de diluții ale standardului de referință nu respectă criteriile de acceptare, întreaga serie de teste (6 plăci) trebuie să fie analizate din nou.

Tabelul 5

Concentrația și diluțiile standardelor de referință, ale martorilor și substanțelor chimice de testat utilizate pentru testul agonist

17β-estradiol de referință		TCx - testul de depistare prealabilă		TCx - testul complex		Martori	
conc. (M)		diluție		diluție		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	MP	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	MN	$1*10^{-8}$
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 - substanța chimică de testat x
MP - martor pozitiv (17α-metiltestosteron)
MN - martor negativ (corticosteron)
C0 - martor standard de referință tratat cu solvent
SC - martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat

Tabelul 6

Concentrația și diluțiile standardelor de referință, ale martorilor și substanțelor chimice de testat utilizate pentru testul antagonist

Tamoxifen de referință		TCx - testul de depistare prealabilă		TCx - testul complex		Martori	
conc. (M)		diluție		diluție		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3.000 x	MP	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1.000 x	MN	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Agonist suplimentat**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**conc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - substanța chimică de testat x
MP - martor pozitiv (4-hidroxitamoxifen)
MN - martor negativ (resveratrol)
C0 - martor standard de referință tratat cu solvent
SC - martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat
VC - martor tratat cu vehicul (nu conține o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3,0*10^{-12}$ M)

Colectarea datelor și analiza datelor

56. În urma testului de depistare prealabilă și a testului complex, ar trebui să se determine valorile EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} și inducția maximă (TCx_{max}) ale unei substanțe chimice de testat pentru testarea agonistă. Pentru testarea antagonistă, ar trebui să se calculeze valorile IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} și inducția minimă (TCx_{min}). Figura 3 (agonism) și 4 (antagonism) cuprinde o reprezentare grafică a acestor parametri. Parametrii necesari se calculează pe baza inducției relative a fiecărei substanțe chimice de testat [în raport cu inducția maximă a standardului de referință (= 100 %)]. Regresia neliniară (panta variabilă, 4 parametri) ar trebui să fie utilizată pentru evaluarea datelor conform următoarei ecuații:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

Unde:

X = Log al dozei sau concentrației

Y = Răspuns [inducție relativă (%)]

Partea superioară = Inducție maximă (%)

Partea inferioară = Inducție minimă (%)

$LogEC_{50}$ = Valoare log a concentrației la care se observă 50 % din răspunsul maxim

HillSlope = Factorul de pantă sau panta Hill

57. Datele brute obținute de la luminometru, exprimate ca unități relative de lumină (RLU), ar trebui să fie transferate în fișa de analiză a datelor concepută pentru teste de depistare prealabilă și teste complexe. Datele brute ar trebui să respecte criteriile de acceptare indicate în tabelele 3A și 3B (agonism) sau 4A și 4B (și antagonism). În cazul în care datele brute respectă criteriile de acceptare, se parcurg următoarele etape de calcul pentru determinarea parametrilor necesari:

Agonism

— Se scade media RLU a martorului tratat cu solvent al standardelor de referință din fiecare dintre datele de analiză brute ale standardelor de referință.

— Se scade media RLU a martorului tratat cu solvent al substanței chimice de testat din fiecare dintre datele de analiză brute ale substanțelor chimice de testat.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a standardului de referință. Se setează inducția celei mai mari concentrații a standardului de referință la 100 %.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a substanței chimice de testat în comparație cu cea mai mare concentrație a standardului de referință de 100 %.

— Se evaluează rezultatele analizei în urma regresiei neliniare (pantă variabilă, 4 parametri).

— Se determină valorile EC_{50} și EC_{10} ale standardului de referință.

— Se determină valorile EC_{50} și EC_{10} ale substanțelor chimice de testat.

— Se determină inducția relativă maximă a substanței chimice de testat (TC_{max}).

— Se determină valorile PC_{10} și PC_{50} ale substanțelor chimice de testat.

Pentru substanțele chimice de testat, este posibil să nu se obțină întotdeauna o curbă doză-răspuns completă, de exemplu, din cauza unor probleme de citotoxicitate sau de solubilitate. Prin urmare, nu se pot determina valorile EC_{50}, EC_{10} și PC_{50}. Într-un astfel de caz, se pot determina doar valorile PC_{10} și TC_{max}.

Antagonism

— Se scade media RLU a celei mai mari concentrații standard de referință din fiecare dintre datele de analiză brute ale standardelor de referință.

— Se scade media RLU a celei mai mari concentrații standard de referință din fiecare dintre datele de analiză brute ale substanțelor chimice de testat.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a standardului de referință. Se setează inducția celei mai mici concentrații a standardului de referință la 100 %.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a substanței chimice de testat în comparație cu cea mai scăzută concentrație a standardului de referință de 100 %.

— Se evaluează rezultatele analizei în urma regresiei neliniare (pantă variabilă, 4 parametri).

— Se determină valorile IC_{50} și IC_{20} ale standardului de referință.

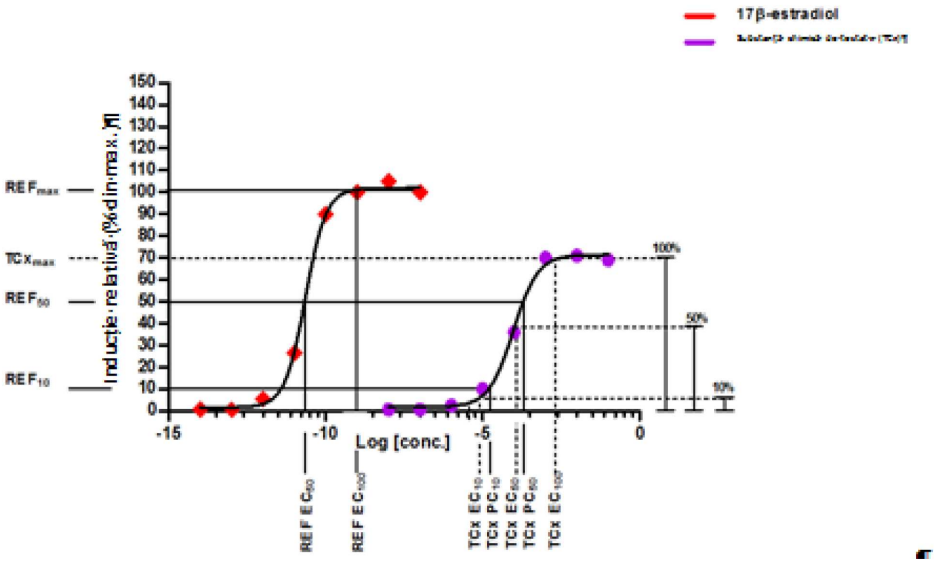
— Se determină valorile IC_{50} și IC_{20} ale substanțelor chimice de testat.

— Se determină inducția relativă minimă a substanței chimice de testat (TC_{min}).

— Se determină valorile PC_{80} și PC_{50} ale substanțelor chimice de testat.

Figura 3

Prezentarea parametrilor determinați în analiza agonistă



EC_{10} = concentrația unei substanțe la care se observă 10 % din răspunsul maxim al acesteia

EC_{50} = concentrația unei substanțe la care se observă 50 % din răspunsul maxim al acesteia

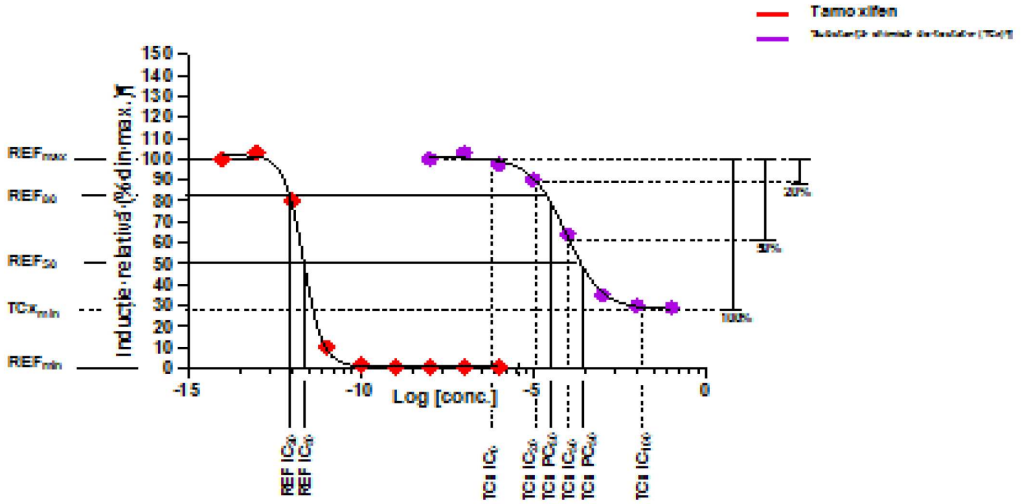
PC_{10} = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea EC_{10} a standardului de referință.

PC_{50} = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea EC_{50} a standardului de referință.

TCx_{max} = inducția relativă maximă a substanței chimice de testat.

Figura 4

Prezentarea parametrilor determinați în analiza antagonistă



IC20 = concentrația unei substanțe la care se observă 80 % din răspunsul maxim al acesteia (inhibiție de 20 %).

IC50 = concentrația unei substanțe la care se observă 50 % din răspunsul maxim al acesteia (inhibiție de 50 %).

PC80 = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea IC20 a standardului de referință.

PC50 = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea IC50 a standardului de referință.

TCxmin = inducția relativă minimă a substanței chimice de testat.

Pentru substanțele chimice de testat, este posibil să nu se obțină întotdeauna o curbă doză-răspuns completă, de exemplu, din cauza unor probleme de citotoxicitate sau de solubilitate. Prin urmare, nu se pot determina valorile IC_{50}, IC_{20} și PC_{50}. Într-un astfel de caz, se pot determina doar valorile PC_{20} și TC_{min}.

58. Rezultatele ar trebui să fie bazate pe două (sau trei) testări independente. Dacă două testări generează rezultate comparabile și, prin urmare, reproductibile, nu este necesar să se efectueze o a treia testare. Pentru ca rezultatele să fie acceptabile, acestea ar trebui:

— să îndeplinească criteriile de acceptabilitate (a se vedea Criteriile de acceptabilitate de la punctele 14-22),

— să fie reproductibile.

Criterii de interpretare a datelor

59. Pentru interpretarea datelor și stabilirea deciziei dacă o substanță chimică de testat este considerată pozitivă sau negativă, se utilizează următoarele criterii:

Agonism

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **pozitivă** în cazul în care:

1 Valoarea TC_{max} este egală cu sau mai mare decât 10 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF_{10}).

2 Cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau depășesc valoarea REF_{10}.

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **negativă** în cazul în care:

1 Valoarea TCmax nu depășește rata de 10 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF10).

2 Mai puțin de două concentrații ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau depășesc valoarea REF10.

Antagonism

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **pozitivă** în cazul în care:

1 Valoarea TCmin este egală cu sau mai mică decât 80 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF80 = inhibiție de 20 %).

2 Cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau mai mici decât valoarea REF80.

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **negativă** în cazul în care:

1 Valoarea TCmin depășește 80 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF80 = inhibiție de 20 %).

2 Mai puțin de două concentrații ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau mai mici decât valoarea REF80.

60. Pentru a caracteriza puterea răspunsului pozitiv al unei substanțe chimice de testat, ar trebui să se consemneze magnitudinea efectului (agonism: TC_{max}; antagonism: TC_{min}) și concentrația la care se produce efectul (agonism: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonism: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

RAPORTUL TESTULUI

61. A se vedea punctul 20 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (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). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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 și 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 și 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 și 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 și Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG și van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M și 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 și Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

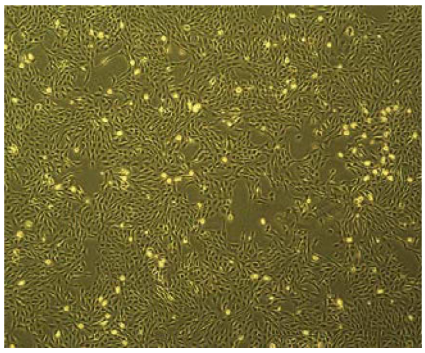
(11) Besselink H, Middelhof I și Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Țările de Jos.

Apendicele 4.1:

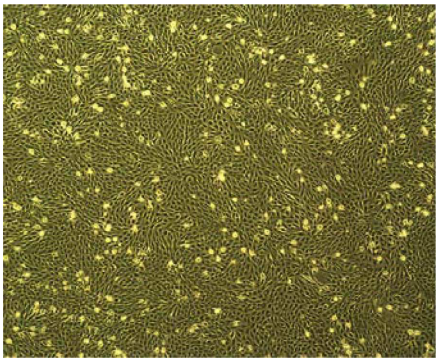
INSPECȚIA VIZUALĂ A VIABILITĂȚII CELULARE



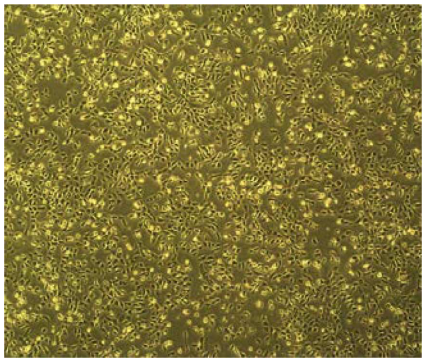
Confluență de < 5 %. Celulele tocmai au fost însămânțate. Viabilitate celulară de 100 %. Clasificare: „fără citotoxicitate”



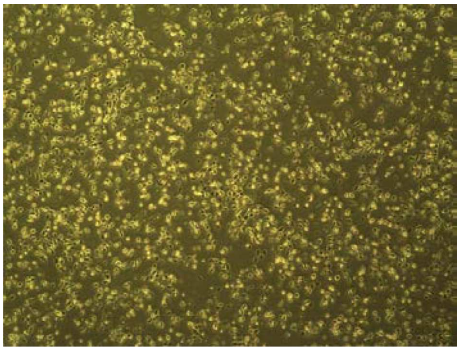
Confluență de > 85 %. În această etapă, celulele sunt expuse la substanțe chimice de testat. Viabilitate celulară de > 95 %.
Clasificare: „fără citotoxicitate”



Confluență de > 95 %. Celulele sunt grupate strâns și încep să crească în exces. Viabilitate celulară de > 95 %.
Clasificare: „fără citotoxicitate”



Viabilitate celulară de < 25 %. Celulele se detașează și legătura dintre acestea slăbește. Celulele se rotunjesc. Clasificare: „citotoxicitate”



Viabilitate celulară de < 5 %. Celulele se detașează complet și legătura dintre acestea se rupe. Celulele se rotunjesc. Clasificare: „citotoxicitate”

B.67 TESTE *IN VITRO* DE MUTAȚII GENICE PE CELULE DE MAMIFERE FOLOSIND GENA TIMIDIN-KINAZĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 490 privind testarea (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic și modificate în contextul progreselor științifice, al necesităților de reglementare și al bunăstării animalelor. Analiza pe limfom de șoarece (MLA) și testul TK6 care utilizează locus de timidin-kinază (TK) au fost incluse inițial în metoda de testare B.17. Ulterior, Grupul de lucru al experților MLA din cadrul Atelierului internațional pentru testarea genotoxicității (International Workshop for Genotoxicity Testing - IWGT) a elaborat recomandări armonizate la nivel internațional privind criteriile de acceptare a analizei și interpretarea datelor pentru MLA (1) (2) (3) (4) (5), iar aceste recomandări sunt integrate în această nouă metodă de testare B.67. Această metodă de testare este dezvoltată pentru MLA și, deoarece utilizează, de asemenea, locusul TK, pentru testul TK6. Deși MLA a fost utilizată pe scară largă în scopuri de reglementare, TK6 a fost utilizat mult mai puțin frecvent. Ar trebui remarcat faptul că, în ciuda similitudinii dintre punctele finale, cele două linii celulare nu sunt interschimbabile, iar programele de reglementare pot să își exprime în mod valabil preferința pentru una față de cealaltă pentru un anumit scop de reglementare. De exemplu, validarea MLA demonstrează caracterul adecvat al acesteia pentru detectarea nu doar a mutației genice, ci și a capacității unei substanțe chimice de testat de a induce daune cromozomiale structurale. Această metodă de testare face parte dintr-o serie de metode de testare cu privire la toxicologia genetică. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (6).

2. Scopul testelor *in vitro* de mutații genice pe celule de mamifere este detectarea mutațiilor genice induse de substanțe chimice. Liniile celulare utilizate în aceste teste măsoară mutațiile directe ale genelor reporter, în special a genei endogene timidinkinază (*TK* pentru celule umane și *Tk* pentru celule de rozătoare, denumite în continuare, în mod colectiv, *TK* în prezenta metodă de testare). Această metodă de testare este prevăzută a fi utilizată pe două linii celulare: linia celulară L5178Y $TK^{+/}$3.7.2C de limfom la șoarece (denumită, în general, L5178Y) și linia celulară umană limfoblastoidă TK6 (denumită, în general, TK6). Deși cele două linii celulare diferă din cauza originii lor, a creșterii celulelor, a statutului p53 etc., testele privind mutațiile genice *TK* pot fi desfășurate într-un mod similar pe ambele tipuri de celule, astfel cum se descrie în prezenta metodă de testare.

3. Natura autosomală și heterozigotă a genei timidin-kinază permite detectarea de colonii viabile ale căror celule sunt deficitare în enzima timidin-kinază ca urmare a mutației de la $TK^{+/-}$ la $TK^{-/-}$. Această deficiență poate să apară ca urmare a unor evenimente genetice care afectează gena *TK*, incluzând atât mutații genice (mutații punctiforme, mutații care alterează cadrul de citire, mici deleții etc.), cât și evenimente cromozomiale (deleții semnificative, rearanjări ale cromozomilor și recombinarea mitotică). Aceste din urmă evenimente sunt exprimate ca fiind o pierdere de heterozigozitate, care reprezintă o modificare genetică răspândită a genelor de suprimare a tumorilor în tumorigeneza la om. Teoretic, pierderea întregului cromozom care poartă gena *TK* ca urmare a deteriorării fusului și/sau a non-disjuncției mitotice poate fi detectată în MLA. Într-adevăr, o combinație de analiză citogenetică și moleculară arată în mod clar că anumite gene mutante TK MLA reprezintă rezultatul non-disjuncției. Însă, dovezile arată că testele privind mutațiile genetice *TK* nu pot detecta în mod fiabil aneugenii atunci când sunt aplicate criteriile standard de citotoxicitate (astfel cum este descris în prezenta metodă) și, prin urmare, nu este adecvat să se recurgă la aceste teste pentru detectarea aneugenilor (7)(8)(9).

4. În cadrul testelor privind mutații ale genei *TK*, sunt generate două clase fenotipice distincte de gene mutante *TK*; genele mutante normale care cresc în același ritm ca și celulele heterozigote TK și genele mutante care cresc lent, cu perioade de dublare prelungite. Genele mutante care cresc normal și cele care cresc lent sunt recunoscute ca fiind gene mutante din colonii mari și din colonii mici în MLA și ca gene mutante din colonii care se formează timpuriu și din colonii care se formează tardiv în TK6. Natura moleculară și citogenică atât a genelor mutante din colonii mari, cât și a genelor mutante din coloniile mici, în cadrul MLA, a fost examinată în detaliu (8) (10) (11) (12) (13). Natura moleculară și citogenică atât a genelor mutante care apar timpuriu, cât și a genelor mutante care apar tardiv, în cadrul TK6, a fost supusă unei examinări ample (14) (15) (16) (17). Genele mutante care cresc lent, pentru ambele tipuri de celule, au suferit deteriorări genetice care implică o genă (gene) presupusă (presupuse) a regla creșterea în apropierea locusului *TK*, ceea ce determină perioade de dublare prelungite și formarea de colonii care apar tardiv sau mici (18). Inducția genelor mutante care cresc lent a fost asociată cu substanțe chimice care induc schimbări structurale brute la nivel de cromozomi. Celulele a căror deteriorare nu implică o genă (gene) presupusă (presupuse) a regla creșterea în apropierea locusului TK cresc într-un ritm similar celui al celulelor parentale și devin gene mutante care cresc normal. Inducerea genelor mutante care cresc normal în principal este asociată cu substanțe chimice care acționează în principal ca agenți mutageni punctuali. În consecință, este esențial să se numere atât genele mutante care cresc lent, cât și genele mutante care cresc normal pentru a recupera toate genele mutante și pentru a prezenta o imagine de ansamblu a tipului (tipurilor) de deteriorări (mutageni/clastogeni) induse de substanța chimică de testat (10) (12) (18) (19).

5. Metoda de testare este organizată astfel încât să furnizeze informații generale care se aplică atât pentru MLA, cât și pentru TK6, precum și indicații de specialitate pentru testele individuale.

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

7. Testele realizate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*.

8. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar putea conduce la rezultate pozitive artificiale (și anume, o posibilă interacțiune cu sistemul de testare), care nu sunt cauzate de interacțiunea dintre substanța chimică de testat și materialul genetic al celulei; astfel de condiții includ modificări ale pH-ului sau ale osmolalității, interacțiunea cu componentele de mediu (20) (21) sau niveluri excesive ale citotoxicității (22) (23) (24). Citotoxicitatea care depășește nivelurile recomandate de citotoxicitate de vârf, astfel cum sunt definite la punctul 28, este considerată excesivă pentru testul MLA și TK6. În plus, ar trebui remarcat faptul că substanțele chimice de testat care sunt analoge timidinei sau care se comportă ca analoge timidinei pot crește frecvența genelor mutante prin creșterea selectivă a genelor mutante spontane de fond în timpul tratamentului celular și necesită metode de testare suplimentare pentru o evaluare adecvată (25).

9. În cazul nanomaterialelor fabricate, pot fi necesare adaptări specifice ale acestei metode de testare, dar care nu sunt descrise în prezenta metodă de testare.

10. Înainte de utilizarea metodei de testare pentru a testa un amestec în vederea generării de date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, ar trebui să se analizeze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință de reglementare pentru testarea amestecului.

11. Celulele mutante care nu pot desfășura activitatea enzimei timidin-kinază din cauza unei mutații $TK^{+/-}$ în $TK^{-/-}$ sunt rezistente la efectele citostatice ale trifluridinei (TFT) analoge pirimidinei. Celulele cu performanță în *TK* sunt sensibile la TFT, ceea ce produce inhibarea metabolismului celular și întrerupe continuarea diviziunii celulare. Astfel, celulele mutante pot să prolifereze în prezența TFT și să formeze colonii vizibile, însă celulele care conțin enzima TK nu pot face acest lucru.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. Celulele în suspensie sunt expuse la substanța chimică de testat cu și în absența unei surse exogene de activare metabolică (a se vedea punctul 19), pentru o perioadă adecvată de timp (a se vedea punctul 33) și apoi subcultivate pentru determinarea citotoxicității și pentru a permite manifestarea fenotipică înainte de selectarea mutantului. Citotoxicitatea este determinată prin creștere totală relativă (RTG - a se vedea punctul 25) pentru MLA și prin supraviețuire relativă (RS - a se vedea punctul 26) pentru TK6. Culturile tratate sunt menținute în mediul de creștere pentru un timp suficient, specific fiecărui tip de celulă (a se vedea punctul 37), pentru a permite o expresie fenotipică aproape optimă a mutațiilor induse. În urma manifestării fenotipice, frecvența mutanților se determină prin însămânțarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu ce conține agentul selectiv pentru a detecta coloniile mutante și într-un mediu fără agent selectiv pentru a determina eficacitatea clonării (viabilitatea). După un timp corespunzător de incubare, se numără coloniile. Frecvența genelor mutante se calculează pe baza numărului de colonii de gene mutante, corectat prin eficacitatea clonării la momentul selecției genelor mutante.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Celule

13. Pentru MLA: Întrucât MLA a fost dezvoltată și caracterizată folosind sublinia de celule L5178Y TK ± 3.7.2C, această sublinie specifică trebuie să fie utilizată pentru MLA. Linia celulară L5178Y a fost obținută dintr-un limfom timic indus de metilcolantren de la un șoarece DBA-2 (26). Clive și colaboratorii au tratat celulele L5178Y (denumite de Clive $TK^{+/+}$ −3) cu sulfonat de etil metan și au izolat o clonă $TK^{-/-}$ (denumită $TK^{-/-}$ −3.7) folosind bromodeoxiuridină ca agent selectiv. Din clona $TK^{-/-}$ a fost izolată o clonă spontană $TK^{+/-}$ (denumită $TK^{+/-}$ −3.7.2.) și o subclonă

(denumită $TK^{+/-}$-3.7.2C), care au fost caracterizate pentru a fi utilizate în MLA (27). Cariotipul pentru linia celulară a fost publicat (28) (29) (30) (31). Numărul modal de cromozomi este 40. Există un cromozom metacentric (t12;13) care ar trebui să fie considerat drept un singur cromozom. Locusul *TK* la șoarece este situat la capătul distal al cromozomului 11. Linia celulară L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C suferă mutații la nivelul ambelor alele ale p53 și produce proteina mutantă p53 (32) (33). Statutul p53 al liniei celulare $TK^{+/-}$-3.7.2C este susceptibil de a fi responsabil pentru capacitatea testului de a detecta deteriorări la scară largă (17).

14. Pentru TK6: TK6 este o linie celulară limfoblastoidă umană. Linia celulară parentală este o linie de celule transformată de virusul Epstein-Barr, WI-L2, care a fost inițial derivată de la un exemplar mascul de 5 ani cu sferocitoză ereditară. Prima clonă izolată, HH4, a fost mutagenizată cu ICR191 și a fost generată o linie celulară *TK* heterozigotă, TK6 (34). Celulele TK6 sunt aproape diploide și cariotipul reprezentantiv este 47, XY, 13 +, t(14; 20), t(3; 21) (35). Locusul *TK* la om este situat pe brațul lung al cromozomului 17. TK6 este o linie celulară cu proteină p53 competentă, deoarece prezintă o secvență de p53 de tip „wild" pe ambele alele și exprimă numai proteina p53 de tip „wild" (36).

15. Pentru MLA și TK6, atunci când se stabilește sau se completează pentru prima dată un stoc principal, se recomandă ca laboratorul de testare să asigure absența contaminării cu *micoplasmă*, să determine cariotipul celulelor sau să vopsească cromozomii care adăpostesc locusul *TK* și să verifice perioadele de dublare a populației. Ar trebui să se stabilească durata normală a ciclului celular în cazul celulelor utilizate în laboratorul de testare, care să fie conform caracteristicilor celulare publicate (16) (19) (37). Acest stoc principal ar trebui să fie păstrat la -150° C sau la o temperatură mai mică și utilizat pentru a pregăti toate stocurile de celule de lucru.

16. Înainte de a stabili un număr mare de stocuri de lucru păstrate în condiții criogenice sau chiar înainte de a fi utilizată într-un experiment, este posibil să fie necesară curățarea culturii de celulele mutante preexistente [cu excepția cazului în care frecvența genei mutante din martorul tratat cu solvent (MF) se află deja în intervalul acceptabil - a se vedea tabelul 2 pentru MLA)]. Aceasta se realizează folosind metotrexat (aminopterină) pentru selectarea și eliminarea celulelor deficiente de TK și adăugarea de timidină, hipoxantină și glicină (L5178Y) sau 2-deoxicitidină (TK6) în cultură pentru a asigura o creștere optimă a celulelor competente TK (19) (38) (39) și (40) pentru TK6. Îndrumări generale cu privire la bune practici pentru întreținerea culturilor celulare, precum și îndrumări specifică pentru celulele L5178Y și TK6 pot fi găsite în referințele (19) (31) (37) (39) (41). Pentru laboratoarele care necesită stocuri de celule principale pentru a iniția MLA sau TK6 sau pentru a obține stocuri de celule principale noi, este disponibil un depozit al celulelor care cuprinde celule bine caracterizate (37).

Condiții pentru medii și cultură

17. Pentru ambele teste ar trebui să fie asigurate condiții adecvate pentru mediul de cultură și incubare (de exemplu, vase de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO2, temperatură de incubare de 37 °C) pentru menținerea culturilor. Culturile de celule ar trebui să fie menținute întotdeauna în condiții care să asigure creșterea acestora în etapa de înregistrare. Este deosebit de important să se aleagă condiții de medii și de cultură astfel încât să asigure creșterea optimă a celulelor în perioada de manifestare și clonarea atât pentru celulele mutante, cât și pentru cele nemutante. Pentru MLA și TK6, este important, de asemenea, să se asigure, prin condițiile de cultură, creșterea optimă atât a genelor mutante TK din coloniile mari/care se formează timpuriu, cât și a celor din coloniile mici/care se formează tardiv. Mai multe detalii privind cultura, inclusiv cu privire la necesitatea de a inactiva la căldură în mod corespunzător serul de cal dacă se utilizează mediul RPMI în timpul selecției genelor mutante, se pot găsi în referințele (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Pregătirea culturilor

18. Celulele se propagă din culturi mamă, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie să continue să crească exponențial pe durata tratamentului și în perioadele de manifestare.

Activare metabolică

19. Ar trebui să se utilizeze sisteme endogene de activare metabolică atunci când se utilizează celule L5178Y și TK6, deoarece acestea prezintă o capacitate metabolică endogenă inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent și care este recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, constă într-o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție

enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (43) (44) (45) sau un amestec de fenobarbital și β-naftoflavonă (46) (47) (48) (49) (50) (51). Acest din urmă amestec nu este contrar Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (52) și s-a dovedit a fi la fel de eficient ca și Aroclor 1254 pentru inducerea oxidazelor cu funcție mixtă (45) (46) (47) (48) (49). Fracția S9 este utilizată, în general, la concentrații pornind de la 1-2 % (v/v), dar poate fi crescută la 10 % (v/v) în mediul de testare final. Alegerea tipului și a concentrației sistemului exogen de activare metabolică sau a inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice de testat.

Prepararea substanțelor chimice de testat

20. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui să fie preparate în solvenți adecvați și diluate, dacă este cazul, înainte de tratamentul aplicat celulelor (a se vedea punctul 21). Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Substanțele chimice de testat gazoase sau volatile ar trebui să fie testate cu modificarea adecvată a protocoalelor standard, de exemplu tratarea în de vase de cultură închise ermetic (53) (54) (55). Preparatele cu substanța chimică de testat ar trebui să fie realizate anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în ceea ce privește acceptabilitatea condițiilor de stocare.

CONDIȚII DE TESTARE

Solvenți

21. Solventul ar trebui ales pentru a optimiza solubilitatea substanței chimice de testat fără a afecta negativ desfășurarea testului, de exemplu, modificarea creșterii celulare, afectarea integrității substanței chimice de testat, reacția cu vasele de cultură, afectarea sistemului de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau a unui mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt apa sau dimetilsulfoxidul. În general, solvenții organici nu ar trebui să depășească 1 % (v/v) și solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu ar trebui să depășească 10 % (v/v) în mediul final de tratament. În cazul în care nu se utilizează solvenți bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora se justifică prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanțele chimice de testat, cu sistemul de testare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa unor astfel de date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1, Definiții) pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau mutagene.

MĂSURAREA CITOTOXICITĂȚII ȘI ALEGEREA CONCENTRAȚIILOR DE TRATAMENT

22. În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, ar trebui să se evite concentrațiile susceptibile de a produce răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 28), precipitate (a se vedea punctul 29) în mediul de cultură sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 8). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă a pH-ului mediului la momentul adăugării acesteia, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

23. Selecția concentrației este efectuată în funcție de citotoxicitate și pe baza altor considerente (a se vedea punctele 27-30). Chiar dacă evaluarea citotoxicității în cadrul unui test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, efectuarea unui test inițial nu este obligatorie. Chiar dacă se realizează o evaluare inițială a citotoxicității, măsurarea citotoxicității pentru fiecare cultură este totuși necesară în cadrul experimentului principal. În cazul în care se realizează un experiment de stabilire a intervalului, acesta ar trebui să acopere o gamă largă de concentrații și poate fie să fie încheiat în ziua 1 după tratament sau continuat în ziua 2 de manifestare, până la momentul selecției genelor mutante (în cazul în care este evident caracterul adecvat al concentrațiilor).

24. Citotoxicitatea ar trebui să fie determinată pentru fiecare cultură de testare și cultură martor: metodele pentru MLA (2) și TK6 (15) sunt definite prin practicile convenite la nivel internațional.

25. În cazul versiunilor cu agar-agar și micro-godeuri ale MLA: ar trebui să se evalueze citotoxicitatea folosind creșterea relativă totală (RTG), care a fost definită inițial de Clive și Spector în 1975 (2). Această măsură include creșterea relativă a suspensiei (RSG: cultură de testare/martor tratat cu solvent) în timpul tratamentului celulelor, timpul de manifestare și eficacitatea clonării relative (RCE: cultură de testare/martor tratat cu solvent) la momentul selecției genelor mutante (2). Ar trebui remarcat faptul că RSG include orice pierdere de celule care se produce în cultura de testare în timpul tratamentului (a se vedea formulele din apendicele 2).

26. Pentru TK6: Citotoxicitatea ar trebui să fie evaluată folosind indicele de supraviețuire relativă (RS), și anume, eficacitatea clonării celulelor placate imediat după tratament, ajustată pentru orice pierdere de celule în timpul tratamentului, pe baza numărului de celule, în comparație cu martorul negativ (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %) (a se vedea formula din apendicele 2).

27. Ar trebui să se evalueze cel puțin patru concentrații de testat (fără a include martorii cu solvent și cei pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Chiar dacă se recomandă utilizarea culturilor duplicate, se poate utiliza fie cultura duplicat, fie cultura tratată ca fiind unică în cadrul fiecărei concentrații testate. Rezultatele obținute la culturile replicate la o concentrație dată ar trebui să fie consemnate separat, însă pot fi grupate pentru analiza datelor (55). În cazul substanțelor chimice de testat cu citotoxicitate ușoară sau fără citotoxicitate, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. Dacă apare citotoxicitatea, ar trebui să se selecteze concentrații care să acopere intervalul de citotoxicitate de la valoarea care produce citotoxicitate, astfel cum este descris la punctul 28, incluzând concentrații la care gradul de citotoxicitate este moderat și redus sau zero. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante abrupte, iar pentru a acoperi întreagul interval de valori de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația concentrație-răspuns, ar putea fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și mai mult de patru concentrații, în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 70). Utilizarea a peste patru concentrații poate fi deosebit de importantă atunci când se utilizează culturi unice.

28. În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație ar trebui să vizeze obținerea unei valori cuprinse între 20 și 10 % RTG pentru MLA și între 20 și 10 % RS pentru TK6 (punctul 67).

29. În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă apare citototoxicitate peste nivelul cel mai scăzut de concentrația de insolubilitate, se recomandă testarea doar la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece precipitatul ar putea genera efecte artificiale. Deoarece MLA și TK6 utilizează culturi în suspensie, ar trebui să se acorde atenție pentru a se asigura faptul că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului. Ar putea fi utilă, de asemenea, determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment.

30. În cazul în care se constată inexistența precipitatului sau o citotoxicitate limitată, concentrația maximă de testare ar tregbui să corespundă cu 10 mm, 2 mg/ml sau 2 µl/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (57) (58). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produse cu reacție complexă sau materiale biologice [și anume, substanțele chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă (UVCB)], extracte din mediu etc., este posibil să fie necesară o concentrație de vârf mai mare (de exemplu, 5 mg/ml), în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecăreia dintre componente. Cu toate acestea, ar trebui remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (59).

Martori

31. Pentru fiecare condiție experimentală ar trebui să se includă martori negativi testați concomitent (a se vedea punctul 21) constituiți doar dintr-un solvent în mediul de tratare și tratați în aceleași condiții precum culturile de tratare.

32. Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra capacitatea laboratorului de a identifica genele mutagene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică (după caz) și a demonstra detectarea adecvată atât a genelor mutante *TK* mici/care se formează tardiv, cât și a celor mari/care se formează timpuriu. Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. Pot fi utilizate substanțe martor pozitive alternative, dacă acest lucru este justificat. Întrucât testele *in vitro* de genotoxicitate pe celule de mamifere sunt suficient de standardizate pentru tratamentele pe termen scurt (3-4 ore) efectuate concomitent cu și fără activare metabolică utilizând aceeași durată a tratamentului, utilizarea de martori pozitivi poate fi limitată la un mutagen care necesită activare metabolică. În acest caz, acest răspuns al unicului martor pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și capacitatea de răspuns a sistemului de testare. Dacă este utilizat, tratamentul de lungă durată (și anume, 24 de ore fără S9) necesită propriul martor poziti, deoarece durata tratamentului va fi diferită de testul care utilizează activarea metabolică. Fiecare martor pozitiv ar trebui să fie utilizat la una sau mai multe concentrații prevăzute a genera creșteri reproductibile și detectabile față de cele de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare, iar răspunsul nu ar trebui să fie compromis de citotoxicitate care depășește limitele specificate în prezenta MT (a se vedea punctul 28).

Tabelul 1

Substanțe de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi

Categorie	martor	NR CAS
1. Mutageni activi fără activare metabolică		
Metansulfonat de metil		66-27-3
Mitomicină C		50-07-7
4-nitrochinolină-N oxid		56-57-5
2. Mutageni care necesită activare metabolică		
Benzo(a)piren		50-32-8
Ciclofosfamidă (monohidrat)		50-18-0 (6055-19-2)
7,12-dimetilbenzantracen		57-97-6
3-metilclorantren		56-49-5

PROCEDURA

Tratamentul cu substanța chimică de testat

33. Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța chimică de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. Timpul de expunere ar trebui să fie corespunzător (de obicei, un timp de 3 până la 4 ore este suficient). Cu toate acestea, ar trebui remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (59). Pentru MLA, în cazul în care tratamentul pe termen scurt generează rezultate negative și există informații care sugerează necesitatea unui tratament prelungit [de exemplu, analogi nucleoside, substanțele chimice cu solubilitate redusă, (5) (59)], ar trebui avută în vedere efectuarea testului cu tratamentul prelungit, și anume, 24 de ore fără S9.

34. Numărul minim de celule utilizate pentru fiecare cultură de testare (martor și tratată) în fiecare etapă a testului ar trebui să depindă de frecvența genelor mutante spontane. Ca și orientare generală, se tratează și se trec celule suficiente în fiecare cultură experimentală, astfel încât să se mențină cel puțin 10, dar, în mod ideal, 100 de gene mutante spontane în toate etapele testului (tratament, expresie fenotipică și selecția genelor mutante) (56).

35. Pentru MLA, frecvența recomandată acceptabilă a genelor mutante spontane este cuprinsă între $35\text{-}140 \times 10^{-6}$ (versiunea cu agar-agar) și $50\text{-}170 \times 10^{-6}$ (versiunea cu micro-godeuri) (a se vedea tabelul 2). Pentru a avea cel puțin 10 și, în mod ideal, 100 de gene mutante spontane care supraviețuiesc tratamentului pentru fiecare cultură de testare, este necesar să se trateze cel puțin 6×10^6 de celule. Tratarea acestui număr de celule și menținerea unui număr suficient de celule în timpul expresiei și al clonării în scopul selectării genelor mutante asigură un număr suficient de gene mutante spontane (10 sau mai multe) în toate etapele experimentului, chiar și pentru culturile tratate la concentrații care conduc la o citotoxicitate de 90 % (astfel cum este măsurată prin RTG de 10 %) (19) (38) (39).

36. Pentru TK6, frecvența genelor mutante spontane se situează, în general, între 2 și 10×10^{-6}. Pentru a avea cel puțin 10 mutanți spontani care supraviețuiesc tratamentului pentru fiecare cultură, este necesar să se trateze cel puțin 20×10^6 de celule. Tratarea acestui număr de celule asigură un număr suficient de mutanți spontani (10 sau mai multe) chiar și pentru culturile tratate la concentrații care provoacă o citotoxicitate de 90 % în timpul tratamentului (10 % RS). În plus, în perioada de manifestare, trebuie cultivate un număr suficient de celule care să fie placate pentru selecția mutanților (60).

Timpul de expresie fenotipică și măsurarea citotoxicității și a frecvenței mutanților

37. La sfârșitul perioadei de tratament, celulele sunt cultivate pentru un anumit timp pentru a permite expresia fenotipică aproape optimă a mutanților nou induși; specific fiecărei linii celulare. În cazul MLA, perioada de expresie fenotipică este de 2 zile. În cazul TK6, perioada de expresie fenotipică este de 3-4 zile. În cazul în care se folosește un tratament de 24 h, perioada de expresie începe după încheierea tratamentului.

38. În timpul perioadei de expresie fenotipică, celulele sunt enumerate zilnic. În cazul MLA, numărul zilnic de celule este utilizat pentru a calcula creșterea zilnică a suspensiei (SG). După perioada de două zile de expresie, celulele sunt suspendate în mediu cu și fără agent selectiv pentru determinarea numărului de mutanți (plăci de selecție) și, respectiv, pentru eficacitatea clonării (plăci de viabilitate). În cazul MLA, există două metode la fel de acceptabile pentru clonarea la selecția mutantului; una care utilizează agar-agar moale și cealaltă care utilizează mediu lichid în plăci cu 96 de godeuri (19) (38) (39). Clonarea în TK6 este realizată utilizând medii lichide și plăci cu 96 de godeuri (16).

39. Triflurotimidina (TFT) este singurul agent selectiv recomandat pentru mutanții *TK* (61).

40. Pentru MLA, plăcile cu agar-agar și plăcile cu micro-godeuri sunt numărate după 1012 zile de incubare. În cazul TK6, coloniile din plăcile cu micro-godeuri sunt marcate după 10-14 zile pentru mutanții care se formează timpuriu. Pentru a recupera mutanții TK6 care cresc lent (se formează tardiv), celulel trebuie să fie realimentate cu mediu de creștere și TFT după numărarea mutanților timpurii și apoi să se incubează plăcile timp de încă 7-10 zile (62). A se vedea punctele 42 & 44 pentru o discuție referitoare la enumerarea mutanților TK care cresc lent și a celor care cresc normal.

41. Calculele corespunzătoare pentru cele două teste, inclusiv cele două metode (cu agaragar și micro-godeuri) pentru MLA sunt date în apendicele 2. Pentru metoda cu agar-agar a MLA, se numără coloniile, iar numărul de colonii de mutanți este ajustat prin eficacitatea clonării pentru calcularea MF. Pentru versiunea cu micro-godeuri a MLA și a TK6, eficacitatea clonării atât în cazul plăcilor de selecție, cât și al celor de eficacitate a clonării este determinată conform distribuției Poisson (63). MF se calculează din aceste două valori ale eficacității clonării.

Caracterizarea coloniilor de mutanți

42. Pentru MLA, în cazul în care substanța chimică de testat este pozitivă (a se vedea punctele 62-63), coloniile ar trebui să fie caracterizate în funcție de dimensiunea sau creșterea acestora la cel puțin una dintre culturile de testare (în general, cea mai mare concentrație pozitivă acceptabilă) și la martorii negativi și pozitivi. În cazul în care substanța chimică de testat este negativă (a se vedea punctul 64), caracterizarea coloniilor de mutanți ar trebui să fie efectuată la martorii negativi și pozitivi. Pentru metoda cu micro-godeuri a MLA, mutanții din colonii mici sunt definiți a fi cei care acoperă mai puțin de 25 % din diametrul godeului, iar mutanții din colonii mari cei care acoperă mai mult de 25 % din diametrul godeului. Pentru metoda agar-agar, se utilizează un contor de colonii automat pentru numărarea și dimensionarea coloniilor de mutanți. Metodele utilizate pentru dimensionarea coloniilor sunt prezentate în detaliu în literatură (19) (38) (40). Caracterizarea coloniilor la martorii negativi și pozitivi este necesară pentru a demonstra că studiile sunt realizate în mod adecvat.

43. Substanța chimică de testat nu poate fi determinată ca fiind negativă dacă mutanții, atât cei din coloniile mari, cât și cei din coloniile mici nu sunt detectați corespunzător în martorul pozitiv. Caracterizarea coloniilor poate fi utilizată pentru a furniza informații generale privind capacitatea substanței chimice de testat de a cauza mutații punctiforme și/sau evenimente cromozomiale (punctul 4).

44. TK6: Diferența dintre mutanții care cresc normal și cei care cresc lent este indicată prin diferența de la nivelul timpului de incubare (a se vedea punctul 40). Pentru TK6, se punctează, în general, atât mutanții care se formează timpuriu, cât și cei care se formează tardiv, pentru toate culturile, inclusiv martorii negativi și pozitivi. Caracterizarea coloniilor la martorii negativi și pozitivi este necesară pentru a demonstra că studiile sunt realizate în mod adecvat. Substanța chimică de testat nu poate fi determinată ca fiind negativă dacă atât mutanții care se formează timpuriu, cât și cei care se formează tardiv nu sunt detectați corespunzător în martorul pozitiv. Caracterizarea coloniilor poate fi utilizată pentru a furniza informații generale privind capacitatea substanței chimice de testat de a cauza mutații punctiforme și/sau evenimente cromozomiale (punctul 4).

Competența de laborator

45. Pentru a demonstra o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acestuia pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul ar trebui să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțe pozitive de referință care acționează prin diferite mecanisme (cel puțin una cu și una fără activare metabolică, alese dintre substanțele enumerate în tabelul 1) și diferiți martori negativi (inclusiv culturi netratate și diferiți solvenți/diferite vehicule). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi ar trebui să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Această cerință nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care au o bază de date anterioare disponibilă, astfel cum este definit la punctele 47-50. În cazul MLA, valorile obținute pentru martorii pozitivi și cei negativi ar trebui să fie în concordanță cu recomandările IWGT (a se vedea tabelul 2).

46. În absența activării metabolice ar trebui să se examineze o selecție de substanțe martor pozitive (a se vedea tabelul 1) în cadrul unor tratamente pe termen scurt și lung (dacă se utilizează tratamente pe termen lung) și, de asemenea, în cadrul tratamentelor pe termen scurt, în prezența activării metabolice, pentru a demonstra capacitatea de a detecta substanțele chimice mutagene, pentru a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică și pentru a demonstra caracterul adecvat al condițiilor de creștere a celulelor în timpul tratamentului, al manifestării fenotipice și al selecției celulelor mutante, precum și al procedurilor de punctare. Ar trebui să se aleagă o plajă de valori ale concentrațiilor substanțelor chimice selectate astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date anterioare privind martorii testați

47. Laboratorul ar trebui să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

48. La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori negativi. Pe măsură ce se adaugă mai multe date experimentale la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel ar trebui să se încadreze, în mod ideal, în limita de 95 % a martorilor din distribuția respectivă (64) (65).

49. Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului ar trebui să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele ar trebui să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X (65)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (66). Referințele bibliografice prezintă detalii și recomandări suplimentare privind modul de dezvoltare și utilizare a datele istorice (64).

50. Datele privind martorii negativi ar trebui să constea în frecvențe ale celulelor mutante dintr-o cultură unică sau, de preferință, din culturi duplicate, astfel cum este descris la punctul 27. Martorii negativi testați în paralel ar trebui să se încadreze, în mod ideal, în limita de 95 % a martorilor din distribuția bazei de date privind martorii negativi testați în paralel a laboratorului. În cazul în care datele privind martorii negativi se situează în afara limitei de 95 % a martorilor, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme, există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 49) și nu există nicio dovadă a unor erori tehnice sau umane.

51. Orice modificare a protocolului experimental ar trebui să fie avută în vedere sub aspectul coerenței datelor cu bazele de date existente ale laboratorului cu privire la martorii testați anterior. Orice inconsecvență majoră ar trebui să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

52. Prezentarea datelor atât pentru MLA, cât și pentru TK6 ar trebui să includă, atât pentru culturile tratate, cât și pentru cele martor, datele necesare pentru calcularea citotoxicității (RTG sau, respectiv, RS) și frecvențele mutanților, conform descrierii de mai jos.

53. În cazul MLA, ar trebui să se furnizeze date cu privire la fiecare cultură pentru RSG, RTG, eficacitatea clonării în momentul selecției mutanților și numărul de colonii de mutanți (pentru versiunea cu agar-agar) sau numărul de godeuri goale (pentru versiunea cu micro-godeuri). MF ar trebui exprimat ca număr de celule mutante la un milion de celule supraviețuitoare. Dacă răspunsul este pozitiv, valorile MF pentru colonii mici și mari (și/sau procentul MF total) ar trebui să fie date pentru cel puțin o concentrație a substanței chimice de testat (în general, cea mai mare concentrație pozitivă) și a martorilor negativi și pozitivi. În cazul unui răspuns negativ, ar trebui să fie furnizate valorile MF pentru coloniile mici și cele mari pentru martorul negativ și cel pozitiv.

54. În cazul TK6, ar trebui să fie furnizate date despre fiecare cultură pentru RS, eficacitatea clonării în momentul selecției mutanților și numărul godeurilor goale pentru mutanții care se formează timpuriu și cei care se formează tardiv. MF ar trebui să fie exprimată ca număr de celule mutante pe număr de celule supraviețuitoare și ar trebui să includă valoarea MF totală, precum și MF (și/sau procentul MF total) pentru mutații care se formează timpuriu și cei care se formează tardiv.

Criterii de acceptabilitate

55. Atât pentru MLA, cât și pentru TK6, ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii înainte de a determina rezultatele globale pentru o anumită substanță chimică de testat:

— au fost aplicate două condiții experimentale (tratament scurt cu și fără activare metabolică - a se vedea punctul 33), cu excepția cazului în care una a generat rezultate pozitive.

— Ar trebui să se poată analiza un număr adecvat de celule și concentrații (a se vedea punctele 27, 34-36).

— Criteriile de selecție a concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 28-30.

Criterii de acceptabilitate pentru martorii negativi și pozitivi

56. Analiza Grupului de lucru de experți MLA din cadrul IWGT asupra unei cantități mari de date MLA a culminat cu un consens internațional cu privire la criteriile de acceptabilitate specifice pentru MLA (1) (2) (3) (4) (5). Prin urmare, această metodă de testare oferă recomandări specifice pentru determinarea acceptabilității martorilor negativi și pozitivi și pentru evaluarea rezultatelor fiecărei substanțe în cadrul MLA. TK6 are o bază de date mult mai mică și nu a făcut obiectul unei evaluări de către un grup de lucru.

57. În cazul MLA, fiecare experiment ar trebui să fie evaluat cu privire la problema dacă martorul netratat/tratat cu solvent îndeplinește criteriile de acceptare ale grupului de lucru MLA din cadrul IWGT [punctul (4) și tabelul 2 de mai jos] pentru: (1) MF (este de remarcat faptul că valorile acceptabile ale IWGT sunt diferite de versiunile cu agar-agar și cu micro-godeuri ale MLA), (2) eficacitatea clonării (CE) în momentul selectării mutanților și (3) creșterea suspensiei (SG) pentru martorul tratat cu solvent (a se vedea formulele din apendicele 2).

Tabelul 2

Criterii de acceptabilitate pentru MLA

Parametru	Metoda agar-agar moale	Metoda cu micro-godeuri
Frecvența mutanților	35-140 × 10^{-6}	50-170 × 10^{-6}
Eficacitatea clonării	65-120 %	65-120 %
Creșterea suspensiei	de 8-32 de ori (3-4 ore de tratament) de 32-180 de ori (24 de ore de tratament, dacă este efectuat)	de 8-32 de ori (3-4 ore de tratament) de 32-180 de ori (24 de ore de tratament, dacă este efectuat)

58. În cazul MLA, fiecare test ar trebui să fie evaluat, de asemenea, cu privire la problema dacă martorul (martorii) pozitiv(i) respectă cel puțin unul dintre următoarele două criterii de acceptare elaborate de grupul de lucru din cadrul IWGT:

— Martorul pozitiv ar trebui să demonstreze o creștere absolută a valorii MF totale, și anume, o creștere peste fondul spontan MF [o valoare MF (IMF) indusă] de cel puțin 300×10^{-6}. Cel puțin 40 % din valoarea IMF ar trebui să se reflecte în MF aferent coloniilor mici.

— Un martor pozitiv înregistrează o creștere a valorii MF a coloniei mici cu cel puțin 150×10^{-6} peste valoarea înregistrată la martorul netratat/tratat cu solvent testat în paralel (o valoare IMF a coloniei mici de 150×10^{-6}).

59. Pentru TK6, va fi acceptabil un test dacă martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru a fi adăugat în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctele 48-49. În plus, martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 32) ar trebui să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date privind martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.

60. Pentru ambele teste, limita superioară de citotoxicitate observată la cultura de martori pozitivi ar trebui să fie aceeași cu cea a culturilor experimentale. Adică RTG/RS nu ar trebui să fie sub 10 %. Este suficient să se utilizeze o singură concentrație (sau una dintre concentrațiile culturilor de martori pozitivi în cazul în care se utilizează mai multe concentrații) pentru a demonstra că au fost îndeplinite criteriile de acceptare pentru martorul pozitiv. În plus, valoarea MF a martorului pozitiv trebuie să se situeze în intervalul acceptabil stabilit pentru laborator.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

61. În cazul MLA, grupul de lucru de experți privind limfomul la șoarece (The Mouse Lymphoma Expert Workgroup) din cadrul IWGT a desfășurat o activitate intensă cu privire la relevanța biologică și criteriile pentru un răspuns pozitiv. Prin urmare, prezenta metodă de testare oferă recomandări specifice pentru interpretarea rezultatelor substanțelor chimice de testat din MLA (a se vedea punctele 62-64). TK6 are o bază de date mult mai mică și nu a făcut obiectul unei evaluări de către un grup de lucru. Prin urmare, recomandările pentru interpretarea datelor pentru TK6 sunt prezentate în termeni mai generali (a se vedea punctele 65-66). Pentru ambele teste se aplică recomandări suplimentare (a se vedea punctele 67-71).

MLA

62. Se recomandă o abordare pentru definirea răspunsurilor pozitive și negative, pentru a se asigura relevanța biologică a creșterii MF. În locul analizei statistice utilizate, în general, pentru alte teste, aceasta se bazează pe utilizarea unei frecvențe predefinite a mutanților (și anume, o creștere a MF peste cea a martorului testat în paralel), care a fost denumită factor de evaluare globală (GEF) și care se bazează pe analiza distribuției datelor privind MF a martorul negativ din laboratoarele participante (4). Pentru versiunea cu agar-agar a MLA, GEF este 90×10^{-6} și pentru versiunea cu micro-godeuri a MLA, GEF este 126×10^{-6}.

63. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă dacă, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33), creșterea MF peste fondul testat în paralel depășește GEF, iar creșterea este legată de concentrație (de exemplu, prin utilizarea unui test al tendințelor). Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi capabilă de a induce mutații în cadrul acestui sistem de testare.

64. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă dacă, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33) nu există niciun răspuns legat de concentrare sau, dacă există o creștere a MF, aceasta nu depășește GEF. Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi incapabilă de a induce mutații în cadrul acestui sistem de testare.

TK6

65. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă dacă, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33):

— cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de concentrație (a se vedea punctul 33)

— Oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 48).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, se consideră că substanța chimică de testat poate produce mutații în cadrul acestui sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (66) (67).

66. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33):

— niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,

— toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 48).

Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi incapabilă de a induce mutații în cadrul acestui sistem de testare.

Pentru MLA și TK6:

67. În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație ar trebui să ajungă la valori ale RTG/RS situate între 20 și 10 %. Consensul este că ar trebui să se acorde atenție atunci când se interpretează rezultate pozitive aflate numai între 20 și 10 % RTG/RS, iar rezultatul nu ar fi considerat pozitiv în cazul în care creșterea MF s-ar produce doar la 10 % RTG/RS sau sub această valoare (dacă este evaluată) (2) (59).

68. Există anumite circumstanțe în care este posibil să se stabilească, prin informații suplimentare, dacă o substanță chimică de testat nu este mutagenă atunci când nu există o cultură care să indice o valoare RTG între 10-20 % RTG/RS. Aceste situații sunt prezentate în continuare: (1) Nu există nicio dovadă de mutagenicitate (de exemplu, absența unui răspuns la doză, nicio frecvență a mutanților peste celor observate la martorii negativi testați în paralel sau în intervalele de fond istorice etc.) într-o serie de puncte de date în intervalul 100 %-20 % RTG/RS și există cel puțin un punct de date între 20 și 25 % RTG/RS. (2) Nu există nicio dovadă de mutagenicitate (de exemplu, absența unui răspuns la doză, nicio frecvență a mutanților peste celor observate la martorii negativi testați în paralel sau în intervalele de fond istorice etc.) într-o serie de puncte de date în intervalul 100 %-20 % RTG/RS și există, de asemenea, un punct de date negativ sub 10 % RTG/RS. În ambele situații, se poate concluziona că substanța chimică de testat este negativă.

69. Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

70. În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv, astfel cum este descris mai sus și/sau pentru a ajuta la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele ar trebui să fie evaluate de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Ar putea fi utilă repetarea unui experiment, eventual folosind condiții experimentale modificate [de exemplu, stabilirea unei distanța între concentrații pentru a crește probabilitatea de a atinge puncte de date în intervalul 1020 % RTG/RS, utilizând alte condiții de activare metabolică (și anume, concentrație S9 sau origine S9) și durata tratamentului].

71. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative. Prin urmare, răspunsul substanței chimice de testat ar trebui să fie concluzionat ca fiind echivoc (interpretat cu aceeași probabilitate de a fi pozitiv sau negativ).

RAPORT TESTULUI

72. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

— justificarea alegerii solventului;

— procentul de solvent în mediul final de cultură.

Celule:

Pentru culturile principale din laborator:

— tipul și sursa celulelor, precum și datele anterioare din laboratorul de testare;

— caracteristicile cariotipului și/sau numărul modal de cromozomi;

— metode de întreținere a culturilor de celule;

— absența micoplasmei;

— perioade de dublare a celulelor.

Condiții de testare:

— justificarea alegerii concentrațiilor și a numărului de culturi celulare; inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate;

— compoziția mediilor de cultură, concentrația de CO_2, nivelul de umiditate;

— concentrația substanței chimice de testat, exprimată în concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, µg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);

— concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;

— temperatura de incubare;

— timpul de incubare;

— durata tratamentului;

— densitatea celulară în timpul tratamentului;

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursa fracției S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația și volumul amestecului S9 și fracția S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale fracției S9);

— substanțe martor pozitive și negative, concentrații finale pentru fiecare condiție de tratament;

— timpul de manifestare (inclusiv numărul de celule însămânțate, subculturile și programele de alimentare, dacă este cazul);

— identitatea agentului selectiv și a concentrației acestuia;

— pentru MLA, ar trebui să se indice versiunea utilizată (cu agar-agar sau microgodeuri).

— criterii de acceptabilitate a testelor;

— metodele utilizate pentru numărarea celulelor viabile și mutante;

— metodele utilizate pentru măsurarea citotoxicității;

— orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;

— durata perioadelor de incubare după placare;

— definirea coloniilor pentru care se ține seama de dimensiuni și de tip (inclusiv criteriile pentru coloniile "mici" și "mari", dacă este cazul).

— criteriile conform cărora un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea, dacă este testată, și precipitarea, dacă este relevant.

Rezultate:

— numărul de celule tratate și numărul de celule subcultivate pentru fiecare cultură;

— parametrii de toxicitate (RTG pentru MLA și RS pentru TK6);

— semne de precipitare și ora determinării;

— numărul de celule placată în mediu selectiv și neselectiv;

— numărul de colonii în mediul neselectiv și numărul de colonii rezistente în mediu selectiv și frecvențele celulelor mutante aferente;

— dimensionarea coloniilor pentru martorii negativi și pozitivi și dacă substanța chimică de testat este pozitivă, cel puțin o concentrație, precum și frecvențele aferente ale mutanților;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;

— date cu privire la martorii negativi (tratați cu solvent) și pozitivi testați anterior (concentrații și solvenți) cu intervale, valori medii și abateri standard; numărul de teste pe care se bazează martorii testați anterior;

— analize statistice (pentru culturi individuale și duplicate grupate, dacă este cazul) și valori p, dacă există; și pentru MLA, evaluarea GEF.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(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. și 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. și 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. și 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. și 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) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. și 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. și 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. și 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. și Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. SUA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. În: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z și Caldwell(Eds), a doua ediție, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și 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. și Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. În: *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. și Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Programul Organizației Națiunilor Unite pentru Mediu (UNEP).

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

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. și 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. și 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. În: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. și 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. și 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. Publicație disponibilă la adresa: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. și 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. și 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. și 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. și 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, a doua ediție.

(66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 199), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. și Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, a treia ediție, New York: John Wiley & Sons.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneugen: orice substanță sau proces chimic care, prin interacțiunea cu componentele ciclului celular de diviziune mitotică și meiotică, conduce la apariția aneuploidiei la celule sau organisme.

Aneuploidie: orice abatere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază: substanțe chimice care provoacă substituția perechilor de bază în ADN.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Eficacitatea clonării: Procentul de celule placate la o densitate scăzută, care pot crește într-o colonie care poate fi numărată.

Clastogen: orice substanță sau proces chimic care cauzează aberații cromozomiale structurale la populații de celule sau organisme.

Citotoxicitate: pentru analizele incluse în prezenta metodă de testare, citotoxicitatea este identificată ca o reducere a creșterii relative totale (RSG) sau a supraviețuirii relative (RS) pentru MLA și, respectiv, TK6.

Mutație directă: o mutație a genelor de la forma parentală la forma mutantă care generează o modificare sau o pierdere a activității enzimatice sau a funcției proteinei codificate.

Mutageni de decalare a cadrului de citire: substanțe chimice care provoacă adăugarea sau ștergerea uneia sau a mai multor perechi de bază din molecula de ADN.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv ruperi ale ADN-ului, aducții, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Recombinare mitotică: în timpul mitozei, recombinarea între cromatide omoloage, ceea ce ar putea conduce la inducerea unor rupturi duble ale șirului ADN sau la pierderea heterozigozității.

Mutagen: produce o modificare ereditară a uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN la gene sau a structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Frecvența mutanților (FM): numărul de celule mutante observate împărțit la numărul de celule viabile.

Timpul de expresie fenotipică: timpul după tratament, în care modificarea genetică se fixează în interiorul genomului și orice produse genetice preexistente sunt epuizate până la modificarea trăsăturii fenotipice.

Supraviețuire relativă (RS): RS este utilizat ca indicator al citotoxicității legate de tratament în TK6. Aceasta este eficacitatea relativă a clonării (CE) a celulelor așezate pe placă imediat după tratamentul celular, ajustată cu orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în raport cu eficacitatea clonării la martorul negativ.

Creștere relativă în suspensie (RSG): Pentru MLA, creșterea relativă totală în suspensie, în două zile, a culturii de testare în raport cu creșterea totală în suspensie, în două zile, a martorului negativ/tratat cu solvent (Clive și Spector, 1975). RSG ar trebui să includă creșterea relativă a culturii de testare în raport cu martorul negativ/tratat cu solvent în perioada tratamentului.

Creștere relativă totală (RTG): Valoarea RTG este utilizată ca indicator al citotoxicității legate de tratament în MLA. Aceasta reprezintă un indicator al creșterii relative (la martorul tratat cu vehicul) a culturilor de testare în timpul tratamentului, al expresiei de două zile și în etapele de clonare a selecției mutanților ale testului. Valoarea RSG pentru fiecare cultură de testare se înmulțește cu eficacitatea relativă a clonării culturii de testare în momentul selecției mutanților și este exprimată în raport cu eficacitatea clonării martorului negativ/solvent (Clive și Spector, 1975).

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amestec S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metalică a enzimelor.

Creșterea în suspensie (SG): creșterea multiplicată a numărului de celule pe durata tratamentului și în fazele de expresie ale MLA. SG se calculează prin înmulțirea creșterii multiplicate în ziua 1 cu creșterea multiplicată din ziua 2 pentru tratamentul scurt (de 3 sau 4 ore). În cazul în care se folosește un tratament de 24 de ore, SG reprezintă creșterea multiplicată în timpul tratamentului de 24 de ore, înmulțită cu creșterile multiplicate din zilele de expresie 1 și 2.

Martor tratat cu solvent: Termen general pentru a defini culturile martor care primesc doar solventul, care este utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Martori netratați: Martorii netratați sunt culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nici cu substanță chimică de testat, nici cu solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan culturilor care beneficiază de tratament cu substanță chimică de testat.

Apendicele 2

FORMULE

Citotoxicitate

În cazul ambelor versiuni (cu agar-agar și micro-godeuri) ale MLA

Citotoxicitatea este definită ca fiind creșterea relativă totală (RSG), care include creșterea relativă în suspensie (RSG) în perioada de expresie de două zile și eficacitatea relativă a clonării (RCE) obținută în momentul selecției mutanților. Valorile RTG, RSG și RCE sunt toate exprimate ca procente.

Calcularea RSG: Creșterea în suspensie 1 (SG_1) constituie rata de creștere între ziua 0 și ziua 1 (concentrația celulelor în ziua 1/concentrația celulelor în ziua 0) și creșterea în suspensie 2 (SG_2) reprezintă rata de creștere între ziua 1 și ziua 2 (concentrația celulelor în ziua 2/concentrația celulelor în ziua 1). RSG reprezintă SG totală (SG_1 x SG_2) pentru cultura tratată comparativ cu martorul netratat/tratat cu solvent. Și anume: RSG = $[SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}]$ / $[SG_{1(martor)}$ x $SG_{2(martor)}]$ Valoarea SG_1 ar trebui să fie calculată de la concentrația inițială de celule utilizate la începutul tratamentului aplicat celulelor. Aceasta reflectă orice citotoxicitate diferențială care apare la cultura (culturile) de testare în timpul tratamentului celulelor.

RCE reprezintă eficacitatea relativă a clonării culturilor de testare comparativ cu eficacitatea relativă a clonării la martorul netratat/tratat cu solvent obținută la momentul selecției mutanților.

Creștere relativă totală (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Supraviețuirea relativă (RS):

Citotoxicitatea este evaluată prin supraviețuirea relativă, și anume, eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în comparație cu eficacitatea clonării la martorii negativi (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %). Ajustarea pentru pierderea de celule în timpul tratamentului poate fi calculată după cum urmează:

$$\text{CE ajustat} = \text{CE} \times \frac{\textit{Numărul de celule la sfârșitul tratamentului}}{\textit{Numărul de celule la începutul tratamentului}}$$

RS pentru o cultură tratată cu o substanță chimică de testat se calculează după cum urmează:

$$RS = \frac{\textit{EC ajustată în cultura tratată}}{\textit{EC ajustată în martorul tratat cu solvent}} \times 100$$

Frecvența mutanților pentru MLA și TK6

Frecvența mutanților (MF) reprezintă eficacitatea clonării coloniilor de mutanți în mediu selectiv (CE_M) ajustată la eficacitatea clonării în mediu neselectiv la momentul selecției mutanților (CE_V). Și anume, MF = CE_M/CE_V. Calculul pentru aceste două valori de eficacitate a clonării este descris mai jos pentru metodele de clonare cu agar-agar și cu micro-godeuri.

Versiunea MLA cu agar-agar: În versiunea MLA cu agar-agar, numărul de colonii de pe placa de selecție a mutanților (C_M) și numărul de colonii de pe placa fără selecție sau cu eficacitate a clonării (număr fiabil) (C_V) se obțin prin numărarea directă a clonelor. Atunci când sunt așezate pe placă 600 de celule pentru plăcile cu eficacitatea clonării (CE) în vederea selecției mutanților (CE_M) și plăcile fără selecție sau cu eficacitatea clonării (număr viabil) (CE_V) și 3 x 10^6, celulele sunt utilizate pentru selecția mutanților,

$$CE_M = C_M/(3 \times 10^6) = (C_M/3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V/600$$

Versiunea MLA și TK6 cu micro-godeuri: În versiunea MLA cu micro-godeuri, C_M și C_V sunt determinate ca fiind produsul numărului total de micro-godeuri (TW) și al numărului probabil de colonii pe godeu (P) pe plăcile cu micro-godeuri.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Pornind de la termenul zero al distribuției Poisson (Furth et al., 1981), P este dat de

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Unde EW reprezintă godeurile goale, iar TW reprezintă numărul total de godeuri. Prin urmare,

$$CE_M = C_M /T_M = (P_M \times TW_M)/T_M$$

$$CE_V = C_V /T_V = (P_V \times TW_V)/T_V$$

În cazul versiunii MLA cu micro-godeuri, frecvențele mutanților din colonii mici și mari vor fi calculate în mod identic, utilizându-se numărul relevant de godeuri goale pentru coloniile mici și mari.

În cazul TK6, frecvențele mutanților din coloniile mici și mari se bazează pe mutanții care se formează timpuriu și cei care se formează tardiv.

B.68 METODĂ DE TESTARE IN VITRO PRIN EXPUNERE PE TERMEN SCURT PENTRU IDENTIFICAREA i) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PRODUC LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A ii) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 491 (2017). Metoda de testare prin expunere pe termen scurt (STE) este o metodă *in vitro* care poate fi utilizată în anumite circumstanțe și cu limitări specifice pentru clasificarea și etichetarea pericolelor pe care le prezintă substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă leziunea oculară gravă, precum și cele care nu necesită o clasificare pentru leziunea oculară gravă sau pentru iritația oculară, astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și de Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]).

2. Potențialul de pericol pentru ochi al substanțelor chimice a fost evaluat timp de mulți ani, în primul rând prin utilizarea unui test *in vivo* pe ochi de iepure [MT B.5 (8), echivalent cu OCDE TG nr. 405]. Este general acceptat faptul că, în viitorul apropiat, niciun test alternativ *in vitro* nu va putea înlocui în totalitate testul *in vivo* pe ochi de iepure pentru a estima întreaga gamă de răspunsuri privind leziunea oculară gravă/iritația oculară pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinațiile strategice de metode de testare alternative utilizate în cadrul unei strategii de testare (etapizate) ar putea înlocui foarte bine pe deplin testul pe ochi de șoarece (2). Abordarea descendentă este concepută pentru testarea substanțelor chimice care pot fi prevăzute, pe baza informațiilor existente, a avea un potențial iritant ridicat sau a provoacă leziunea oculară gravă. În schimb, abordarea ascendentă este concepută pentru testarea substanțelor chimice care pot fi prevăzute, pe baza informațiilor existente, a nu provoca o iritație oculară suficientă pentru a impune o clasificare. În timp ce metoda de testare STE nu este considerată a fi o înlocuire completă a testului *in vivo* pe ochi de iepure, aceasta este adecvată pentru a fi utilizată în cadrul unei strategii de testare etapizate pentru clasificarea și etichetarea reglementară, cum ar fi metoda descendentă/ascendentă, pentru a identifica fără testare suplimentară (i) substanțele chimice care provoacă leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și (ii) substanțele chimice (cu excepția substanțelor foarte volatile și a tuturor substanțelor chimice solide, altele decât surfactanții) care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă (fără clasificare în GHS al ONU/Regulamentul CLP) (1) (2). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu este nici prevăzută a provoca leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nici încadrată într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP (nu provoacă nici leziunea oculară gravă și nici iritația oculară) prin metoda de testare STE ar trebui să fie supusă unor teste suplimentare pentru stabilirea unei clasificări definitive. În plus, ar trebui să se consulte autoritățile de reglementare competente înainte de utilizarea STE în cadrul unei abordări ascendente în conformitate cu alte scheme de clasificare decât GHS al ONU/Regulamentul CLP. Alegerea celei mai adecvate metode de testare și utilizarea acestei metode de testare ar trebui să fie avută în vedere în contextul documentului de orientare al OCDE referitor la o strategie integrată privind testarea și evaluarea pentru leziunea oculară gravă și iritația oculară (14).

3. Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul de pericol pentru ochi al unei substanțe chimice de testat, pe baza capacității acesteia de a induce citotoxicitatea în cadrul metodei de testare prin expunere pe termen scurt. Efectul citotoxic al substanțelor chimice asupra celulelor epiteliale corneene este un mod important de acțiune (MOA) care determină lezarea epiteliului cornean și iritația oculară. Viabilitatea celulară este evaluată în cadrul metodei de testare STE prin măsurarea cantitativă, după extragerea din celule a sării de formazan de culoare albastră produsă de celulele vii prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu], cunoscut și sub denumirea de bromură de tiazolil albastru tetrazoliu (3). Viabilitatea celulară obținută este comparată cu martorul tratat cu solvent (viabilitate relativă) și se utilizează pentru estimarea potențialului de pericol pentru ochi al substanței chimice de testat. O substanță chimică de testat este încadrată în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP atunci când ambele concentrații 5 % și 0,05 % determină o viabilitate celulară mai mică decât sau egală cu (≤) 70 %. Invers, o substanță chimică este prevăzută a fi neîncadrată în nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP atunci când ambele concentrații de 5 % și 0,05 % determină o viabilitate celulară mai mare decât (>) 70 %.

4. Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în prezenta metodă de testare pentru a face referire la ceea ce este supus testării și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare STE pentru testarea substanțelor și/sau a amestecurilor. Definițiile sunt prezentate în apendice.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

5. Această metodă de testare se bazează pe un protocol elaborat de Kao Corporation (4), care a făcut obiectul a două studii de validare diferite: unul realizat de către Comitetul de validare al Societății japoneze pentru alternative la

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

experimentele pe animale (JSAAE) (5) și altul de către Centrul japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) (6). O evaluare inter pares a fost realizată de NICEATM/ICCVAM pe baza rapoartelor studiilor de validare și a documentelor de analiză de fond privind metoda de testare (7).

6. Atunci când sunt utilizate pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (1), datele obținute prin metoda de testare STE cu privire la 125 de substanțe chimice (inclusiv substanțe și amestecuri) au arătat o precizie generală de 83 % (104/125), o rată de rezultate fals pozitive de 1 % (1/86) și o rată de rezultate fals negative de 51 % (20/39) în comparație cu testul *in vivo* pe ochi de iepure (7). Rata de rezultate fals negative obținută nu este esențială în contextul de față, întrucât toate substanțele chimice de testat care induc o viabilitate celulară de ≤ 70 % la o concentrație de 5 % și > 70 % la o concentrație de 0,05 % ar fi testate ulterior cu alte metode de testare *in vitro* validate în mod adecvat sau, ca o ultimă opțiune, în cadrul testului *in vivo* pe ochi de iepure, în funcție de cerințele de reglementare și în conformitate cu strategia de testare secvențială și cu abordările bazate pe dovezi recomandate în prezent (1) (8). Au fost testate, în principal, substanțe monocomponente, deși există, de asemenea, o cantitate limitată de date privind testarea amestecurilor. Metoda de testare este totuși aplicabilă din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor multicomponente și a amestecurilor. Cu toate acestea, înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, ar trebui să se analizeze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate în scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință de reglementare pentru testarea amestecului. Metoda de testare STE nu a prezentat alte deficiențe specifice atunci când a fost utilizată pentru identificarea substanțelor chimice de testat ca fiind încadrate în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP. Cercetătorii ar putea lua în calcul utilizarea acestei metode de testare pentru substanțe chimice de testat; prin aceasta, viabilitatea celulară de ≤ 70 % la concentrații de 5 % și 0,05 % ar trebui să fie acceptată ca indicator al unui răspuns care induce leziunea oculară gravă care ar trebui să fie încadrată în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP fără teste suplimentare.

7. Atunci când sunt utilizate pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care nu necesită clasificarea pentru iritația oculară și leziunea oculară gravă (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (1), datele obținute prin metoda de testare STE cu privire la 130 de substanțe chimice (inclusiv substanțe și amestecuri) au arătat o precizie generală de 85 % (110/130), o rată de rezultate fals negative de 12 % (9/73) și o rată de rezultate fals pozitive de 19 % (11/57) în comparație cu testul *in vivo* pe ochi de iepure (7). În cazul în care sunt excluse din setul de date substanțele puternic volatile și substanțele solide, altele decât surfactanții, precizia totală se îmbunătățește, ajungând la 90 % (92 /102), rata de rezultate fals negative la 2 % (1/54) și rata de rezultate fals pozitive la 19 % (9/48) (7). În consecință, eventualele deficiențe ale metodei de testare STE, atunci când aceasta este utilizată pentru a identifica substanțe chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară și leziunea oculară gravă (fără încadrare în GHS al ONU/Regulamentul CLP), reprezintă o rată ridicată de rezultate fals negative pentru i) substanțe foarte volatile, cu o presiune a vaporilor peste 6 kPa și (ii) substanțe chimice solide (substanțe și amestecuri), altele decât surfactanții și amestecurile alcătuite exclusiv din surfactanți. Aceste substanțe chimice sunt excluse din domeniul de aplicabilitate al metodei de testare STE (7).

8. În plus față de substanțele chimice menționate la punctele (6) și (7), setul de date generat prin metoda STE conține, de asemenea, date interne privind 40 de amestecuri, care, atunci când au fost comparate cu testul Draize *in vivo* pe ochi, au arătat o precizie de 88 % (35/40), o rată de rezultate fals pozitive de 50 % (5/10) și o rată de rezultate fals negative de 0 % (0/30) pentru estimarea amestecurilor care nu necesită încadrare în sistemele de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP (9). Prin urmare, metoda de testare STE poate fi aplicată pentru a identifica amestecuri ca nefiind încadrate în nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP, în cadrul unei abordări ascendente, cu excepția amestecurilor solide, altele decât cele care sunt compuse doar din surfactanți, ca o extindere a limitării sale la substanțe solide. În plus, amestecurile care conțin substanțe cu o presiune a vaporilor mai mare de 6 kPa ar trebui evaluate cu atenție pentru a se evita posibile previziuni insuficiente, acestea trebuind să fie justificate de la caz la caz.

9. Metoda de testare STE nu poate fi utilizată pentru identificarea substanțelor chimice de testat ca fiind încadrate în categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP sau în categoria 2A (iritație oculară) sau 2B (iritație oculară ușoară), având în vedere numărul considerabil de substanțe chimice din categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP care sunt estimate insuficient ca fiind încadrate în categoria 2, 2A sau 2B, precum și de substanțe chimice neîncadrate în nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP, care sunt estimate insuficient ca fiind încadrate în categoria 2, 2A sau 2B (7). În acest scop, ar putea fi necesare teste suplimentare utilizând o altă metodă adecvată.

10. Metoda de testare STE este adecvată pentru substanțele chimice de testat care sunt dizolvate sau suspendate uniform pentru cel puțin 5 minute într-o salină fiziologică, cu 5 % dimetilsulfoxid (DMSO) în soluție salină sau ulei mineral. Metoda de testare STE nu este adecvată pentru substanțele chimice de testat care sunt insolubile sau nu pot fi suspendate uniform pentru cel puțin 5 minute într-o salină fiziologică, cu 5 % DMSO în soluție salină sau ulei mineral. Utilizarea de ulei mineral în metoda de testare STE este posibilă datorită expunerii pe termen scurt. Așadar, metoda de testare STE este adecvată pentru estimarea potențialului de pericol pentru ochi al substanțelor chimice de testat insolubile în apă (de exemplu, alcooli grași sau cetone cu lanț lung), cu condiția ca acestea să fie miscibile în cel puțin unul dintre cei trei solvenți propuși mai sus (4).
11. Termenul „substanță chimică de testat" este utilizat în prezenta metodă de testare pentru a face referire la ceea ce este supus testării ([1]) și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare STE pentru testarea substanțelor și/sau a amestecurilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. Metoda de testare STE este o analiză *in vitro* bazată pe citotoxicitate, care este efectuată pe un monostrat confluent de celule Statens Serumaninstitut Rabbit Cornea (SIRC) cultivate pe o microplacă din policarbonat cu 96 de godeuri (4). După o expunere de cinci minute la o substanță chimică de testat, citotoxicitatea este măsurată cantitativ ca viabilitate relativă a celulelor SIRC prin analiza MTT (4). Viabilitatea celulară scăzută este utilizată pentru a estima eventualele efecte adverse care determină leziuni oculare.
13. S-a raportat că 80 % dintr-o soluție care intră în ochiul unui iepure este excretată prin intermediul sacului conjunctival în trei sau patru minute, în timp ce peste 80 % dintr-o soluție care intră în ochiul uman este excretată în unu sau două minute (10). Metoda de testare STE încearcă să aproximeze acești timpi de expunere și utilizează citotoxicitatea ca punct final pentru a evalua gradul de lezare a celulelor SIRC ca urmare a unei expuneri de cinci minute la substanța chimică de testat.

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

14. Înainte de utilizarea sistematică a metodei de testare STE descrise în prezenta metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin clasificarea corectă a celor unsprezece substanțe recomandate în tabelul 1. Aceste substanțe au fost selectate pentru a reprezenta întreaga gamă de răspunsuri pentru leziunea oculară gravă sau iritația oculară pe baza rezultatelor testelor *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) și a sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP (1). Alte criterii de selecție au inclus faptul că substanțele ar trebui să fie disponibile în comerț, că ar trebui să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate și că ar trebui să fie disponibile date *in vitro* de înaltă calitate din metoda de testare STE (3). În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate, cu condiția să se aplice aceleași criterii, astfel cum sunt descrise aici.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare

Substanță	NR CAS	Clasa chimică ([1])	Stare fizică	*In Vivo*- Cat. ([65]) din GHS al ONU/CLP	Solvent în testul STE	STE - cat. din GHS al ONU/CLP
Clorură de benzalconiu (10 %, apoasă)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Salin	Categoria 1

([1]) În iunie 2013, reuniunea comună a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată acum o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat" care descrie ceea ce este testat în metodele de testare noi și actualizate.

Substanță	NR CAS	Clasa chimică ([1])	Stare fizică	*In Vivo*- Cat. ([65]) din GHS al ONU/CLP	Solvent în testul STE	STE - cat. din GHS al ONU/CLP
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Lichid	Categoria 1	Salin	Categoria 1
Acid Red 92	18472-87-2	Compus heterociclic; Compus de brom; Compus de clor	Solid	Categoria 1	Salin	Categoria 1
Hidroxid de sodiu	1310-73-2	Alcali; Substanță chimică anorganică	Solid	Categoria 1 ([66])	Salin	Categoria 1
Butirlactonă	96-48-0	Lactonă; Compus heterociclic	Lichid	Categoria 2A (Categoria 2 din CLP)	Salin	Nu se poate estima
1-octanol	111-87-5	Alcool	Lichid	Categoria 2A/B ([67])(Categoria 2 din CLP)	Ulei mineral	Nu se poate estima
Ciclopentanol	96-41-3	Alcool; Hidrocarbură, ciclică	Lichid	Categoria 2A/B ([68]) (Categoria 2 din CLP)	Salin	Nu se poate estima
Acetat de 2-etoxietil	111-15-9	Alcool; Eter	Lichid	Neclasificată	Salin	Neclasificată
Dodecan	112-40-3	Hidrocarbură, aciclică	Lichid	Neclasificată	Ulei mineral	Neclasificată
Metilizobutilcetonă	108-10-1	Cetonă	Lichid	Neclasificată	Ulei mineral	Neclasificată

Substanță	NR CAS	Clasa chimică ([1])	Stare fizică	*In Vivo*- Cat. ([65]) din GHS al ONU/CLP	Solvent în testul STE	STE - cat. din GHS al ONU/CLP
sulfat de 1,1-dimetilguanidină	598-65-2	amidină; compus de sulf	Solid	Neclasificată	Salin	Neclasificată

([1]) Distribuirea în clase de substanțe chimice s-a realizat utilizându-se informațiile obținute din publicațiile anterioare ale NICEATM și, dacă acestea nu au fost disponibile, apelându-se la vocabularul Medical Subject Headings al National Library of Medicine (MeSH®) [prin ChemIDplus® (National Library of Medicine), disponibil la adresa http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/] și utilizând determinările structurale realizate de NICEATM.

([65]) Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG nr. 405) și prin utilizarea GHS al ONU/Regulamentului CLP (1).

([66]) Încadrarea în categ. 1 se bazează pe potențialul coroziv pentru piele al soluției de 100 % hidroxid de sodiu (inclus ca substanță chimică de verificare cu potențial coroziv pentru piele în TG nr. 435 a OCDE) și pe criteriul pentru categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (1).

([67]) Încadrarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU de distincție între cele două categorii, și anume, 2 din 6 față de 4 din 6 animale, cu efecte în ziua 7, necesar pentru a se realiza o încadrare în categoria 2A. Setul de date *in vivo* a inclus două studii cu câte trei animale. Într-un studiu, două din trei animale au prezentat efecte în ziua 7, asigurând încadrarea în categ. 2A (11), în timp ce în al doilea studiu toate punctele finale la toate cele trei animale au revenit la un punctaj de zero până în ziua 7, asigurând încadrarea în categ. 2B (12).

([68]) Încadrarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU pentru distingerea între cele două categorii, și anume, 1 din 3 față de 2 din 3 animale, cu efecte în ziua 7, necesar pentru a se realiza o încadrare în categoria 2A. Studiul *in vivo* a inclus trei animale. Toate punctele finale, cu excepția opacității corneene și a roșeții specifice conjunctivei la un singur animal, au fost recuperate la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat integral până în ziua 7 avut un punctaj de opacitate corneană de 1 și roșeață atribuită conjunctivitei de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat în totalitate în ziua 14 (11).

Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

PROCEDURA

Prepararea monostratului celular

15. Pentru realizarea metodei de testare STE ar trebui să se utilizeze linia celulară din cornee de iepure SIRC. Se recomandă ca celulele SIRC să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection CCL60.

16. Celulele SIRC sunt cultivate la 37 °C în atmosferă de 5 % CO_2 și de umiditate în balon de cultură conținând un mediu de cultură ce cuprinde mediul esențial minim al lui Eagle (MEM), completat cu 10 % ser fetal bovin (FBS), 2 mM L-glutamină, 50100 de unități/ml de penicilină și 50-100 µg/ml de streptomicină. Celulele care au devenit confluente în balonul de cultură ar trebui să fie separate folosind soluție tripsină-acid etilendiaminotetraacetic, cu sau fără utilizarea unei raclete de celule. Celulele sunt propagate (de exemplu, 2-3 treceri) într-un balon de cultură înainte de a fi utilizate pentru testele de rutină și ar trebui să fie supuse unui număr maxim de 25 de treceri de la decongelare.

17. Apoi, celulele gata de utilizat pentru testul STE sunt pregătite la densitatea corespunzătoare și însămânțate în plăci cu 96 de godeuri. Densitatea celulară recomandată pentru însămânțare este de $6{,}0 \times 10^3$ de celule pe godeu atunci când celulele sunt utilizate la patru zile după însămânțare, sau $3{,}0 \times 10^3$ de celule per godeu atunci când celulele sunt utilizate la cinci zile după însămânțare, la un volum de cultură de 200 µl. Celulele utilizate pentru testul STE, care sunt însămânțate într-un mediu de cultură la o densitate adecvată, vor atinge o confluență de peste 80 % la momentul testării, și anume la patru sau cinci zile după însămânțare.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

18. Prima alegere a solventului pentru dizolvarea sau suspendarea substanțelor chimice de testat este soluția fiziologică salină. În cazul în care substanța chimică de testat demonstrează o solubilitate scăzută sau nu poate fi dizolvată sau suspendată uniform timp de cel puțin cinci minute în soluție salină, ca opțiune secundară de solvent se utilizează soluția cu 5 % DMSO (CAS nr. 67-68-5) în soluție salină. Pentru substanțele chimice de testat care nu pot fi dizolvate sau suspendate în mod uniform pentru cel puțin cinci minute în soluție salină sau în soluție salină cu 5 % DMSO, ca opțiune terță de solvent se utilizează uleiul mineral (CAS nr. 8042-47-5).

19. Substanțele chimice de testat se dizolvă sau se suspendă în mod uniform în solventul selectat la concentrația de 5 % (g/g) și apoi se diluează cu o diluție în serie multiplicată de 10 ori la o concentrație de 0,5 % și 0,05 %. Fiecare substanță chimică de testat trebuie să fie testată atât la concentrația de 5 %, cât și la cea de 0,05 %. Celulele cultivate pe placa cu 96 de godeuri sunt expuse la o cantitate de 200 µl/godeu, la o concentrație de 5 % sau 0,05 % din soluția (sau suspensia) cu substanță chimică de testat timp de cinci minute la temperatura camerei. Substanțele chimice de testat (substanțe monocomponente, multicomponente sau amestecuri) sunt considerate substanțe pure și diluate sau suspendate conform metodei, indiferent de puritatea lor.

20. Mediul de cultură descris la punctul 16 se utilizează ca martor de mediu pe fiecare placă din cadrul fiecărei serii de repetiții. În plus, celulele trebuie expuse, de asemenea, la eșantioane de martor tratat cu solvent pe fiecare placă din cadrul fiecărei serii de repetiții. Pentru solvenții prezentați la punctul 18 s-a obținut confirmarea că nu prezintă efecte adverse asupra viabilității celulelor SIRC.

21. În metoda de testare STE, va fi utilizat lauril sulfat de sodiu (SLS) cu un conținut de 0,01 % în soluție salină ca martor pozitiv pe fiecare placă din cadrul fiecărei serii de repetiții. Pentru a calcula viabilitatea celulară a martorului pozitiv, fiecare repetare placă din cadrul fiecărei repetiții trebuie să includă, de asemenea, un martor tratat cu solvent salin.

22. Este necesară o probă în vederea determinării compensației pentru densitatea optică și ar trebui să se recolteze din godeuri care conțin numai o soluție salină tamponată cu fosfat, dar fără calciu și magneziu (PBS-) sau celule.

23. Fiecare eșantion (substanță chimică de testat la 5 % și 0,05 %, martor de mediu, martor tratat cu solvent și martor pozitiv) ar trebui să fie testat în trei replici la fiecare repetiție prin expunerea celulelor la 200 µl din substanța chimică de testat sau martor corespunzătoare timp de cinci minute la temperatura camerei.

24. Substanțele de referință sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant pentru ochi al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei anumite clase de substanțe sau produse chimice, sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante pentru ochi într-un interval specific de reacții iritante.

Măsurarea viabilității celulare

25. După expunere, celulele sunt spălate de două ori cu 200 µl de PBS și se adaugă 200 µl de soluție de MTT (0,5 mg de MTT/ml de mediu de cultură). După un timp de reacție de două ore într-un incubator (37 °C, 5 % CO_2), soluția MTT este decantată, se extrage formazanul MTT prin adăugarea a 200 µl de 0,04 N acid hidroclorhidricizopropanol timp de 60 minute la întuneric la temperatura ambiantă și se măsoară absorbanța soluției de formazan MTT la 570 nm cu un cititor de placă. Interferența substanțelor chimice de testat cu analiza MTT (prin coloranți sau reductori direcți ai MTT) se produce numai atunci când în sistemul de testare se păstrează o cantitate semnificativă de substanță chimică de testat după clătire în urma expunerii, așa cum este cazul țesutului de cornee umană reconstruit sau al țesutului de epidermă umană reconstruit 3D, dar nu este relevantă pentru culturile de celule 2D utilizate pentru metoda de testare STE.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

26. Valorile densității optice (DO) obținute pentru fiecare substanță chimică de testat sunt apoi utilizate pentru a calcula viabilitatea celulară raportată la martorul tratat cu solvent, care este stabilită la 100 %. Viabilitatea celulară relativă este exprimată în procente și se obține împărțind DO a substanței chimice de testat la DO a martorului tratat cu solvent, după scăderea valorii DO a soluției sărace din ambele valori.

$$\textit{Viabilitatea celulară}(\%) = \frac{(OD_{570}\ \textit{a subst.chimice de testat}) - (OD_{570}\ \textit{a soluției sărace})}{(OD_{570}\ \textit{a martorului tratat cu solvent}) - (OD_{570}\ \textit{a soluției sărace})} \times 100$$

În mod similar, viabilitatea celulară relativă a fiecărui martor tratat cu solvent este exprimată în procente și se obține împărțind DO a fiecărui martor tratat cu solvent la DO a martorului de mediu, după scăderea valorii DO a soluției sărace din ambele valori.

27. Ar trebui să se efectueze trei repetiții independente, fiecare conținând trei godeuri replicate (și anume, n = 9). Media aritmetică a celor trei godeuri pentru fiecare substanță chimică de testat și martor tratat cu solvent, în cadrul fiecărei repetiții independente, este utilizată pentru a calcula media aritmetică a viabilității celulare relative. Media aritmetică finală a viabilității celulare este calculată pe baza celor trei repetiții independente.

28. În continuare sunt prezentate valorile-limită ale viabilității celulare pentru identificarea substanțelor chimice de testat care provoacă leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și substanțele chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă (fără încadrare în GHS al ONU/Regulamentul CLP).

Tabelul 2

Model predictiv al metodei de testare STE

Viabilitate celulară		Clasificare în GHS al ONU/CLP	Aplicabilitate
La 5 %	La 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Neclasificată	Substanțe și amestecuri, cu excepția: i) substanțe foarte volatile, cu o presiune a vaporilor de peste 6 kPa [1] și ii) substanțe chimice solide (substanțe și amestecuri), cu excepția surfactanților și a amestecurilor compuse exclusiv din surfactanți
≤ 70 %	> 70 %	Nu se poate estima	Nu este cazul
≤ 70 %	≤ 70 %	Categoria 1	Substanțe și amestecuri [2]

[1] Amestecurile care conțin substanțe cu o presiune a vaporilor mai mare de 6 kPa ar trebui evaluate cu atenție pentru a se evita posibile previziuni insuficiente, acestea trebuind să fie justificate de la caz la caz.

[2] Pe baza rezultatelor obținute în principal cu substanțe monocomponente, deși există, de asemenea, o cantitate limitată de date privind testarea amestecurilor. Metoda de testare este totuși aplicabilă din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor multicomponente și a amestecurilor. Înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, ar trebui să se analizeze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate furniza rezultate adecvate pentru scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

Criterii de acceptare

29. Rezultatele testului sunt considerate acceptabile în cazul în care sunt îndeplinite toate criteriile următoare:

a) Densitatea optică a martorului de mediu (expunere la mediu de cultură) ar trebui să fie de cel puțin 0,3, după scăderea densității optice a soluției sărace.

b) Viabilitatea martorului tratat cu solvent ar trebui să fie de cel puțin 80 % în raport cu martorul de mediu. În cazul în care, la fiecare repetiție, se utilizează mai mulți martori tratați cu solvent, fiecare dintre acești martori ar trebui să prezinte o viabilitate celulară mai mare de 80 % pentru a califica substanțele chimice de testat testate cu acești solvenți.

c) Viabilitatea celulară obținută cu martorul pozitiv (0,01 % SLS) ar trebui să se încadreze în două abateri standard ale mediei istorice. Limitele superioare și inferioare de acceptabilitate pentru martorul pozitiv ar trebui să fie actualizate frecvent, adică o dată la trei luni sau de fiecare dată când este efectuat un test acceptabil în laboratoare în care testele sunt desfășurate rar (și anume, mai puțin de o dată pe lună). În cazul în care un laborator nu completează un număr suficient de experimente pentru a stabili o distribuție a martorilor pozitivi solidă din punct de vedere statistic, se acceptă utilizarea limitelor superioare și inferioare de acceptare stabilite de dezvoltatorul metodei, și anume între 21,1 % și 62,3 %, în conformitate cu datele sale istorice de laborator ale acestuia, în același timp realizându-se o distribuție internă în timpul primelor teste de rutină.

d) Abaterea standard a viabilității celulare finale derivată în urma a trei repetiții independente ar trebui să fie mai mică de 15 % pentru ambele concentrații de 5 % și 0,05 % pentru substanța chimică de testat.

În cazul în care nu este îndeplinit unul sau mai multe dintre aceste criterii, rezultatele ar trebui să fie eliminate și ar trebui să se efectueze alte trei repetiții independente.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

30. Trebuis să se consemneze datele pentru fiecare godeu (de exemplu, valorile viabilității celulare) din cadrul fiecărei repetiții, precum și media globală, SD și clasificarea.

Raport testului

31. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și substanțe martor

— Substanța monocomponentă: identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) de registru CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— starea fizică, volatilitatea, pH, LogP, masa moleculară, clasa de substanțe chimice și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

Condițiile și procedurile metodei de testare

— numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— descrierea metodei de testare utilizate;

— linia celulară utilizată, sursa sa, numărul de reînsămânțare și confluența celulelor utilizate pentru testare;

— detalii privind procedura de testare utilizată;

— numărul de repetiții și replici utilizate;

— concentrațiile substanței chimice de testat utilizate (dacă acestea diferă de cele recomandate);

— justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat;

— durata expunerii la substanța chimică de testat (dacă este diferită de cea recomandată);

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

— descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— trimiterea la media martorilor pozitivi testați anterior și la abaterea standard (SD):

— Demonstrarea performanțelor de laborator în aplicarea metodei de testare (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau demonstrarea performanței reproductibile a metodei de testare în timp.

Rezultate

— Pentru fiecare substanță chimică de testat și fiecare substanță martor, precum și pentru fiecare concentrație testată, ar trebui să se prezinte sub formă de tabel valorile DO individuale pentru fiecare godeu replicat, media aritmetică a valorilor DO pentru fiecare repetiție independentă, viabilitatea celulară % pentru fiecare repetiție independentă și media aritmetică finală % a viabilității celulare și SD în cadrul celor trei repetiții;

— Rezultatele pentru mediu, solvent și martorul pozitiv care demonstrează criteriile adecvate de acceptare a studiului;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea generală derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A cincea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: 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. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.

(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 și 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 [nr. 48. (2)], Bruxelles, Belgia.

(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) OCDE (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 (nr. 34). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(14) OCDE (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 (nr. 263). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Apendice

DEFINIȚII

Precizie: gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat interschimbabil cu termenul de „concordanță" pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (13).

Substanță de referință: o substanță utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță de referință ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) o sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigură (sigure); (ii) similitudini structurale și funcționale cu clasa substanțelor care sunt testate; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute; și (v) puterea cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordare ascendentă: abordare etapizată utilizată pentru o substanță chimică de testat susceptibilă de a nu necesita clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Iritație oculară: producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochiului" și cu „categoria 2 din GHS al ONU"

Rată de rezultate fals negative: proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Pericol: proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Martor pentru mediu: o probă replică netratată care conține toate componentele unui sistem de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul de testare.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță mono-constituent: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

DO: Densitate optică.

Martor pozitiv: o replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (10).

Fiabilitate: măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (13).

Sensibilitate: proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (10).

Leziune oculară gravă: producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochiului” și cu „categoria 1 din GHS al ONU”

Martor solvent/vehicul: o probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, inclusiv solventul sau vehiculul analizat împreună cu substanța chimică de testat tratată și cu alte probe martor pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (13).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Surfactant: numit și agent tensioactiv, aceasta este o substanță chimică, cum ar fi un detergent, care poate să reducă tensiunea la suprafață a unui lichid și, astfel, să îi permită acesteia spumarea sau penetrarea solidelor; este cunoscut, de asemenea, ca agent de umectare.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Strategie de testare etapizată: o strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt analizate, într-o anumită ordine, utilizând un proces de identificare a dovezilor în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se efectuează o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Abordare descendentă: o abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca leziunea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă leziunea oculară gravă (rezultat pozitiv) din alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (1).

Categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP: A se vedea „Leziune oculară gravă”.

Categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP: A se vedea „iritația oculară”.

Neîncadrat în GHS al ONU/Regulamentul CLP: Substanțe chimice care nu sunt clasificate drept substanțe chimice din categoria 1 sau 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (sau în categoria 2 A sau 2B din GHS al ONU).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

B.69. **METODA DE TESTARE PE EPITELIU SIMILAR CORNEEI UMANE RECONSTRUIT (RhCE) PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 492 (2017). *Iritația cutanată gravă* înseamnă producerea de leziuni ale țesutului ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este pe deplin reversibilă în termen de 21 de zile de la aplicare, astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). De asemenea, conform GHS al ONU și CLP, *iritația oculară* se referă la producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Substanțele chimice de testat care provoacă leziunea oculară gravă sunt încadrate în categoria 1 din GHS al ONU și Regulamentul CLP, iar cele care provoacă iritația oculară sunt încadrate în categoria 2 din GHS al ONU și Regulamentul CLP. Substanțele chimice de testat care nu sunt clasificate în ceea ce privește iritația oculară sau leziunea oculară gravă sunt definite ca fiind cele care nu îndeplinesc cerințele pentru încadrarea în categoria 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU, și anume, cele menționate ca nefiind încadrate într-o categorie din GHS al ONU sau din Regulamentul CLP.

2. Evaluarea leziunii oculare grave/iritației oculare a implicat, de regulă, utilizarea animalelor de laborator [MT B.5 (2)]. Alegerea celei mai adecvate metode de testare și utilizarea acestei metode de testare ar trebui să fie avută în vedere în contextul documentului de orientare al OCDE referitor la o strategie integrată privind testarea și evaluarea pentru leziunea oculară gravă și iritația oculară (39).

3. Prezenta metodă de testare descrie o procedură *in vitro* care permite identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care nu necesită clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP. Aceasta folosește epiteliu similar corneei umane (RhCE), care imită îndeaproape proprietățile histologice, morfologice, biochimice și fiziologice ale epiteliului cornean uman. Alte patru metode de testare *in vitro* au fost validate, considerate valabile din punct de vedere științific și adoptate ca fiind TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) și B.68 (6) pentru a aborda leziunea oculară gravă/iritația oculară ca punct final pentru sănătatea umană.

4. În această metodă de testare sunt incluse două teste validate care utilizează modele RhCE disponibile în comerț. Au fost efectuate studii de validare pentru evaluarea iritației oculare/leziunii oculare grave (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) utilizând testul EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) și testul SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Fiecare dintre aceste teste utilizează structuri de țesuturi RhCE disponibile în comerț ca sistem de testare, care sunt menționate în textul de mai jos ca fiind metodele de referință validate – VRM 1 și, respectiv, VRM 2. Ca urmare a acestor studii de validare și a evaluării inter pares independentă a acestora (9) (12), s-a ajuns la concluzia că EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT pot identifica în mod corect substanțe chimice (atât substanțe, cât și amestecuri) care nu necesită clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă, în conformitate cu GHS al ONU, iar testele au fost recomandate ca fiind valabile din punct de vedere științific în acest scop (13).

5. Este general acceptat în prezent faptul că, în viitorul apropiat, nicio metodă de testare *in vitro* nu va putea înlocui în totalitate testul *in vivo* pe ochi Draize (2) (14) pentru a estima întreaga gamă de răspunsuri privind leziunea oculară gravă/iritația oculară pentru diferite clase de substanțe chimice. Însă există combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unor strategii de testare (etapizate), precum abordarea ascendentă/descendentă, care ar putea înlocui pe deplin testul pe ochi Draize (15). Abordarea ascendentă (15) este concepută pentru a fi utilizată atunci când, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică nu provoacă o iritație oculară suficientă pentru a impune o clasificare, iar abordarea descendentă (15) este concepută pentru a fi utilizată atunci când, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică va provoca leziunea oculară gravă. Testele EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT sunt recomandate pentru a identifica substanțele chimice care nu impun clasificarea pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă conform GHS al ONU/Regulamentului CLP (neîncadrată într-o categorie) fără teste suplimentare, în cadrul unei strategii de testare precum abordarea ascendentă/descendentă sugerată de Scott *et al.*, de exemplu, ca o etapă inițială într-o abordare ascendentă sau ca una dintre

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

etapele finale dintr-o abordare descendentă (15). Însă, testele EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT nu sunt prevăzute a face diferența între categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (leziunea oculară gravă) și categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (iritația oculară). Această diferențiere va trebui să fie abordată la un alt nivel al unei strategii de testare (15). O substanță chimică de testat care este identificată ca necesitând o clasificare pentru iritația oculară/leziunea oculară gravă cu EpiOcular™ EIT sau SkinEthic™ HCE EIT va presupune astfel teste suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) pentru a ajunge la o concluzie definitivă (neîncadrarea într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP, încadrarea în categoria 2 sau 1), utilizând, de exemplu, MT B.47, B.48, B.61 sau B.68.

6. Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedura utilizată pentru a evalua potențialul de pericol pentru ochi al unei substanțe chimice de testat, pe baza capacității acesteia de a induce citotoxicitatea într-o structură de țesut RhCE, astfel cum este măsurat prin analiza MTT (16) (a se vedea punctul 21). Viabilitatea țesutului RhCE în urma expunerii la o substanță chimică de testat este determinată în comparație cu țesuturile tratate cu substanța martor negativă (viabilitate %) și este apoi utilizată pentru a prezice potențialul de pericol pentru ochi al substanței chimice de testat.

7. Standardele de performanță (17) sunt disponibile pentru a facilita validarea unor teste bazate pe RhCE *in vitro* noi sau modificate similare testelor EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT, în conformitate cu principiile din documentul de orientare nr. 34 al OCDE (18), și permit modificarea oportună a TG nr. 492 a OCDE privind includerea acestora. Acceptarea reciprocă a datelor (MAD) conform acordului OCDE va fi garantată doar pentru testele validate în conformitate cu standardele de performanță, în cazul în care respectivele teste au fost revizuite și incluse în orientarea OCDE privind testarea corespunzătoare.

DEFINIȚII

8. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

9. Această metodă de testare se bazează pe structuri de țesut comerciale tridimensionale RhCE care sunt produse utilizând fie cheratinocite epidermice primare umane (și anume, EpiOcular™ OCL-200), fie celule epiteliale corneene umane imortalizate (și anume, SkinEthic™ HCE/S). Structurile de țesut RhCE EpiOcular™ OCL-200 și SkinEthic™ HCE/S sunt similare structurii tridimensionale a epiteliului cornean *in vivo* și sunt produse cu ajutorul celulelor din specia de interes (19) (20). În plus, testele măsoară în mod direct citotoxicitatea care rezultă ca urmare a pătrunderii substanței chimice prin cornee și a producției de leziuni la nivelul celulelor și al țesuturilor; răspunsul citotoxic determină apoi rezultatul general de leziune oculară gravă/iritație oculară *in vivo*. Leziunile celulare se pot produce prin mai multe moduri de acțiune (a se vedea punctul 20), dar citotoxicitatea joacă un rol important, dacă nu rolul mecanic principal, în determinarea răspunsului general de leziune oculară gravă/iritație oculară al unei substanțe chimice, manifestându-se *in vivo* în principal prin opacitate corneană, inflamația irisului, înroșirea conjunctivei și/sau chemoza conjunctivei, indiferent de procesele fizico-chimice care determină lezarea tisulară.

10. O gamă largă de substanțe chimice, care acoperă o varietate amplă de tipuri de substanțe chimice, clase de substanțe chimice, mase moleculare, valori LogP, structuri chimice etc., au fost testate în cadrul studiului de validare care stă la baza acestei metode de testare. Baza de date de validare EpiOcular™ EIT a cuprins în total 113 substanțe chimice din 95 de grupe funcționale organice diferite conform unui set de instrumente de analiză QSAR al OCDE (8). Majoritatea acestor substanțe chimice au reprezentat substanțe monocomponente, însă în studiu au fost incluse, de asemenea, mai multe substanțe multicomponente (inclusiv 3 homopolimeri, 5 copolimeri și 10 cvasipolimeri). În ceea ce privește starea fizică și categoriile din GHS al ONU/Regulamentul CLP, cele 113 substanțe chimice testate au fost distribuite după cum urmează: 13 lichide în categoria 1, 15 substanțe solide în categoria 1, 6 lichide în categoria 2A, 10 substanțe solide în categoria 2A, 7 lichide în categoria 2B, 7 substanțe solide în categoria 2B, 27 de lichide fără clasificare și 28 de substanțe solide fără clasificare (8). Baza de date de validare SkinEthic™ HCE EIT a cuprins în total 200 de substanțe chimice din 165 de grupe funcționale organice diferite (8) (10) (11). Majoritatea acestor substanțe chimice au reprezentat substanțe monocomponente, însă în studiu au fost incluse, de asemenea, mai multe substanțe multicomponente (inclusiv 10 polimeri). În ceea ce privește starea fizică și categoriile din GHS al ONU/Regulamentul CLP, cele 200 substanțe chimice testate au fost distribuite după cum urmează: 27 de lichide în categoria 1, 24 de substanțe solide în categoria 1, 19 lichide în categoria 2A, 10 substanțe solide în categoria 2A, 9 lichide în categoria 2B, 8 substanțe solide în categoria 2B, 50 de lichide fără clasificare și 53 de substanțe solide fără clasificare (10) (11).

11. Această metodă de testare este aplicabilă substanțelor și amestecurilor, precum și substanțelor solide, substanțelor lichide, substanțelor semisolide și cerurilor. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. Gazele și aerosolii nu au fost evaluați în cadrul unui studiu de validare. Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhCE, actuala metodă de testare nu permite testarea produselor de acest tip.

12. Substanțele chimice de testat, care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT (în mod natural sau după tratament), și substanțele chimice de testat care pot să reducă direct colorantul MTT esențial (la formazan MTT) pot să interfereze cu măsurătorile de viabilitate tisulară și să necesite utilizarea unor martori adaptați pentru corecții. Tipul de martori adaptați care pot fi necesari vor varia în funcție de tipul de interferență produsă de substanța chimică de testat și de procedura utilizată pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctele 36-42).

13. Rezultatele generate în cadrul validării prealabile (21) (22) și al studiilor de validare complete (8) (10) (11) au demonstrat că atât EpiOcular™, EIT cât și SkinEthic™ HCE EIT sunt transferabile în laboratoarele considerate a avea puțină experiență în realizarea de analize și, de asemenea, sunt reproductibile în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare. Pe baza acestor studii, nivelul de reproductibilitate în ceea ce privește concordanța dintre predicțiile care pot fi așteptate în urma testului EpiOcular™ EIT pornind de la date privind 113 substanțe chimice este de ordinul a 95 % în cadrul laboratoarelor și de 93 % între laboratoare. Nivelul de reproductibilitate în ceea ce privește concordanța dintre predicțiile care pot fi așteptate în urma testului SkinEthic™ HCE EIT pornind de la date privind 120 de substanțe chimice este de ordinul a 92 % în cadrul laboratoarelor și de 95 % între laboratoare.

14. Testul EpiOcular™ EIT poate fi utilizat pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP. Având în vedere datele obținute în cadrul studiului de validare (8), EpiOcular™ EIT are o precizie totală de 80 % (pe baza a 112 substanțe chimice), o rată de sensibilitate de 96 % (pe baza a 57 de substanțe chimice), o rată de rezultate fals negative de 4 % (pe baza a 57 de substanțe chimice), o rată de specificitate de 63 % (pe baza a 55 de substanțe chimice) și o rată de rezultate fals pozitive de 37 % (pe baza a 55 de substanțe chimice), comparativ cu datele generate de testul *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14) conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP. Un studiu în care au fost testate 97 de formule agrochimice lichide au fost testate cu EpiOcular™ EIT a demonstrat o performanță similară a metodei de testare pentru acest tip de amestecuri, astfel cum a rezultat din studiul de validare (23). Cele 97 de formule au fost distribuite după cum urmează: 21 în categoria 1, 19 în categoria 2A, 14 în categoria 2B și 43 fără încadrare, clasificate conform sistemului de clasificare GHS al ONU pe baza testului *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14). S-a obținut o precizie generală de 82 % (pe baza a 97 de formule), o sensibilitate de 91 % (pe baza a 54 de formule), o rată de rezultate fals negative de 9 % (pe baza a 54 de formule), o rată de specificitate de 72 % (pe baza a 43 de formule) și o rată de rezultate fals pozitive de 28 % (pe baza a 43 de formule) (23).

15. Testul SkinEthic™ HCE EIT poate fi utilizat pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP. Având în vedere datele obținute în cadrul studiului de validare (10) (11), SkinEthic™ HCE EIT are o precizie totală de 84 % (pe baza a 200 de substanțe chimice), o rată de sensibilitate de 95 % (pe baza a 97 de substanțe chimice), o rată de rezultate fals negative de 5 % (pe baza a 97 de substanțe chimice), o rată de specificitate de 72 % (pe baza a 103 substanțe chimice) și o rată de rezultate fals pozitive de 28 % (pe baza a 103 de substanțe chimice), comparativ cu datele generate de testul *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14) conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP.

16. Ratele de rezultate fals negative obținute cu ambele teste RhCE, cu substanțe sau amestecuri de substanțe, se încadrează în rata generală de probabilitate de 12 % ca substanțele chimice să fie identificate fie ca substanțe încadrate în categoria 2 din GHS al ONU și CLP, fie ca substanțe neîncadrate în nicio categorie din GHS al ONU și CLP prin testul ocular Draize *in vivo* în cadrul unor teste repetate; acest lucru se datorează viabilității inerente a metodei în cadrul testului (24). Ratele de rezultate fals pozitive obținute cu ambele metode de testare RhCE, cu substanțe sau amestecuri, nu sunt esențiale în contextul acestei metode de testare, întrucât toate substanțele chimice de testat care determină o viabilitate celulară egală cu sau mai mică decât valorile-limită stabilite (a se vedea punctul 44) vor trebui să fie supuse altor teste efectuate cu alte metode de testare *in vitro* sau, ca o ultimă opțiune, pe iepuri, în funcție de cerințele de reglementare și aplicând o strategie de testare secvențială în cadrul unei metode bazate pe

dovezi. Aceste metode de testare pot fi utilizate pentru toate tipurile de substanțe chimice, iar un rezultat negativ al acestora ar trebui să fie acceptat pentru neclasificarea unei substanțe chimice pentru iritația oculară și leziunea oculară gravă (fără încadrare în GHS al ONU și Regulamentul CLP). Ar trebui să se consulte autoritățile de reglementare competente înainte de utilizarea EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT în cadrul altor scheme de clasificare decât GHS al ONU/Regulamentul CLP.

17. O limitare a acestei metode de testare este faptul că nu permite diferențierea între efectele iritante pentru ochi/reversibile asupra ochilor (categoria 2) și efectele de lezare oculară gravă/ireversibile asupra ochilor (categoria 1), astfel cum sunt definite în GHS al ONU și Regulamentul CLP, nici între substanțele iritante pentru ochi (categoria 2A opțională) și substanțele ușor iritante pentru ochi (categoria 2B opțională), astfel cum sunt definite în GHS al ONU (1). În acest sens, sunt necesare teste suplimentare cu alte metode de testare *in vitro*.

18. Termenul „substanță chimică de testat" este utilizat în prezenta metodă de testare pentru a face referire la ceea ce este supus testării ([2]) și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare RhCE pentru testarea substanțelor și/sau a amestecurilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

19. Substanța chimică de testat se aplică local pe o suprafață minimă a două structuri de țesut RhCE tridimensionale și se măsoară viabilitatea țesutului în urma expunerii și după o perioadă de incubare post-tratament. Țesuturile RhCE sunt reconstituite din cheratinocite de epidermă umană primare sau din celule epiteliale corneene umane imortalizate care au fost cultivate timp de mai multe zile pentru a forma un epiteliu scuamos stratificat și foarte diferențiat, având o morfologie similară celui din corneea umană. Structura de țesut EpiOcular™ RhCE este formată din cel puțin trei straturi viabile de celule și o suprafață necheratinizată, care prezintă o structură similară corneei, analogă celei identificate *in vivo*. Structura de țesut SkinEthic™ HCE RhCE este formată din cel puțin patru straturi viabile de celule, incluzând celule columnare bazale, celule tranziționale poliedrice și celule superficiale scuamoase, similară celei de țesut epitelial cornean uman normal (20) (26).

20. Iritația oculară gravă/iritația oculară indusă de o substanță chimică, manifestată *in vivo* în principal prin opacitate corneană, inflamația irisului, înroșirea conjunctivei și/sau chemoza conjunctivei, este rezultatul unei cascade de evenimente care încep cu pătrunderea substanței chimice prin cornee și/sau conjunctivă și producerea de leziuni la nivelul celulelor. Leziunea celulelor se poate produce prin mai multe moduri de acțiune, inclusiv: lizarea membranelor celulare (de exemplu, prin surfactanți, solvenți organici); coagularea macromoleculelor (în special a proteinelor) (de exemplu, prin surfactanți, solvenți organici, alcali și acizi); saponificarea lipidelor (de exemplu, prin alcali); și alchilarea sau alte interacțiuni covalente cu macromolecule (de exemplu, prin înălbitori, peroxizi și agenți de alchilare) (15) (27) (28). Însă, s-a demonstrat că citotoxicitatea joacă un rol important, dacă nu rolul mecanicist principal, în determinarea răspunsului general de leziune oculară gravă/iritație oculară al unei substanțe chimice, indiferent de caracteristicile fizico-chimice care stau la baza lezării țesuturilor (29) (30). Mai mult, potențialul de leziune oculară gravă/iritație oculară al unei substanțe chimice este determinat în principal de gravitatea leziunii inițiale (31), care este corelată cu gradul de moarte a celulelor (29) și cu amploarea răspunsurilor ulterioare și a eventualelor rezultate (32). Astfel, substanțele ușor iritante afectează, în general, doar epiteliul cornean superficial, substanțele ușor și moderat iritante afectează în principal epiteliul și stroma superficială, iar substanțele grav iritante deteriorează epiteliul, pătrund adânc în stromă și, uneori, în endoteliul cornean (30) (33). Măsurarea viabilității structurii țesutului RhCE după expunere topică la o substanță chimică de testat pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru leziune oculară gravă/iritație oculară (fără încadrare în GHS al ONU și Regulamentul CLP) se bazează pe ipoteza că toate substanțele chimice care provoacă leziunea oculară gravă sau iritația oculară vor induce citotoxicitate în epiteliul cornean și/sau în conjunctivă.

([2]) În iunie 2013, reuniunea comună a OCDE a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată acum o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat" care descrie ceea ce este testat în orientările OCDE noi și actualizate privind testele.

21. Viabilitatea tisulară RhCE se măsoară, de regulă, prin conversia enzimatică a colorantului esențial MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu; bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil; număr CAS 298-93-1], prin celulele viabile ale țesutului, într-o sare de formazan MTT de culoare albastră care este măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (16). Substanțele chimice care nu necesită clasificare și etichetare în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP (neclasificate) sunt identificate ca fiind acelea care nu reduc viabilitatea tisulară sub un prag definit [și anume, viabilitate tisulară > 60 %, la EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EITL ([3]) sau > 50 %, la SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (a se vedea alineatul 44).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

22. Înainte de utilizarea sistematică a testelor RhCE în scopuri de reglementare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin estimarea corectă a celor cincisprezece substanțe chimice de verificare enumerate în tabelul 1. Aceste substanțe chimice au fost selectate dintre cele utilizate în studiile de validare a VRM (8) (10) (11). Selecția include, în măsura posibilității, substanțe chimice care: (i) prezintă diferite stări fizice; (ii) acoperă întreaga gamă de răspunsuri de leziune oculară gravă/iritație oculară *in vivo* pe baza rezultatelor de înaltă calitate obținute prin testul *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14), precum și a sistemului de clasificare GHS al ONU (și anume, categoriile 1, 2A, 2B sau fără clasificare) (1) și a sistemului de clasificare CLP (și anume, categoriile 1, 2 sau fără clasificare); (iii) se referă la diferiții factori determinanți de clasificare *in vivo* (24) (25); (iv) sunt reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în studiul de validare (8) (10) (11); (V) prezintă o rată de reprezentare bună și la nivel amplu a grupurilor funcționale ecologice (8) (10) (11); (vi) prezintă structuri chimice bine definite (8) (10) (11); (vii) sunt colorate și/sau reductori direcți ai MTT; (viii) au produs rezultate reproductibile în cadrul metodelor de testare RhCE în cursul validărilor lor; (ix) au fost corect estimate prin metodele de testare RhCE în timpul studiilor de validare a acestora; (x) acoperă întreaga gamă de răspunsuri *in vitro* pe baza datelor de înaltă calitate generate prin metodele de testare RhCE (viabilitate între 0 și 100 %); (xi) sunt disponibile în comerț; și (xii) nu sunt asociate cu costuri de achiziție și/sau eliminare prohibitive. În situațiile în care o substanță chimică menționată în listă nu este disponibilă sau nu poate fi utilizată din alte motive întemeiate, ar putea fi utilizată o altă substanță chimică care îndeplinește criteriile descrise mai sus, de exemplu, dintre substanțele chimice utilizate în procesul de validare a VRM. Însă astfel de abateri ar trebui să fie justificate.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare

Denumire chimică	NR CAS	Grup organic funcțional ([1])	Stare fizică	Viabilitate VRM1 (%) ([1])	Viabilitate VRM2 (%) ([2]) Predicția VRM	Reductor MTT	Interf. culorii	Categoria 1 *in vivo* ([3])
metil tioglicolat								
2365-48-2	ester acid carboxilic; tioalcool	L	10,9 - ± 6,4	5,5 ± 7,4	Nu se poate estima	Y (puternic)	N	acrilat de hidroxietil
818-61-1	acrilat;	alcool	L	7,5 ± 4,7 ([4])	1,6 ± 1,0	Nu se poate estima	N	N
2,5-dimetil-2,5-hexanediol	110-03-2	alcool	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Nu se poate estima	N	N
oxalat de sodiu	62-76-0	acid oxocarboxilic	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Nu se poate estima	N	N
Categoria 2A in vivo ([3])								
2,4,11,13-tetraazatetradecan-diimidamidă, N,N″-bis(4-clorofenil)-3,12-diimino-, di-D-gluconat (20 %, soluție apoasă) ([5])	18472-51-0	halidă aromatică heterocilică; aril halidă; grup dihidroxil; guanidină	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Nu se poate estima	N	Y (slab)

([3]) EITL: EIT pentru substanțe lichide în cazul SkinEthic™ HCE
([4]) EITS: EIT pentru substanțe solide în cazul SkinEthic™ HCE

Denumire chimică	NR CAS	Grup organic funcțional (1)	Stare fizică	Viabilitate VRM1 (%) (1)	Viabilitate VRM2 (%) (2) Predicția VRM	Reductor MTT	Interf. culorii	Categoria 1 *in vivo* (3)
benzoat de sodiu	532-32-1	aril; acid carboxilic	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Nu se poate estima	N	N
Categoria* 2B *in vivo (3)								
dietiltoluamid	134-62-3	benzamidă	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Nu se poate estima	N	N
2,2-dimetil-3-metilenbiciclo [2.2.1]heptan	79-92-5	alcan, ramificat cu carbon terțiar; alchenă; biciclo-heptan; carbocicluri cu structură inelară; cicloalcan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Nu se poate estima	N	N
Fără clasificare *in vivo* (3)								
1-etil-3-sulfat de etil metilimida-zoliu	342573-75-5	alcoxi; sare de amoniu; aril; imidazol; sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Neclasificat	N	N
dicaprilil eter	629-82-3	alcoxi; Eter	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Neclasificat	N	N
piperonil butoxid	51-03-6	alcoxi; benzodioxol; benzil; Eter	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Neclasificat	N	N
ulei de ricin hidrogenat polietilen glicol (PEG-40)	61788-85-0	acilal; Alcool; alil; Eter	Vâsco-asă	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Neclasificat	N	N
1-(4-clorfenil)-3-(3,4-diclorfenil) uree	101-20-2	halidă aromatică heterocilică; aril halidă; derivați din uree	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6-,6	Neclasificat	N	N
2,2′-metilen-bis(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbu-til)fenol)	103597-45-1	alcan ramificat cu carbon terțiar; carbo-cicluri aromatice fuzionate; hetero-cicluri saturate fuzionate; compuși precursori ai chinoi-dului; terț-butil	S	102,7 ± 13-,4	97,7 ± 5,6	Neclasificat	N	N

Denumire chimică	NR CAS	Grup organic funcțional (1)	Stare fizică	Viabilitate VRM1 (%) (1)	Viabilitate VRM2 (%) (2) Predicția VRM	Reductor MTT	Interf. culorii	Categoria 1 *in vivo* (3)
tetrafluorborat de potasiu	14075-53-7	sare anorganică	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Neclasificat	N	N

Abrevieri:

Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; GHS al ONU = Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (1); VRM1 = metodă de referință validată, EpiOcular™ EIT; VRM2 = metodă de referință validată, SkinEthic™ HCE EIT; Interf. culorii = interferența culorii cu absorbanța standard [măsurarea densității optice (OD)] a formazanului MTT.

(1) Grup organic funcțional încadrat conform unei analize a OCDE introduse în Toolbox 3.1 (8).

(1) Pe baza rezultatelor obținute cu testul EpiOcular™ EIT în cadrul EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

(2) Pe baza rezultatelor obținute cu testul SkinEthic™ HCE EIT în cadrul studiului de validare (10) (11).

(3) Pe baza rezultatelor obținute cu testul *in vivo* pe ochi de iepure (MT B.5/OCDE TG nr. 405) (2)(14) și utilizând sistemul GHS al ONU.

(4) Pe baza rezultatelor obținute în cadrul CEFIC CONsortium pentru studiul privind strategia de testare *in vitro* pentru iritația oculară (CON4EI).

(5) Încadrarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU pentru distingerea între cele două categorii, și anume, 1 din 3 față de 2 din 3 animale, cu efecte în ziua 7, necesar pentru a se realiza o încadrare în categoria 2A. Studiul *in vivo* a inclus trei animale. Toate punctele finale studiate, cu excepția opacității corneene la un singur animal, s-au recuperat la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat pe deplin în ziua 7 a avut un punctaj de opacitate corneană de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat integral în ziua 9.

23. În cadrul verificării performanței, se recomandă ca utilizatorii să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire, astfel cum sunt specificate de către producătorul structurii de țesut RhCE (a se vedea punctele 25, 27 și 30). Acest lucru este deosebit de important în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade îndelungate de timp. Odată ce s-a stabilit cu succes un test, iar performanța acestuia în utilizare a fost asigurată și demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în mod sistematic un test, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

PROCEDURA

24. Testele care sunt vizate în prezent de această metodă de testare sunt cele valabile din punct de vedere științific, EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), denumită în continuare metoda de referință validată (VRM1 și, respectiv, VRM2). Sunt disponibile proceduri standard de operare (PSO) pentru metodele de testare RhCE, care ar trebui să fie utilizate la punerea în aplicare și utilizarea metodelor de testare într-un laborator (34) (35). Punctele următoare și apendicele 2 descriu componentele și procedurile principale ale testelor RhCE.

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE RHCE

Condiții generale

25. Ar trebui să se utilizeze celule umane relevante pentru a reconstitui țesutul epitelial tridimensional, similar corneei, care ar trebui să fie compus din celule treptat stratificate, dar nu cornificate. Structura de țesut RhCE se prepară în inserții, cu o membrană sintetică poroasă, prin care nutrienții pot trece în celule. În epiteliul reconstruit similar corneei ar trebui să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile necheratinizate. Structura de țesut RhCE ar trebui să aibă suprafața epitelială în contact direct cu aerul, astfel încât să permită expunerea locală directă a substanțelor chimice de testat într-un mod similar modului în care ar fi expus epiteliul corneean *in vivo*. Structura țesutului RhCE ar trebui să formeze o barieră funcțională suficient de robustă pentru a rezista la pătrunderea rapidă a substanțelor de referință citotoxice, de exemplu, e.g. Triton X-100 sau dodecilsulfat de sodiu (SDS). Funcția de barieră ar trebui să fie demonstrată și poate fi evaluată prin determinarea timpului de expunere necesar pentru a reduce viabilitatea tisulară cu 50 % (ET_{50}) la aplicarea unei substanțe de referință la o concentrație specifică fixă (de exemplu, 100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100) sau la o concentrație la care o substanță de referință reduce viabilitatea tisulară cu 50 % (IC_{50}) în urma unui timp de expunere fix (de exemplu, un tratament de 30 de minute cu 50 µl SDS) (a se vedea punctul 30). Proprietățile de etanșeitate ale structurii de țesut RhCE ar trebui să prevină trecerea substanței chimice de testat peste marginea țesutului viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelare a expunerii corneene. Celulele umane utilizate pentru a stabili structura țesutului RhCE nu ar trebui să fie contaminate cu bacterii, virusuri, micoplasmă și fungi. Sterilitatea structurii țesutului ar trebui să fie verificată de furnizor pentru absența contaminării cu fungi și bacterii.

Condiții funcționale

Viabilitate

26. Analiza utilizată pentru cuantificarea viabilității tisulare este analiza MTT (16). Celulele viabile ale structurii țesutului RhCE reduc colorantul vital MTT într-un precipitat de formazan MTT de culoare albastră, care este apoi extras din țesut utilizând izopropanol (sau un solvent similar). Formazanul MTT extras poate fi cuantificat folosind fie o măsurare standard a absorbanței [densitatea optică - DO], fie o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (36). DO a solventului de extracție trebuie să fie suficient de mică, și anume DO < 0,1. Utilizatorii structurii țesutului RhCE

ar trebui să se asigure de faptul că fiecare lot de structură de țesut RhCE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă. Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ pentru VRM sunt date în tabelul 2. Un utilizator al spectrofotometriei HPLC/UPLC ar trebui să utilizeze intervalele DO ale martorului negativ din tabelul 2 ca și criteriu de acceptare pentru martorul negativ. Ar trebui documentat în raportul testului faptul că țesuturile tratate cu substanța martor negativă sunt stabile în cultură (prezintă măsurători ale viabilității tisulare similare) în perioada de expunere prin testare. O procedură similară ar trebui urmată de către producătorul țesuturilor în cadrul procedurii de eliberare a loturilor de țesuturi cu asigurarea controlului calității, dar, în acest caz, pot fi aplicate criterii de acceptare diferite de cele specificate în tabelul 2. Producătorul/furnizorul structurii de țesut RhCE ar trebui să stabilească un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru valorile DO ale martorului negativ (în condițiile metodei de testare pentru controlul calității).

Tabelul 2

Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ (pentru utilizatorii testului)

Test	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (pentru protocoale privind substanțe lichide și solide)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (pentru protocoale privind substanțe lichide și solide)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Această limită de acceptabilitate are în vedere posibilitatea unui timp de livrare/păstrare prelungit (de exemplu, > 4 zile), fiind dovedit faptul că aceasta nu influențează performanța metodei de testare (37).

Funcția de barieră

27. Structura de țesut RhCE ar trebui să fie suficient de groasă și solidă pentru a rezista la pătrunderea rapidă a substanțelor de referință citotoxice, astfel cum este estimat, de exemplu, prin ET_{50} (Triton X-100) sau IC_{50} (SDS) (tabelul 3). Funcția de barieră a fiecărui lot de structură de țesut RhCE utilizat ar trebui să fie demonstrată de către producătorul/furnizorul structurii de țesut RhCE la momentul livrării țesuturilor la utilizatorul final (a se vedea punctul 30).

Morfologie

28. Examinarea histologică a structurii de țesut RhCE ar trebui să demonstreze faptul că aceasta este o structură de epiteliu similară corneei umane (incluzând cel puțin trei straturi de celule epiteliale viabile și o suprafață necheratinizată). Pentru VRM, morfologia corespunzătoare a fost stabilită de către producător/furnizor și, prin urmare, nu este necesar să fie demonstrată din nou de către un utilizator al metodei de testare pentru fiecare lot de țesuturi utilizat.

Reproductibilitate

29. Rezultatele martorilor pozitivi și negativi ai metodei de testare ar trebui să demonstreze reproductibilitatea în timp.

Controlul calității (CC)

30. Structura de țesut RhCE ar trebui să fie utilizată doar dacă producătorul/furnizorul demonstrează că fiecare lot de structură de țesut RhCE îndeplinește criteriile definite pentru introducere în procesul de fabricație, printre care cele mai relevante sunt criteriile privind viabilitatea (punctul 26) și funcția de barieră (punctul 27). Producătorul/furnizorul structurii de țesut ar trebui să se stabilească un interval de acceptabilitate (limite superioare și inferioare) pentru funcțiile de barieră, astfel cum este măsurat prin ET_{50} sau IC_{50} (a se vedea punctele 25 și 26). Intervalul de acceptabilitate ET_{50} și IC_{50} utilizat ca și criteriu de eliberare a lotului cu asigurarea CC de către producătorul/furnizorul structurilor de țesut RhCE (utilizate în VRM) este prezentat în tabelul 3. Datele care demonstrează conformitatea cu toate criteriile de eliberare din producție ar trebui furnizate de către producătorul/furnizorul structurii de țesut RhCE utilizatorilor metodei de testare, pentru ca aceștia să poată include aceste informații în raportul testului. Numai rezultatele obținute pentru țesuturi care îndeplinesc toate aceste criterii de eliberare din producție pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a substanțelor chimice care nu necesită clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP.

Tabelul 3

Criteriu de eliberare a lotului cu asigurarea CC

Test	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (un tratament de 30 de minute cu 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

31. Ar trebui să fie utilizate cel puțin două replicate de țesuturi pentru fiecare substanță chimică de testat și fiecare substanță martor din cadrul fiecărui test. Sunt utilizate două protocoale de tratament diferite, unul pentru substanțe chimice de testat lichide și unul pentru substanțe chimice de testat solide (34) (35). Pentru ambele metode și protocoale, suprafața structurii de țesut ar trebui să fie umezită cu soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco, fără calciu și fără magneziu, (DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}) înainte de aplicarea substanțelor chimice de testat, pentru a reproduce condițiile de umiditate a ochiului uman. Tratamentul aplicat țesuturilor este inițiat cu expunerea la substanța (substanțele) chimică (chimice) de testat și la substanțele martor. În cazul ambelor protocoale de tratament din ambele VRM, ar trebui să se aplice o cantitate suficientă de substanță chimică de testat sau martor pentru a acoperi uniform suprafața epitelială, evitându-se în același timp aplicarea unei doze infinite (a se vedea punctele 32 și 33) (apendicele 2).

32. Substanțele chimice de testat care pot fi introduse cu pipeta la 37 °C sau la temperaturi mai scăzute (folosind o pipetă cu piston, dacă este necesar) sunt tratate ca substanțe lichide în VRM; în caz contrar, acestea ar trebui să fie tratate ca substanțe solide (a se vedea punctul 33). În VRM, substanța chimică de testat lichidă este distribuită uniform pe suprafața țesutului (adică o aplicare minimă de 60 µl/cm^2) [a se vedea apendicele 2, (33) (34)]. Efectele capilare (efectele de tensiune la suprafață) care pot apărea din cauza volumelor mici aplicate pe locul de inserție (pe suprafața țesutului) ar trebui evitate în măsura în care este posibil pentru a garanta dozarea corectă a țesutului. Țesuturile tratate cu substanțe chimice de testat lichide se incubează timp de 30 de minute în condiții standard de cultură (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat lichidă și substanțele martor r trebui să se elimine cu grijă de pe suprafața țesutului prin spălare intensă cu DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} la temperatura camerei. Această etapă de spălare este urmată de o imersie după expunere în mediu proaspăt, la temperatura camerei (pentru a îndepărta orice substanță chimică de testat absorbită în țesut) pentru o perioadă predefinită de timp care variază în funcție de VRM utilizată. Numai în cazul VMR1 se aplică o incubare post-expunere în mediu proaspăt în condiții standard de cultură înainte de efectuarea analizei MTT [a se vedea apendicele 2, punctele (34) și (35)].

33. Substanțele chimice de testat care nu pot fi introduse cu pipeta la temperaturi de până la 37 °C sunt tratate ca substanțe solide în cadrul VRM. Cantitatea de substanță chimică de testat aplicată ar trebui să fie suficientă pentru a acoperi întreaga suprafață a țesutului, adică ar trebui să se utilizeze o aplicare de minim 60 mg/cm^2 (apendicele 2). În măsura în care este posibil, substanțele solide ar trebui să fie testate sub formă de pulbere fină. Țesuturile tratate cu substanțe chimice de testat solide sunt incubate pentru o perioadă predefinită de timp (în funcție de VRM utilizată) în condiții standard de cultură [a se vedea apendicele 2, (34) (35)]. La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat solidă și substanțele martor r trebui să se elimine cu grijă de pe suprafața țesutului prin spălare intensă cu DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} la temperatura camerei. Această etapă de spălare este urmată de o imersie după expunere în mediu proaspăt, la temperatura camerei (pentru a îndepărta orice substanță chimică de testat absorbită în țesut) pentru o perioadă predefinită de timp care variază în funcție de VRM utilizată, precum și de o incubație post-expunere în mediu proaspăt în condiții de cultură standard înainte de efectuarea analizei MTT [a se vedea apendicele 2, (34) (35)].

34. În fiecare etapă ar trebui să se includă martori negativi și pozitivi testați în paralel, pentru a demonstra că viabilitatea (determinată cu martorul negativ) și sensibilitatea (determinată prin martorul pozitiv) țesuturilor se situează în intervalele de acceptabilitate definite pe baza datelor istorice. Martorul negativ testat în paralel oferă, de asemenea, valoarea de referință (viabilitate tisulară de 100 %) pentru calcularea viabilității procentuale relative a țesuturilor tratate cu substanța chimică de testat (% $viabilitate_{test}$). Substanța martor pozitivă recomandată a fi utilizată cu metodele VRM este acetat de metil pur (nr. CAS 79-20-9, disponibil în comerț, de exemplu, de la Sigma-Aldrich, categ. nr. 45997; lichid). Substanțele martor negative recomandate pentru a fi utilizate împreună cu VRM1 și VRM2 sunt DPBS fără H_2O și fără Ca^{2+}/Mg^{2+} ultrapure. Acestea au fost substanțele de control utilizate în studiile de validare a metodelor VRM și sunt cele pentru care există cele mai multe date istorice. Utilizarea unor substanțe martor pozitive sau negative alternative adecvate ar trebui să fie justificată din punct de vedere științific și în mod adecvat. Martorii negativi și pozitivi ar trebui să fie testați cu același protocol/aceleași protocoale ca și cel(e) utilizat(e) pentru substanțele chimice de testat incluse în testare (și anume, pentru lichide și/sau solide). Această aplicare ar trebui să fie urmată de expunerea la tratament, spălare, o imersie post-expunere și o incubare post-expunere, după caz, astfel cum este descris în cazul substanțelor martor testate în paralel cu substanțele chimice de testat lichide (a se vedea punctul 32) sau, în cazul martorilor testați în paralel cu substanțele chimice de testat solide (a se vedea punctul 33), înainte de analiza MTT (a se vedea punctul 35) (34) (35). Un set unic de martori negativi și pozitivi este suficient pentru toate substanțele chimice de testat care au aceeași stare fizică (lichide sau solide) incluse în aceeași testare.

Măsurarea viabilității tisulare

35. Testul MTT este o metodă cantitativă standardizată care ar trebui să fie utilizată pentru măsurarea viabilității tisulare în cadrul prezentei metode de testare. Acesta este compatibil cu o arhitectură tridimensională a țesutului. Analiza MTT este efectuată imediat după perioada de incubație post-expunere. În VRM, proba de structură de țesut RhCE este introdusă în soluție de 0,3 ml de MTT la 1 mg/ml timp de 180 ± 15 minute în condiții standard de cultură. Colorantul esențial MTT este redus într-un precipitat de formazan albastru prin celulele viabile ale structurii de țesut RhCE. Produsul precipitat de formazan albastru MTT este apoi extras din țesut utilizând un volum corespunzător de izopropanol (sau solvent similar) (34) (35). Țesuturile testate cu substanțe chimice de testat lichide ar trebui să fie extrase atât din partea superioară, cât și din partea inferioară a țesuturilor, în timp ce țesuturile testate cu substanțe chimice de testat solide și lichide colorate ar trebui să fie extrase numai din partea inferioară a țesutului (pentru a reduce la minimum orice posibilă contaminare a soluției de extracție izopropanol cu orice substanță chimică de testat care ar fi putut rămâne pe țesut). Țesuturile testate cu substanțe chimice de testat lichide care nu sunt spălate imediat pot fi extrase numai din partea inferioară a țesutului. Substanțele martor negative pozitive testate în paralel ar trebui să fie tratate în același mod ca și substanța chimică testată. Formazanul MTT extras poate fi cuantificat fie printr-o măsurare a absorbanței standard (DO) la 570 nm, cu ajutorul unei filtru de tip band pass de maximum ± 30 nm, fie utilizând o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (a se vedea punctul 42) (11) (36).

36. Proprietățile optice ale substanței chimice de testat sau acțiunea sa chimică asupra MTT pot interfera cu măsurarea formazanului MTT, conducând la o estimare falsă a viabilității tisulare. Substanțele chimice de testat pot influența măsurarea formazanului MTT prin reducere directă a MTT în formazan albastru și/sau prin interferența culorii în cazul în care substanța chimică de testat absoarbe, în mod natural sau datorită procedurilor de tratament, în aceleași limite DO ca și pentru formazan MTT (și anume, 570 nm). Ar trebui să se efectueze verificări prealabile, înainte de testare, pentru a permite identificarea unor potențiali reductori direcți MTT și/sau a substanțelor chimice care influențează culoarea și ar trebui utilizați martori suplimentari pentru a detecta și a corecta posibilele interferențe din aceste acestor substanțe chimice de testat (a se vedea punctele 37-41). Acest lucru este deosebit de important atunci când o anumită substanță chimică de testat nu este îndepărtată complet din țesut prin spălare sau atunci când aceasta pătrunde în epiteliul similar corneei și, prin urmare, există în structurile de țesut RhCE atunci când este efectuată analiza MTT. În cazul substanțelor chimice de testat care absorb lumina în aceeași gamă ca și formazanul MTT (pe cale naturală sau după tratare), care nu sunt compatibile cu măsurarea absorbanței standard (DO) a formazanului MTT ca urmare a unei interferențe prea puternice, adică o absorbție puternică la 570 ± 30 nm, poate fi utilizată o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC pentru măsurarea formazanului MTT (a se vedea punctele 41 și 42) (11) (36). O descriere detaliată a modului în care poate fi detectată și corectată direct reducerea MTT și interferențele cu ajutorul agenților de colorare este disponibilă în PSO ale VRM (34) (35) (36) (37). De asemenea, în apendicele III și IV sunt prezentate grafice de flux ilustrative care oferă indicații cu privire la modul de identificare și tratare a reductorilor MTT direcți și/sau a substanțelor chimice care influențează culoarea în cazul VRM1 și VRM2.

37. Pentru a identifica o posibilă interferență din partea substanțelor chimice de testat care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT (în mod natural sau după tratament) și a decide cu privire la necesitatea unor martori suplimentari, substanța chimică de testat se adaugă în apă și/sau izopropanol și se lasă la incubat pentru un timp adecvat la temperatura camerei (a se vedea apendicele 2) (34) (35). În cazul în care substanța chimică de testat din apă și/sau izopropanol absoarbe lumină suficientă în intervalul 570 ± 20 nm în cazul VRM1 (a se vedea apendicele 3) sau dacă se obține o soluție colorată atunci când se amestecă substanța chimică de testat cu apă în cazul VRM2 (a se vedea apendicele 4), se presupune că substanța chimică de testat interferează cu măsurarea absorbanței standard (DO) a formazanului MTT și ar trebui să se obțină martori suplimentari de coloranți sau, în mod alternativ, să se utilizeze o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC, caz în care nu sunt necesari acești martori (a se vedea punctele 41 și 42 și apendicele III și IV) (34) (35). La măsurarea absorbanței standard (DO), fiecare substanță chimică de testat care interferează ar trebui să fie aplicată pe cel puțin două replicate de țesut viabile, acestea fiind supuse întregii proceduri de testare, dar sunt incubate într-un mediu în locul soluției MTT în etapa de incubare a MTT pentru a genera un martor de o culoare nespecifică (NSC_{living}) (34) (35). Testul pentru martorul NSC_{living} trebuie efectuat concomitent cu testul substanței chimice de testat colorate și, în cazul testării multiple, trebuie efectuat un test pentru un martor independent NSC_{living} la fiecare test efectuat (în cadrul fiecărei secvențe de testare), din cauza variabilității biologice inerente a țesuturilor vii. Viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în soluția cu MTT (% $viabilitate_{test}$), minus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, testul fiind efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{living}), și anume, viabilitate tisulară reală = [% $Viability_{test}$] - [% NSC_{living}].

38. Pentru identificarea reductorilor direcți ai MTT, ar trebui să se adauge fiecare substanță chimică de testat la o soluție de MTT proaspăt preparată. O cantitate adecvată de substanță chimică de testat se adaugă la o soluție de MTT, iar amestecul este incubat timp de aproximativ 3 ore în condiții standard de cultură (a se vedea apendicele III și IV) (34) (35). Dacă amestecul cu MTT care conține substanța chimică de testat (sau suspensia pentru substanțe chimice insolubile) devine albastru/violet, se presupune că substanța chimică de testat reduce direct MTT și ar trebui să se efectueze o verificare funcțională suplimentară a structurilor de țesut RhCE neviabile, independent de utilizarea măsurării standard a absorbanței (DO) sau a unei proceduri HPLC/UPLC de spectrofotometrie. Această verificare funcțională suplimentară utilizează țesuturi moarte care au doar o activitate metabolică reziduală, dar care absorb și rețin substanța chimică de testat în mod similar țesuturilor viabile. Țesuturile ucise în cadrul VRM1 sunt preparate prin expunere la temperaturi scăzute (ucise prin congelare). Țesuturile ucise în cadrul VRM2 sunt preparate prin incubare prelungită (de exemplu, de cel puțin 24 ± 1 ore) în apă, urmată de o depozitare la temperatură joasă (ucise cu apă). Fiecare substanță chimică de testat care reduce MTT se aplică pe cel puțin două țesuturi moarte duplicate care sunt supuse întregii proceduri de testare pentru a genera un martor de reducere nespecifică a MTT (NSMTT) (34) (35). Un singur martor NSMTT este suficient pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste/serii de teste independente efectuate. Viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: viabilitatea tisulară procentuală obținută pe țesuturi vii expuse la reductorul MTT (% $viabilitate_{test}$) minus procentul de reducere a MTT nespecific obținut pe țesuturi moarte expuse la același reductor MTT, calculat în raport cu efectuarea testului pe martorul negativ, concomitent cu testul corectat (% NSMTT), și anume, viabilitate tisulară reală = [% $viabilitate_{test}$] - [% NSMTT].

39. Substanțele chimice de testat care sunt identificate ca producând atât interferența culorii (a se vedea punctul 37), cât și reducerea directă a MTT (a se vedea punctul 38) vor necesita, de asemenea, un al treilea set de martori atunci când se efectuează măsurarea absorbanței standard (DO), în afară de martorii NSMTT și NSC_{living} descriși la punctele anterioare. Acest lucru este valabil, de obicei, în cazul substanțelor chimice de testat care absorb lumina în intervalul 570±30 nm (de exemplu, de culoare albastră, violet, neagră), deoarece culoarea lor intrinsecă împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce direct MTT, conform descrierii de la punctul 38. Acest lucru forțează utilizarea de martori NSMTT, în mod implicit, împreună cu martori NSC_{living}. Substanțele chimice de testat pentru care se produc atât martori NSMTT, cât și NSC_{living}, pot fi absorbite și reținute atât de țesuturile vii, cât și de cele moarte. Prin urmare, în acest caz, martorul NSMTT se poate corecta nu doar pentru o posibilă reducere directă a MTT prin substanța chimică de testat, ci și pentru interferența culorii ca urmare a aderării și reținerii substanței chimice de testat în țesuturile moarte. Aceasta ar putea conduce la o dublă corecție pentru interferența culorii, întrucât martorul NSC_{living} corectează deja interferența culorii determinată de absorbția și reținerea substanței chimice de testat în țesuturile vii. Pentru a evita o posibilă corecție dublă pentru interferența culorii, ar trebui efectuat un test pentru un al treilea martor de culoare nespecifică la țesuturi

moarte (NSC_{killed}) (a se vedea apendicele III și IV) (34) (35). La acest martor suplimentar, substanța chimică de testat se aplică pe cel puțin două țesuturi duplicate moarte, care sunt supuse întregii proceduri de testare, dar se incubează în mediu în loc de MTT în etapa de incubare MTT. O singură verificare pentru martorul NSC_{killed} este suficientă pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste independente, dar ar trebui să fie efectuată concomitent cu verificarea pentru martorul NSMTT și pe același lot de țesuturi. Viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat (% $viabilitate_{test}$) % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi moarte expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, cu calculare raportat la testul pentru martor negativ efectuat în paralel cu testul supus corectării (% NSC_{killed}), adică, viabilitate tisulară reală = [% $viabilitate_{test}$] - [% NSMTT] - [% NSC_{living}] + [% NSC_{killed}].

40. Este important de remarcat faptul că reducerea MTT nespecifică și interferențele culorilor nespecifice pot crește densitatea optică (atunci când se efectuează măsurători ale absorbanței standard) a extractului de țesut peste intervalul de liniaritate a spectrofotometrului și că reducerea MTT nespecifică poate să crească, de asemenea, valoarea de vârf a formazanului MTT (atunci când sunt efectuate măsurători prin spectrometrie HPLC/UPLC) la extractul de țesut peste intervalul de liniaritate al spectrofotometrului. Pe această bază, este important ca fiecare laborator să stabilească DO/intervalul de liniaritate pentru valoarea de vârf al spectrofotometrului lor, de exemplu, cu formazan MTT (CAS nr. 57360-69-7), disponibil în comerț, de exemplu, de la Sigma-Aldrich (categ. nr. M2003) înainte de a începe testarea substanțelor chimice de testat în scopuri de reglementare.

41. Măsurarea absorbanței standard (DO) cu ajutorul unui spectrofotometru este adecvată pentru evaluarea reductorilor MTT direcți și a substanțelor chimice de testat care influențează culoarea, în cazul în care interferența constatată la măsurarea formazanului MTT nu este prea puternică (și anume, valorile OD ale extractelor de țesuturi obținute cu substanța chimică de testat fără nicio corecție pentru reducerea directă a MTT și/sau interferență a culorii se află în intervalul liniar al spectrofotometrului). Cu toate acestea, rezultatele pentru substanțele chimice de testat care produc % NSMTT și/sau % NSC_{living} ≥ 60 % (VRM1 și VRM2 pentru protocolul substanțelor lichide) sau 50 % (pentru protocolul substanțelor solide) din martorul negativ ar trebui să fie tratate cu precauție, deoarece aceasta este valoarea-limită stabilită utilizată în cadrul VRM-urilor pentru a distinge substanțele chimice clasificate de cele neclasificate (a se vedea punctul 44). Însă absorbanța standard (DO) nu poate fi măsurată atunci când interferența cu măsurarea formazanului MTT este prea puternică (și anume, determinând valori ale DO necorectate ale extractelor de țesut de testare care nu se încadrează în intervalul linear al spectrofotometrului). Substanțele chimice de testat colorate sau substanțele chimice de testat care se colorează în contact cu apă sau izopropanol care interferează prea mult cu măsurarea absorbanței standard (DO) a formazanului MTT poate fi totuși evaluată cu ajutorul spectrofotometriei HPLC/UPLC (a se vedea apendicele III și IV). Aceasta se datorează faptului că sistemul HPLC/UPLC permite separarea formazanului MTT de substanța chimică înainte de cuantificarea sa (36). Din acest motiv, martorii NSC_{living} sau NSC_{killed}, nu sunt niciodată necesari atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, independent de substanța chimică de testat. Însă ar trebui să fie utilizați martorii NSMTT în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată a reduce MTT în mod direct (în conformitate cu procedura descrisă la punctul 38). Martorii NSMTT ar trebui să fie utilizați, de asemenea, cu substanțe chimice de testat care au o culoare (intrinsecă sau care apare în apă) ce împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce MTT în mod direct, astfel cum este descris la punctul 38. Atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC pentru a măsura formazanul MTT, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. În cazul substanțelor chimice de testat care pot reduce MTT în mod direct, viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: % $viabilitate_{test}$ minus % NSMTT, astfel cum este descris în ultima teză de la punctul 38. În cele din urmă, ar trebui remarcat faptul că reductorii direcți ai MTT sau reductorii direcți ai MTT care pot interfera, de asemenea, cu culorile și care sunt reținuți în țesuturi după tratament și reduc MTT atât de mult încât conduc în mod semnificativ la valori ale DO (prin măsurarea standard a DO) sau la valori de vârf (folosind spectrofotometrul UPLC/HPLC) ale extractelor de țesuturi testate care nu se încadrează în intervalul de linearitate al spectrofotometrului, nu pot fi evaluați prin metodele de testare RhCE, deși se apariția acestora este preconizată doar în situații foarte rare.

42. Spectrofotometria HPLC/UPLC poate fi utilizată, pe toate tipurile de substanțe chimice de testat (colorate, necolorate, reductori ai MTT și nereductori ai MTT) pentru măsurarea formazanului MTT (11) (36). Datorită diversității sistemelor de spectrophotometrie HPLC/UPLC, nu este fezabil pentru fiecare utilizator să stabilească exact același condiții ale sistemului. Ca atare, calificarea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC ar trebui să fie demonstrată înainte ca acesta să fie utilizat pentru a cuantifica formazanul MTT din extractele de țesuturi prin îndeplinirea criteriilor de acceptare pentru un set de parametri standard de calificare, pe baza celor descrise în orientarea U.S. Food and Drug Administration pentru industrie cu privire la validarea metodei bioanalitice (36) (38). Acești parametri-cheie și criteriile de acceptare aferente sunt prezentate în apendicele 5. Odată ce criteriile de acceptare definite în apendicele 5 au fost îndeplinite, sistemul de spectrofotometrie prin HPLC/UPLC este considerat a fi calificat și pregătit pentru a măsura formazanul MTT în condițiile experimentale descrise în prezenta metodă de testare.

Criterii de acceptare

43. Pentru fiecare testare în care sunt utilizate loturi de țesuturi RhCE care au îndeplinit cerințele de control al calității (a se vedea punctul 30), țesuturile tratate cu substanța martor negativă ar trebui să prezinte o valoare DO care să reflecte calitatea țesuturilor în urma transportului, a etapelor de recepție și a tuturor proceselor de protocol și nu ar trebui să fie în afara limitelor stabilite în mod tradițional, care sunt descrise în tabelul 2 (a se vedea punctul 26). În mod similar, țesuturile tratate cu substanță martor pozitivă, și anume acetat de metil, ar trebui să prezinte o viabilitate tisulară medie < 50 % față de martorul negativ în cadrul VRM1, în protocoalele privind substanțele lichide sau cele solide, și ≤ 30 % (protocolul privind substanțele lichide) față de martorul negativ în cadrul VRM2, reflectând astfel capacitatea țesuturilor de a reacționa la o substanță chimică de testat iritantă în condițiile metodei de testare (34) (35). Variabilitatea între replicile de țesuturi ale substanțelor chimice de testat și cele ale substanțelor martor ar trebui să se încadreze în limitele acceptate (și anume, diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 % sau abaterea standard (SD) între trei replici de țesut nu ar trebui să depășească 18 %). În cazul în care martorul negativ sau martorul pozitiv inclus într-o testare nu se încadrează în intervalele acceptate, se consideră că testarea nu este calificată și ar trebui să fie repetată. Dacă variabilitatea dintre replicile de țesut ale unei substanțe chimice de testat se situează în afara intervalului acceptat, testul trebuie considerat a fi „necalificat", iar substanța chimică de testat ar trebui să fie testată din nou.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

44. Valorile densității optice/de vârf obținute cu replicile de extracte de țesut pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să fie utilizate pentru a calcula media procentuală a viabilității tisulare (media între replicile de țesut) normalizată la martorul negativ, care este stabilită la 100 %. Valoarea-limită a viabilității tisulare procentuale pentru identificarea substanțelor chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă (fără clasificare conform GHS al ONU și Regulamentul CLP) este dată în tabelul 4. Rezultatele ar trebui să fie, așadar, interpretate după cum urmează:

— Substanța chimică de testat este identificată ca nefiind necesar să fie clasificată și etichetată în conformitate cu GHS al ONU și cu Regulamentul CLP (neclasificată), în cazul în care procentul mediu de viabilitate tisulară după expunere și incubația după expunere este mai mare decât (>) valoarea-limită stabilită a procentului de viabilitate tisulară, astfel cum este indicat în tabelul 4. În acest caz, nu este necesară testarea suplimentară în cadrul altor metode de testare.

— Dacă procentul mediu de viabilitate tisulară după expunere și incubația după expunere este mai mic decât sau egal cu (≤) valoarea-limită stabilită a procentului de viabilitate tisulară, nu se poate face o estimare, astfel cum se arată în tabelul 4. În acest caz, testarea suplimentară prin alte metode de testare va fi necesară deoarece metodele de testare RhCE indică un anumit număr de rezultate fals pozitive (a se vedea punctele 14-15) și nu pot face diferența între categoriile 1 și 2 din GHS al ONU și Regulamentul CLP (a se vedea punctul 17).

Tabelul 4

Modele predictive conform clasificării GHS al ONU și CLP

MRV	Neclasificată	Nu se poate estima
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (pentru ambele protocoale)	Viabilitate tisulară medie > 60 %	Viabilitate tisulară medie ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (pentru protocolul lichidelor)	Viabilitate tisulară medie > 60 %	Viabilitate tisulară medie ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (pentru protocolul solidelor)	Viabilitate tisulară medie > 50 %	Viabilitate tisulară medie ≤ 50 %

45. Un singur test compus din cel puțin două duplicate de țesuturi ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când rezultatul este fără echivoc. În schimb, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale replicilor și/sau un procent mediu de viabilitate tisulară egal cu 60 ± 5 % (VRM1 și VRM2 pentru protocolul lichidelor) sau 50 ± 5 % (VRM2 pentru protocolul solidelor), ar trebui avut în vedere un al doilea test, precum și un al treilea test în cazul unor rezultate discordante între primele două teste.

46. Pentru anumite tipuri de amestecuri ar putea fi avute în vedere valori-limită procentuale diferite pentru viabilitatea tisulară care diferențiază substanțele chimice de testat clasificate de cele neclasificate, după caz și dacă acest lucru este justificat, pentru a crește nivelul general de performanță a metodei de testare pentru respectivele tipuri de amestecuri (a se vedea punctul 14). Substanțele chimice de referință pot fi utile pentru evaluarea potențialului de leziune oculară gravă/iritație oculară al substanțelor chimice de testat necunoscute sau din clasa de produse sau pentru evaluarea potențialului de toxicitate oculară relativă al unei substanțe chimice clasificate în limitele unui anumit interval de răspunsuri pozitive.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

47. Ar trebui să se consemneze în format tabelar, pentru fiecare substanță chimică de testat, datele fiecărei replici de țesut din cadrul unei testări (de exemplu, valorile DO/valorile de vârf ale formazanului MTT și datele procentuale calculate pentru viabilitatea tisulară pentru substanța chimică de testat și pentru substanțele martor, precum și estimarea finală a metodei de testare RhCE), inclusiv date provenind din testele repetate, după caz. În plus, ar trebui să se consemneze media procentuală de viabilitate a țesutului și diferența de viabilitate dintre două replici de țesut (dacă n = 2 replici de țesut) sau SD (dacă n ≥ 3 replici de țesut) pentru fiecare substanță chimică de testat și martor. Orice interferențe observate ale unei substanțe chimice de testat cu măsurarea formazan MTT prin reducerea directă a MTT și/sau interferența prin culoare ar trebui să fie consemnate pentru fiecare substanță chimică de testat.

Raport testului

48. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

Substanța monocomponentă

— identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) de registru CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— starea fizică, volatilitatea, pH, LogP, masa moleculară, clasa de substanțe chimice și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— starea fizică și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

Substanțe martor pozitive și negative

— identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) de registru CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— starea fizică, volatilitatea, masa moleculară, clasa de substanțe chimice și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— justificarea utilizării unui tip de martor negativ diferit de H2O ultrapură sau DPBS fără Ca 2+/Mg2+, dacă este cazul;

— justificarea utilizării unui martor pozitiv diferit de acetat de metil pur, dacă este cazul;

— trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi și negativi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu.

— *Structura de țesut RhCE și protocolul utilizat (cu justificarea alegerii lor, dacă este cazul)*

Condițiile metodei de testare

— structura de țesut RhCE utilizată, inclusiv numărul de lot;

— lungimea de undă și filtrul de tip band pass (dacă este cazul) utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT, precum și intervalul de linearitate al dispozitivului de măsurare (de exemplu, spectrofotometru);

— descrierea metodei utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT;

— descrierea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC utilizat, dacă este cazul;

— informații de asistență complete privind structura de țesut RhE specifică utilizată, inclusiv performanța acestuia. Aceasta trebuie să includă, printre altele:

i) controlul calității pentru viabilitate (furnizor)

ii) viabilitate în condițiile metodei de testare (utilizator);

iii) controlul calității funcției de barieră;

iv) morfologia, dacă este disponibilă;

v) Reproductibilitatea și capacitatea de estimare;

vi) alte controale ale calității (CC) asupra structurii de țesut RhCE, dacă există;

— trimiteri la datele istorice ale structurii de țesut RhCE. Aceasta trebuie să includă, printre altele: acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul;

— o declarație din care să reiasă că instalația de testare și-a demonstrat competența în utilizarea metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor chimice de verificare.

Durata și criteriile de acceptare a testului:

— valorile medii ale martorilor pozitivi și negativi și intervale de acceptare pe baza datelor istorice;

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru martorii pozitivi și negativi;

— variabilitatea acceptabilă dintre replicile de țesut pentru substanța chimică de testat.

Procedura de testare

— detalii cu privire la procedura de testare utilizată;

— dozele de substanțe chimice de testat și de substanțe martor utilizate;

— durata și temperatura expunerii, perioadele de imersie post-expunere și de incubație post-expunere (dacă este cazul);

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

— indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare, dacă este cazul;

— numărul de replici de țesut utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (martor pozitiv, martor negativ, NSMTT, NSC_{living} și NSC_{killed}, dacă este cazul);

Rezultate

— prezentarea tabelară a datelor privind fiecare substanță chimică de testat și martor pe testări (inclusiv experimente repetate, dacă este cazul) și fiecare măsurare a replicilor, inclusiv valoarea DO sau valoarea de vârf pentru formazan MTT, procentul de viabilitate tisulară, procentul mediu de viabilitate tisulară, diferențele între replicile de țesut sau DS și estimarea finală;

— dacă este cazul, rezultatele martorilor utilizați pentru reductorii direcți ai MTT și/sau substanțele chimice colorate, inclusiv valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, diferențe între replici de țesut sau DS, procentul final corect de viabilitate tisulară și estimarea finală;

— rezultatele obținute cu substanța (substanțele) chimică(e) de testat și substanțele martor în legătură cu criteriile de acceptare ale verificării și testării specifice;

— descrierea altor efecte observate, de exemplu, colorarea țesuturilor cu o substanță chimică de testat colorată;

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, a șasea ediție revizuită, New York și Geneva: Organizația Națiunilor Unite. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.

(3) Capitolul B.47 din prezenta anexă, Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă.

(4) Capitolul B.48 din prezenta anexă, Metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare.

(5) Capitolul B.61 din prezenta anexă, Metoda de testare pentru scăpări de fluoresceină în vederea identificării substanțelor corozive și iritante grave pentru ochi.

(6) Capitolul B.68 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin expunere pe termen scurt pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă.

(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, ediție specială 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. Publicație disponibilă la adresa: 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. Avizul nr. 2014-03 al ESAC din 17 noiembrie 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Publicație disponibilă la adresa: 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). Avizul nr. 2016-02 al ESAC din 24 iunie 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Publicație disponibilă la adresa: 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. (Manuscris în curs de elaborare).

(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) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(18) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. În: 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.și Maibach H.I. (editori), a patra ediție, pp. 749–815. Washington, DC, SUA: 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.), a șaptea ediție, 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, versiunea a 8-a (5 martie 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Publicație disponibilă la adresa: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, versiunea 1. (20 iulie 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Publicație disponibilă la adresa: 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. Mai 2001. Publicație disponibilă la adresa: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment, nr. 263. ENV Publications, Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța metodei de testare și un aspect al „relevanței". Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul de „concordanță" pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (18).

Substanță chimică de referință: o substanță chimică utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță de referință ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) o sursă (surse) consecventă (consecvente) și sigură (sigure) pentru identificarea și caracterizarea sa; (ii) asemănări structurale, funcționale și/sau chimice sau la nivelul clasei de produse cu substanța (substanțele) chimică (chimice) testată (testate); (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date de susținere privind efectele cunoscute; și (v) putere cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordarea ascendentă: abordarea etapizată utilizată pentru o substanță chimică de testat susceptibilă de a nu necesita clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare și etichetare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Concordanță: a se vedea punctul „Precizie".

Cornee: partea transparentă a părții frontale a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite pătrunderea luminii în interior.

CV: coeficient de variație.

Dev: abatere.

EIT: test de iritație cutanată.

EURL ECVAM: Laboratorul de referință al UE pentru alternative la testarea pe animale.

Iritație oculară: producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochiului" și cu „categoria 2 din GHS al ONU"

ET_{50}: perioada de expunere necesară pentru a reduce viabilitatea tisulară cu 50 % la aplicarea unei substanțe chimice de referință cu o concentrație specifică fixă.

Rată de rezultate fals negative: proporția tuturor substanțelor pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: proporția tuturor substanțelor negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Pericol: proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

HPLC: cromatografie lichidă de înaltă performanță.

IC_{50}: concentrație la care o substanță chimică de referință reduce viabilitatea țesutului cu 50 % ca urmare a unui timp de expunere fix (de exemplu, un tratamen tde 30 de minute cu SDS).

Doză infinită: cantitate de substanță chimică de testat aplicată pe structura de țesut RhCE care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epiteliale.

Efecte ireversibile asupra ochilor: A se vedea „Leziune oculară gravă”.

LLOQ: limita de cuantificare inferioară.

LogP: logaritmul coeficientului de partiționare octanol-apă

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță mono-constituent: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Martor negativ: o probă ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că nu provoacă un răspuns pozitiv în sistemul de testare. Această probă este prelucrată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor și este utilizată pentru a determina o viabilitate tisulară de 100 %.

Neclasificat: Substanțe chimice care nu sunt clasificate pentru iritație oculară (categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP, categoria 2A sau 2B din GHS al ONU) sau leziune oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP). Termen utilizat în paralel cu „neîncadrat într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP”.

NSC_{killed}: Culoare nespecifică la țesuturi moarte.

NSC_{living}: Culoare nespecifică la țesuturi vii.

NSMTT: Reducere nespecifică a MTT.

DO: Densitate optică.

Standarde de performanță: Standarde bazate pe o metodă de testare validată, care a fost considerată a fi valabilă din punct de vedere științific, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Se includ: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin metoda de testare propusă la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (18).

Martor pozitiv: o probă ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv în sistemul de testare. Această probă este prelucrată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (18).

Fiabilitate: măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (18).

Test substitutiv: Un test conceput să substituie un test utilizat în mod sistematic și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost conceput pentru a asigura o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat pentru toate situațiile de testare posibile și toate substanțele chimice (18).

Reproductibilitate: acordul dintre rezultatele obținute în urma testării repetate a aceleiași substanțe chimice de testat, utilizând același protocol de testare (a se vedea punctul „Fiabilitate") (18).

Efecte reversibile asupra ochilor: A se vedea „iritația oculară".

RhCE: epiteliu similar corneei umane reconstruit

Test: un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor negativ și un martor pozitiv.

SD: abatere standard.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active de testat clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (18).

Leziune oculară gravă: producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochiului" și cu „categoria 1 din GHS al ONU".

Proceduri standard de operare (PSO): proceduri formale scrise care descriu în detaliu modul în care ar trebui să se desfășoare fiecare operațiune de laborator de rutină și specifică testelor. Acestea sunt prevăzute în GLP.

Specificitate: proporția tuturor substanțelor chimice de testat negative/inactive clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (18).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Test: o singură substanță chimică de testat testată concomitent pe minim două replici de țesut, astfel cum este definit în POS corespunzător.

Viabilitate tisulară: parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare dintr-un țesut reconstruit ca fiind capacitatea acestora de a reduce colorantul esențial MTT, care, în funcție de punctul final măsurat și structura testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

Abordare descendentă: abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (rezultat pozitiv) din alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Strategie de testare etapizată: o strategie de testare pe etape, care utilizează metode de testare în mod secvențial. Toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt analizate în fiecare etapă, utilizând un proces de identificare a dovezilor pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare a strategiei. În cazul în care potențialul/puterea de pericol a unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat(ă) pe baza informațiilor existente într-o anumită etapă, nu este necesară o testare suplimentară (18).

ULOQ: limita de cuantificare superioară.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

Categoria 1 din GHS al ONU și Regulamentul CLP: A se vedea „Leziune oculară gravă”.

Categoria 2 din GHS al ONU și Regulamentul CLP: A se vedea „iritația oculară”.

Neîncadrat în GHS al ONU și Regulamentul CLP: substanțe chimice care nu îndeplinesc cerințele pentru a fi clasificate drept substanțe din categoria 1 sau 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (sau din categoria 2A sau 2B din GHS al ONU). Termen utilizat în paralel cu „neclasificat”.

UPLC: Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Metodă de testare valabilă: o metodă de testare considerată a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. o metodă de testare nu este niciodată valabilă într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (18).

Metodă de testare validată: o metodă de testare pentru care au fost finalizate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de precizat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (18).

VRM: metodă de referință validată.

VRM1: testul EpiOcular™ EIT este denumit metoda de referință validată 1.

VRM2: testul SkinEthic™ EIT este denumit metoda de referință validată 2.

Identificarea dovezilor: procesul prin care se analizează punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a formula și a susține o concluzie în ceea ce privește potențialul de pericol al unei substanțe chimice de testat.

Apendicele 2

COMPONENTELE PRINCIPALE ALE TESTELOR RHCE VALIDATE PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE ȘI ETICHETARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protocoale	Substanțe lichide (pot fi introduse cu pipeta la 37 ± 1 °C sau la temperaturi mai mici timp de 15 minute)	Substanțe solide (nu pot fi introduse cu pipeta)	Substanțe lichide și vâscoase (pot fi introduse cu pipeta)	Substanțe solide (nu pot fi introduse cu pipeta)
Suprafața modelelor	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Numărul de țesuturi duplicate	Cel puțin două	Cel puțin două	Cel puțin două	Cel puțin două
Pre-verificareapentru interferența culorii	50 µl + 1 ml H_2O timp de 60 de minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (substanțe chimice de testat necolorate) sau o cantitate de 50 µl + 2 ml izopropanol amestecată timp de 2-3 ore la temperatura ambiantă (substanțe chimice de testat colorate) → dacă DO a substanței chimice de testat la 570 ± 20 nm, după scăderea DO pentru izopropanol sau apă este > 0,08 (ceea ce corespunde unui procent de aproximativ 5 % din media DO a martorului negativ), ar trebui să fie obținuți martori vii adaptați.	50 mg + 1 ml H_2O timp de 60 de minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (substanțe chimice de testat necolorate) și/sau o cantitate de 50 mg + 2 ml izopropanol amestecată timp de 2-3 ore la temperatura ambiantă (substanțe chimice de testat colorate și necolorate) → dacă DO a substanței chimice de testat la 570 ± 20 nm, după scăderea DO pentru izopropanol sau apă este > 0,08 (ceea ce corespunde unui procent de aproximativ 5 % din media DO a martorului negativ), ar trebui să fie obținuți martori vii adaptați.	o cantitate de 10 µl + 90 µl H_2O amestecată timp de 30 ± 2 minute la temperatura camerei (TC, 18-28°C) → în cazul în care substanța chimică de testat se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	o cantitate de 10 mg + 90 µl H_2O amestecată timp de 30 ± 2 minute la TC → în cazul în care substanța chimică de testat se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Pre-verificare pentru reducția directă a MTT	o cantitate de 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml soluție timp de 180 ± 15 minute la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare	(se utilizează 50 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ) o cantitate de 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml soluție timp de 180 ± 15 minute la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare (se utilizează 50 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml soluție pentru 180 ± 15 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați în apă (se utilizează 30 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml soluție pentru 180 ± 15 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați în apă (se utilizează 30 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ)
Pre-tratament	20 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} timp de 30 ± 2 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, ferit de lumină.	20 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} timp de 30 ± 2 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, ferit de lumină.	—	—
Doze de tratament și aplicare	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) cu ajutorul unui instrument calibrat (de exemplu, o nivelă cu lingură calibrată pentru a ține 50 mg de clorură de sodiu).	10 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Pentru substanțele vâscoase, utilizați o plasă din nailon	30 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Expunereincubației MTT	30 min (± 2 min) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 ore (± 0,25 h) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 ore (± 0,1 h) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH

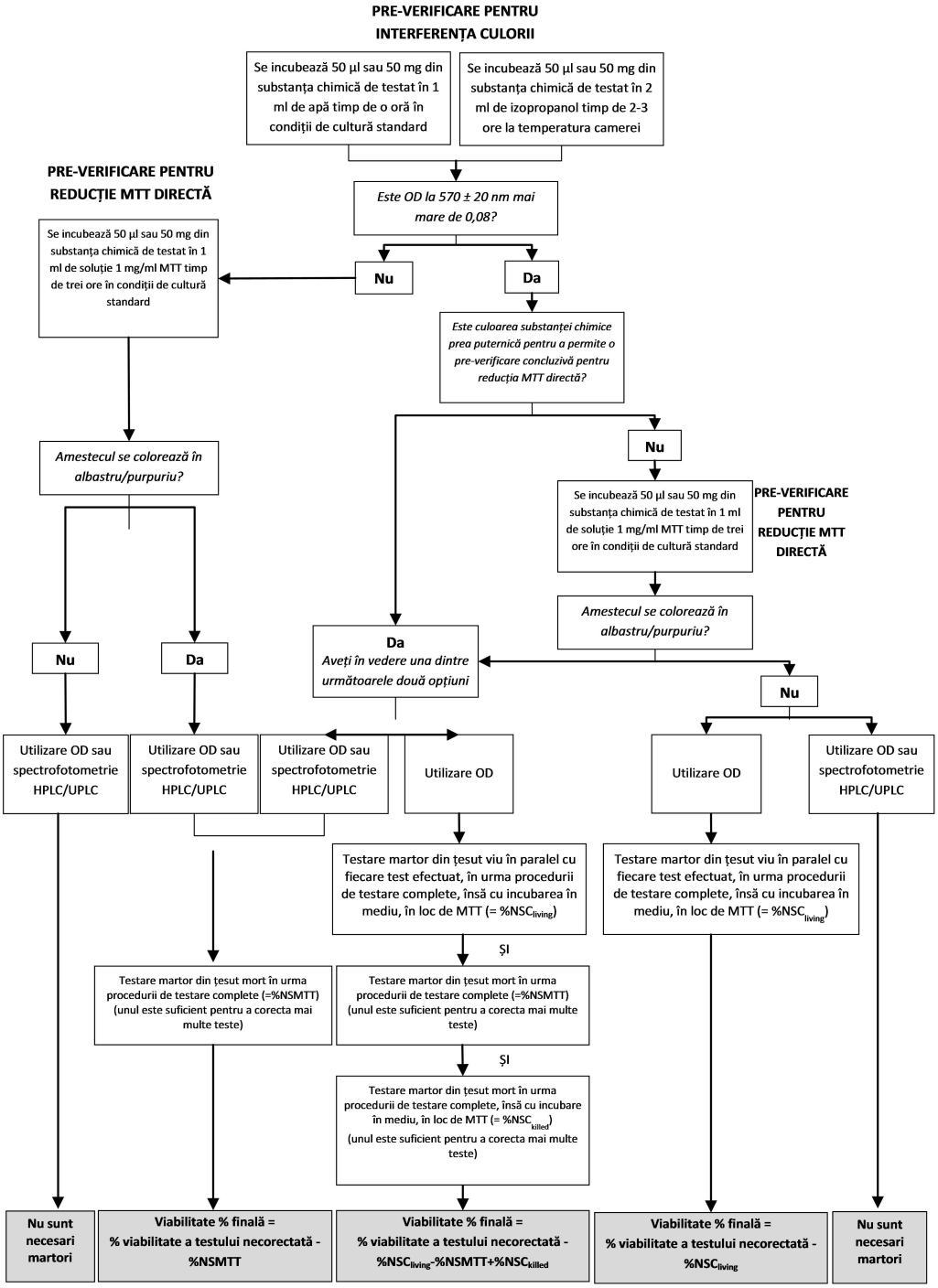
Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Spălare la temperatura camerei	de trei ori în 100 ml de DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}	de trei ori în 100 mlde DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}
Imersie post-expunere	12 min. (± 2 min.) la temperatura camerei în mediu de cultură	25 min. (± 2 min.) la temperatura camerei în mediu de cultură	30 min. (± 2 min.) la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH în mediu de cultură	30 min. (± 2 min.) la temperatura camerei în mediu de cultură
Incubare post-expunere	120 min. (± 15 min.) în mediu de cultură la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18 min. (± 0,25 ore) în mediu de cultură la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	nu există	18 min. (± 0,5 ore) în mediu de cultură la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Martor negativ	50 µl H_2O Testat în paralel	50 µl H_2O Testat în paralel	30 ± 2µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} Testat în paralel	30 ± 2µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} Testat în paralel
Martor pozitiv	50 µl acetat de metil Testat în paralel	50 µl acetat de metil Testat în paralel	30 ± 2µl acetat de metil Testat în paralel	30 ± 2µl acetat de metil Testat în paralel

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Soluția MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
incubației MTT Timpul și temperatura	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Solvent de extracție	2 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat prin perforarea țesutului)	2 ml izopropanol (extracție din partea inferioară a elementului inserat prin perforarea țesutului)	1,5 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)	1,5 ml izopropanol (extracție din partea inferioară a elementului inserat)
Timpul și temperatura de extracție	2-3 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei sau peste noapte la 4-10 °C	2-3 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei sau peste noapte la 4-10 °C	4 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei sau cel puțin peste noapte fără agitare la 4-10 °C	Cel puțin 2 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei
Citirea DO	570 nm (550 - 590 nm) fără filtru de referință	570 nm (550-590 nm) fără filtru de referință	570 nm (540 - 600 nm) fără filtru de referință	570 nm (540 - 600 nm) fără filtru de referință
Controlul calității țesutului	Tratament cu 100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tratament cu 100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tratament de 30 de min. cu SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Tratament de 30 de min. cu SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Criterii de acceptare	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 0,8 și < 2,5 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de 30 de minute cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 50 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 0,8 și < 2,5 2. Viabilitatea medie a replicilor de țesut expuse timp de 6 ore cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 50 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 1,0 și ≤ 2,5 2. Viabilitatea medie a replicilor de țesut expuse timp de 30 de minute cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie ≤ 30 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 1,0 și ≤ 2,5 2. Viabilitatea medie a replicilor de țesut expuse timp de 4 ore cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie ≤ 20 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.

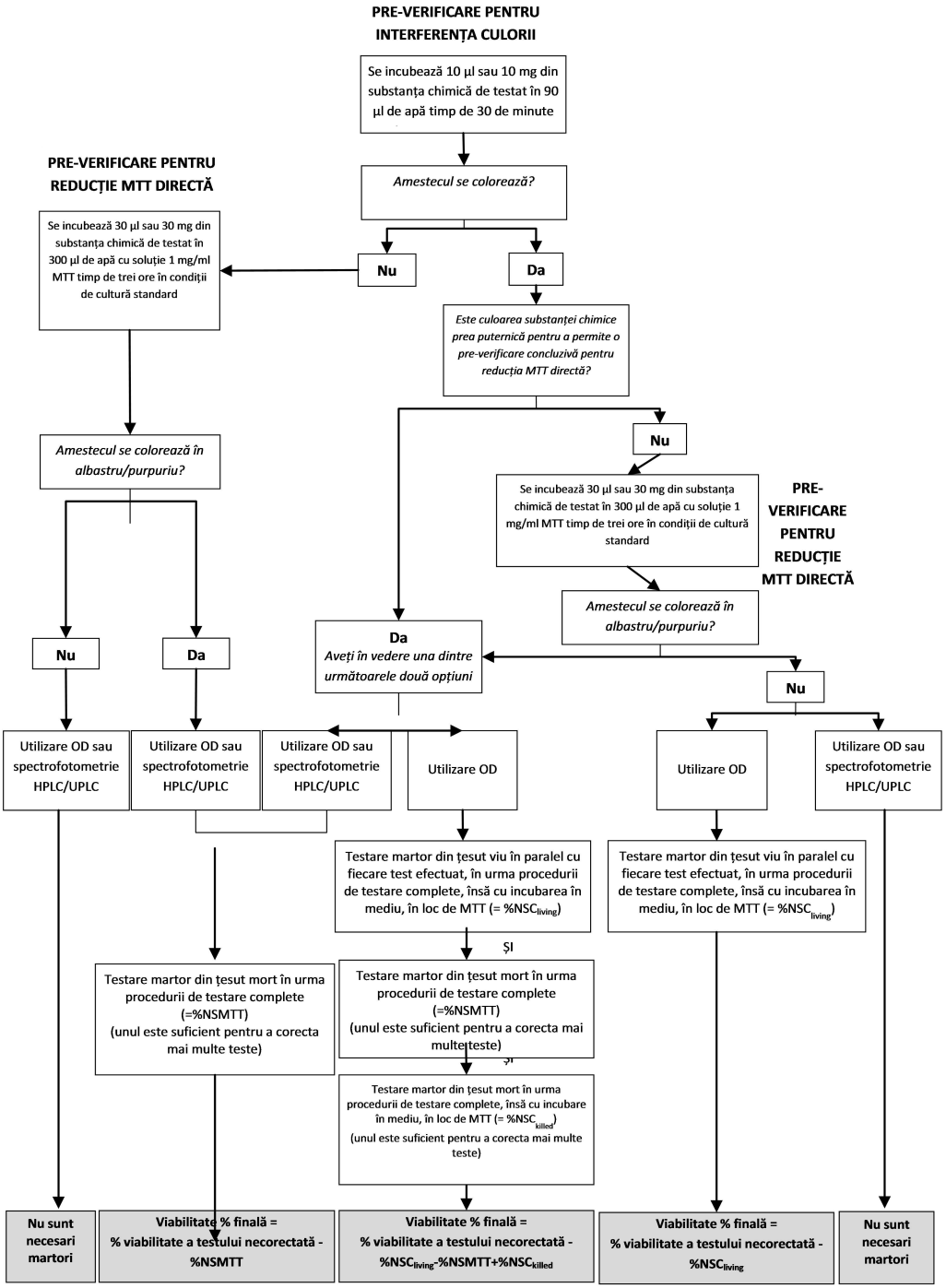
Apendicele 3

DIAGRAMĂ ILUSTRATIVĂ CARE OFERĂ ÎNDRUMĂRI PRIVIND MODUL DE IDENTIFICARE ȘI TRATARE A REDUCTORILOR MTT DIRECȚI ȘI/SAU A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE INTERFEREAZĂ PRIN CULOARE, PE BAZA PSO AFERENTE VRM1



Apendicele 4

DIAGRAMĂ ILUSTRATIVĂ CARE OFERĂ ÎNDRUMĂRI PRIVIND MODUL DE IDENTIFICARE ȘI TRATARE A REDUCTORILOR MTT DIRECȚI ȘI/SAU A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE INTERFEREAZĂ PRIN CULOARE, PE BAZA PSO AFERENTE VRM2



Apendicele 5

PARAMETRII-CHEIE ȘI CRITERIILE DE ACCEPTABILITATE PENTRU CALIFICAREA UNUI SISTEM DE SPECTROFOTOMETRIE HPLC/UPLC PENTRU MĂSURAREA FORMAZANULUI MTT EXTRAS DIN STRUCTURILE DE ȚESUT RHCE

Parametru	Protocol derivat din Orientarea FDA (36) (38)	Criterii de acceptare
Selectivitate	Analiza izopropanolului, a soluției sărace vii (extras de izopropanol din structuri de țesut RhCE vii fără tratament), a soluției sărace moarte (extras de izopropanol din structurile de țesut RhCE moarte fără tratament) și a unui colorant (de exemplu, albastru de metilen)	$Zonă_{interferență}$ ≤ 20 % din $Zona_{LLOQ}$ [1]
Precizie	Controale ale calității (și anume, formazan MTT la 1,6 µg/ml, 16 µg/ml și 160 µg/ml) în izopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Precizie	Controlul calității la izopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Efectul de matrice	Controlul calității la proba vie (n = 5)	85 % ≤ % efect de matrice ≤ 115 %
Reportare	Analiza izopropanolului conform unui standard ULOQ [2]	$Zona_{interferență}$ ≤ 20 % din $Zona_{LLOQ}$
Reproductibilitate (în aceeași zi)	3 curbe de calibrare independente (pe baza a 6 diluții 1/3 consecutive de formazan MTT în izopropanol începând de la valoarea ULOQ, și anume, 200 µg/ml); Controlul calității la izopropanol (n = 5)	Curbe de calibrare: % Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ Controale ale calității: % Dev ≤ 15 % și CV ≤ 15 %
Reproductibilitate (între zile diferite)	Ziua 1: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 2: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 3: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3)	
Stabilitate pe termen scurt a formazanului MTT în extractul de țesut RhCE	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după 24 de ore de la stocare la temperatura camerei	% Dev ≤ 15 %
Stabilitate pe termen lung a formazanului MTT în extractul de țesut RhCE, dacă este necesar	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după mai multe zile de stocare la -20°C	% Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: Limita inferioară de cuantificare, definită ca acoperind 1-2 % din viabilitatea tisulară, și anume, 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: Limita superioară de cuantificare, definită ca fiind de cel puțin două ori mai mare decât cea mai mare concentrație prevăzută de formazan MTT în extracte de izopropanol din martori negativi (~70 µg/ml la VRM), și anume 200 µg/ml.

B.70 ANALIZE *IN VITRO* CU RECEPTOR DE ESTROGEN RECOMBINANT UMAN (hrER) PENTRU DETECTAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CU AFINITATE DE LEGARE DE ER

INTRODUCERE GENERALĂ

Orientarea OCDE privind testarea pe baza performanței

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 493 (2015). TG nr. 493 este o orientare privind testarea bazată pe performanță (PBTG), în care este descrisă metodologia pentru analizele *in vitro* asupra recombinantului uman pentru detectarea substanțelor cu afinitate de legare de receptorul de estrogen (analize de legare hrER). Aceasta cuprinde două analize similare din punct de vedere mecanicist și funcțional pentru identificarea agenților de legare de receptorii de estrogen (și anume, ERα) și ar trebui să faciliteze dezvoltarea unor analize similare noi sau modificate în conformitate cu principiile de validare prevăzute în documentul de orientare al OCDE privind validarea și acceptarea internațională a metode de testare noi și actualizate pentru evaluarea riscurilor (1). Metodele de testare de referință validate integral (apendicele 2 și 3), care servesc drept bază pentru această PBTG, sunt:

— Analiza legării receptorului de estrogen (ER) *in vitro* Freyberger-Wilson (FW) care utilizează un recombinant uman de lungime completă ERα (2) și

— analiza legării receptorului de estrogen *in vitro* a Institutului de Evaluare și Cercetare în Chimie (Chemical Evaluation and Research Institute - CERI) care utilizează o proteină din domeniul de legare prin ligand recombinant uman (2).

Există standarde de performanță (SP) (3) pentru a facilita elaborarea și validarea unor metode de testare similare pentru același punct final de pericol și pentru a permite modificarea oportună a PBTG nr. 493 pentru a se putea adăuga analize similare unei PBTG actualizate. Însă analizele de testare similare vor fi adăugate doar după revizuirea și confirmarea de către OCDE a respectării standardelor de performanță. Testele incluse în TG nr. 493 pot fi utilizate fără nicio deosebire pentru a răspunde cerințelor statelor membre ale OCDE pentru rezultatele testelor privind legarea de receptori de estrogen, beneficiind în același timp de sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE.

Context și principii ale testelor incluse prezenta metodă de testare

2. În 1998, OCDE a inițiat o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente privind testarea și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin. Cadrul conceptual al OCDE (CC) pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin a fost revizuit în 2012. Cadrele conceptuale inițiale și revizuite sunt incluse ca anexe la documentul de orientare al privind orientările de testare standardizate pentru evaluarea substanțelor chimice în vederea identificării perturbatorilor endocrini (4). CC cuprinde cinci niveluri, fiecare nivel corespunzând unui nivel diferit de complexitate biologică. Testele de legare de ER descrise în această metodă de testare sunt de nivelul 2, care include „*teste in vitro care furnizează date cu privire la (un) anumit(e) mecanism(e)/o cale endocrină/anumite căi endocrine*." Această metodă de testare este utilizată pentru analizele privind legarea de receptor *in vitro*, prevăzute a identifica liganzii pentru receptorul de estrogen uman alfa (ERα).

3. A fost demonstrată în mod clar relevanța analizei de legare de ER *in vitro* pentru funcțiile biologice. Analizele de legare de ER sunt concepute pentru a identifica substanțele chimice care au potențialul de a perturba calea hormonilor estrogeni și au fost utilizate pe scară largă în ultimele două decenii pentru a caracteriza distribuția țesuturilor ER, precum și pentru a identifica agoniști/antagoniști ai ER. Aceste analize reflectă interacțiunea dintre receptori și liganzi care este treapta inițială a căii de semnalizare estrogenică și esențială pentru funcția de reproducere la toate vertebratele.

4. Interacțiunea estrogenilor cu ER poate să afecteze transcrierea genelor controlate de estrogen și să inducă efecte non-genomice, ceea ce poate conduce la inducerea sau inhibarea proceselor celulare, inclusiv a celor necesare pentru proliferare celulară, dezvoltare normală a fătului și funcția de reproducere (5) (6) (7). Perturbarea sistemelor estrogenice normale poate avea potențialul de a declanșa efecte adverse asupra dezvoltării normale (ontogeneză), a sănătății reproductive și a integrității sistemului de reproducere. Semnalizarea ER inadecvată poate conduce la efecte cum ar fi un risc crescut de cancer hormono-dependent, afectarea fertilității și modificări ale creșterii și dezvoltării fetale (8).

5. Analizele *in vitro* de legare se bazează pe o interacțiune directă a unei substanțe cu un anumit loc de legare a receptorului de ligand care reglează transcrierea genei. Componenta esențială a analizei de legare de receptorul de estrogen recombinant uman alpha (hrERα) măsoară capacitatea unui ligand marcat radioactiv ([^{3}H]17-β-estradiol) de a se lega de ER în prezența concentrațiilor din ce în ce mai mari ale unei substanțe chimice de testat (și anume, concurent). Substanțele chimice de testat care prezintă o afinitate mare pentru ER concurează cu ligandul marcat radioactiv la o concentrație mai mică în comparație cu substanțele chimice care prezintă o afinitate mai redusă pentru receptor. Această analiză cuprinde două componente principale: un experiment de legare prin saturație pentru a caracteriza parametrii de interacțiune receptor-ligand și pentru documentarea specificității ER, urmat de un experiment de legare competitiv care caracterizează concurența dintre o substanță chimică de testat și un ligand marcat radioactiv pentru legarea de ER.

6. Studiile de validare a analizelor de legare CERI și FW și-au demonstrat relevanța și fiabilitatea acestora pentru scopul prevăzut (2).

7. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

Domeniul de aplicare și limitările aferente analizelor de legare de receptori

8. Aceste teste sunt propuse pentru depistare și stabilirea priorităților, dar pot furniza, de asemenea, informații pentru un eveniment de inițiere moleculară (MIE) care poate fi utilizat în cadrul unei abordări bazate pe dovezi. Acestea abordează legarea chimică de domeniul de legare a ligandului ERα în cadrul unui sistem *in vitro*. Astfel, rezultatele nu ar trebui să fie extrapolate în mod direct cu semnalizarea și reglarea complexă a sistemului endocrin *in vivo*.

9. Legarea ligandului natural, 17β-estradiol, reprezintă prima etapă a unei serii de evenimente moleculare care activează transcrierea genelor țintă și, în cele din urmă, culminează cu o modificare fiziologică (9). Astfel legarea de domeniul de legare a ligandului de ERα este considerată drept unul dintre principalele mecanisme ale perturbării endocrine mediate de ER (ED), deși există și alte mecanisme prin care pot apărea ED, inclusiv interacțiunile cu (i) locuri ale ERα, altele decât cavitatea de legare a liganzilor, (ii) interacțiuni cu alți receptorii relevanți pentru semnalizarea estrogenului, receptorul de estrogen cuplat cu proteina G și ERβ, alți receptori și sisteme enzimatice din sistemul endocrin, (iii) sinteza hormonilor, (iv) activarea metabolică și/sau inactivarea hormonilor, (v) distribuția hormonilor către țesuturile țintă și (vi) eliminarea hormonilor din organism. Niciuna dintre analizele efectuate în cadrul acestei metode de testare nu abordează aceste moduri de acțiune.

10. Această metodă de testare abordează capacitatea substanțelor de a se lega de ERα uman și nu face distincție între agoniști sau antagoniști ai ERα. Aceste analize nu abordează nici alte evenimente din aval precum transcrierea genelor, nici modificările fiziologice. Având în vedere că, în timpul validării, au fost utilizate numai substanțe monocomponente unice, aplicabilitatea pentru amestecuri de testare nu a fost abordată. Cu toate acestea, analizele sunt aplicabile teoretic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

11. Sistemele cu receptor fără celule nu au o capacitate metabolică intrinsecă și nu au fost validate în combinație cu sisteme enzimatice metabolice. Cu toate acestea, ar putea fi posibil să se integreze activitatea metabolică într-un proiect de studiu, dar acest lucru ar necesita eforturi suplimentare de validare.

12. Substanțele chimice care pot denatura proteina (și anume, proteina receptoare), cum ar fi surfactantul sau substanțele chimice care pot schimba pH-ul soluției tampon a analizei, nu pot fi testate sau pot fi testate doar în concentrații lipsite de astfel de interacțiuni. În caz contrar, intervalul de concentrație care poate fi testat în cadrul analizelor pentru o substanță chimică de testat este limitat de solubilitatea acesteia în soluția tampon a analizei.

13. În scop informativ, tabelul 1 prezintă rezultatele testului pentru cele 24 de substanțe care au fost testate în cadrul ambelor analize validate complet descrise în prezenta metodă de testare. Dintre aceste substanțe, 17 sunt clasificate ca fiind lianți de ER și 6 ca fiind nonlianți pe baza rapoartelor publicate, inclusiv a analizelor *in vitro* pentru activarea transcripțională a ER și sau a analizei uterotropice (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). În ceea ce privește datele sintetizate în tabelul 1, s-a ajuns la un acord de aproape 100 % între cele două analize privind clasificările tuturor substanțelor, până la 10^{-4}M, și fiecare substanță a fost clasificată în mod corect ca fiind liant/non-liant de ER. Informații suplimentare privind acest grup de substanțe, precum și alte substanțe testate în cadrul analizelor de legare de ER în timpul studiilor de validare sunt prezentate în standardele de performanță pentru hrER (3), apendicele 2 (tabelele 1, 2 și 3).

Tabelul 1

Clasificarea substanțelor ca lianți sau non-lianți de ER la testarea în cadrul analizelor FW și CERI hrER, comparativ cu răspunsul preconizat

	Denumirea substanței	NR. CAS	Răspuns preconizat	Analiza FW		Analiza CERI		Substanță chimică MESH Clasă	Clasa de produse
				Interval de concentrații (M)	Clasificare	Interval de concentrații (M)	Clasificare		
1	17β-Estradiol	50-28-2	*Liant*	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
2	Noretinodrel	68-23-5	*Liant*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Liant	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
3	Noretindronă	68-22-4	*Liant*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Liant	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
4	Ftalat de di-*n*-butil	84-74-2	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant (**) (†)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant (**) (†)	Hidrocarbură (ciclică), ester	Plastifiant, substanță chimică intermediară
5	DES	56-53-1	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Produs farmaceutic, agent veterinar
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
7	Mezo-hexestrol	84-16-2	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Produs farmaceutic, agent veterinar
8	Genisteină	446-72-0	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (heterociclică), flavonoid	Produs natural
9	Ecvol	531-95-3	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Metabolit fitoestrogen	Produs natural
10	Butilparaben (*n* 4-hidroxibenzoat de butil)	94-26-8	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Paraben	Conservant

	Denumirea substanței	NR. CAS	Răspuns preconizat	Analiza FW		Analiza CERI		Substanță chimică MESH Clasă	Clasa de produse
				Interval de concentrații (M)	Clasificare	Interval de concentrații (M)	Clasificare		
11	Nonilfenol (amestec)	84852-15-3	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Alchilfenol	Compus intermediar
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Organoclorură	Insecticid
13	Corticosteron	50-22-6	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	Steroid	Produs natural
14	Zearalenonă	17924-92-4	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (heterociclică), lactonă	Produs natural
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură, (ciclică)	Produs farmaceutic, agent veterinar
16	5α-dihidrotestosteron	521-18-6	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Steroid, nonfenolic	Produs natural
17	Bisfenol A	80-05-7	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Fenol	Substanță chimică intermediară
18	4-*n*-heptilfenol	1987-50-4	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Echivoc [a]	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Alchilfenol	Intermediar
19	Kepone (clordeconă)	143-50-0	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (halogenat)	Pesticid
20	Benzo(a)antracen	56-55-3	*Non-liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant [b]	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant [b]	Hidrocarbură aromatică	Intermediar
21	Enterolactonă	78473-71-9	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Fitoestrogen	Produs natural
22	Progesteron	57-83-0	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	Steroid	Produs natural

	Denumirea substanței	NR. CAS	Răspuns preconizat	Analiza FW		Analiza CERI		Substanță chimică MESH Clasă	Clasa de produse
				Interval de concentrații (M)	Clasificare	Interval de concentrații (M)	Clasificare		
23	Octiltrietoxisilan	2943-75-1	*Non-liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant	Silan	Modificator de suprafață
24	Atrazină	1912-24-9	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	Compus heterociclic	Erbicid

(*) Limită de solubilitate < 1×10^{-4}M.

(**) Utilizarea și clasificarea substanței ftalat de di-n-butil (DBP) ca non-liant au fost bazate pe testarea până la 10^{-4} M, deoarece s-a observat că substanța este insolubilă la 10^{-3}M (de exemplu, turbiditate) în unele laboratoare în timpul studiilor de pre-validare.

([1]) În timpul studiului de validare, ftalatul de di-*n*-butil (DBP) a fost testat ca o substanță de testat codificată la concentrații de maxim 10^{-3}M. În aceste condiții, unele laboratoare au observat o scădere a legării radioactive a ligandului la cea mai mare concentrație (10^{-3}M) și/sau o curbă ambiguă. Pentru aceste teste, DBP a fost clasificat drept „echivoc" sau „liant" în 3/5 laboratoare care utilizează analiza CERI și în 5/6 laboratoare care utilizează analiza FW [a se vedea referința (2), secțiunile IV.B.3a, b și VI.A].

([a]) Clasificarea nu a fost în concordanță cu clasificarea preconizată. Clasificarea substanței 4-*n*-heptilfenol ca fiind „echivocă" sau „non-liant" de 3/5 laboratoare a avut drept rezultat o clasificare medie ca substanță echivocă. O inspecție mai atentă a arătat că acest lucru s-a datorat limitărilor privind solubilitatea substanței chimice, care au împiedicat producerea unei curbe de legare complete.

([b]) În cursul studiului de validare, substanța benzo(a)antracen a fost reclasificată ca non-liant (și anume, negativă) pe baza literaturii de specialitate publicate care demonstrează că o activitate estrogenă *in vitro* raportată pentru această substanță (16) este în principal dependentă de activarea sa metabolică(17)(18). Activarea metabolică enzimatică a substanței nu ar fi anticipată în cadrul analizelor de legare de hrER fără celule, astfel cum este utilizată în acest studiu de validare interlaboratoare. Astfel, această substanță este clasificată în mod corect ca fiind un „non-liant" atunci când este utilizată în condițiile experimentale pentru analizele FW și CERI.

COMPONENTELE ANALIZEI DE LEGARE DE hrER

Componentele esențiale ale testului

14. Această metodă de testare se aplică pentru analizele care utilizează un receptor ER și un ligand suficient de puternic de receptor, care poate fi utilizat ca marker/detector pentru analiză și poate fi desprins la concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. Analizele de legare conțin următoarele două componente principale: 1) legarea prin saturație și 2) legarea competitivă. Analiza legării prin saturație este utilizată pentru a confirma specificitatea și activitatea preparatelor cu receptor, în timp ce experimentul de legare competitivă este utilizat pentru a evalua capacitatea unei substanțe chimice de testat de a se lega de hrER.

Martori

15. Ar trebui să se descrie baza pentru estrogenul de referință propus a fi testat în paralel și martorii. Martorii testați în paralel [tratați cu solvent (vehicul), pozitivi (liant de ER; afinitate puternică și slabă), negativi (non-liant)], după caz, servesc drept indicatori pentru operativitatea testului în condițiile de testare și furnizează o bază pentru comparații între experimente; acestea fac parte, de obicei, din criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (1). Pe fiecare placă, în timpul fiecărei testări, ar trebui să se utilizeze curbe complete de concentrații pentru estrogenul de referință și martori (și anume, liant slab și nonliant). Toate celelalte plăci ar trebui să conțină: 1) o concentrație ridicată (aproximativ desfacerea totală a ligandului marcat radioactiv) și o concentrație medie (aproximativ IC_{50}) fiecare de liant E2 și slab în trei replici; 2) martor tratat cu solvent și legare nespecifică, fiecare în trei replici.

Proceduri standard de control al calității

16. Ar trebui să fie desfășurate proceduri standard de control al calității, astfel cum sunt descrise pentru fiecare analiză pentru a asigura faptul că receptorii activi, concentrațiile chimice corecte și limitele de toleranță rămân stabile pe parcursul unor replici multiple și că își păstrează capacitatea de a asigura răspunsurile de legare de ER preconizate în timp.

Demonstrarea competenței laboratorului

17. Înainte de a testa substanțele chimice necunoscute prin oricare dintre analizele din cadrul acestei metode de testare, fiecare laborator ar trebui să își demonstreze competența în utilizarea analizei prin efectuarea de analize de saturație pentru a confirma specificitatea și activitatea preparatului cu ER, precum și analize de legare competitivă cu estrogenul de referință și martori (liant slab și non-liant). Laboratorul ar trebui să dezvolte o bază de date istorice cu rezultate pentru estrogenul de referință și martori, care au fost generate în urma a 3-5 experimente independente desfășurate în zile diferite. Aceste experimente vor constitui baza pentru estrogenul de referință și martorii testați anterior pentru laborator și vor fi utilizate ca evaluare parțială a acceptabilității analizei în testele viitoare.

18. Capacitatea de răspuns a sistemului de testare va fi, de asemenea, confirmată prin testarea substanțelor de verificare enumerate în tabelul 2. Lista substanțelor de verificare constituie un subset al substanțelor de referință prevăzute în standardele de performanță pentru analizele de legare de ER (3). Aceste substanțe sunt disponibile în comerț, reprezintă clasele de substanțe chimice asociate în mod obișnuit cu activitatea de legare de ER, prezintă un interval adecvat de putere preconizată pentru lianții de ER (și anume, puternice sau slabe) și non-lianți (și anume, negative). Pentru fiecare substanță de verificare, concentrațiile testate ar trebui să acopere intervalul indicat în tabelul 2. Ar trebui să fie efectuate cel puțin trei experimente pentru fiecare substanță, iar rezultatele ar trebui să fie în concordanță cu activitatea chimică preconizată. Fiecare experiment ar trebui să fie desfășurat în mod independent (și anume, cu diluții proaspete de receptor, substanțe chimice și reactiv), cu câte trei replici pentru fiecare concentrație. Performanța este demonstrată prin clasificarea corectă (pozitiv/negativ) a fiecărei substanțe de verificare. Competența ar trebui să fie testată de către fiecare tehnician atunci când învață analizele.

Tabelul 2

Lista martorilor și a substanțelor de verificare pentru analizele de legare competitivă de hrER (1)

Nr.	Denumirea substanței	Nr. CAS (2)	Răspuns preconizat (3) (4)	Interval de concentrații de testare (M)	Clasa de substanțe chimice MeSH (5)	Clasă de produse (6)
			Martori (estrogen de referință, liant slab, non-liant)			
1	17–εστραδιολ	50-28-2	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutic, agent veterinar
2	Noretinodrel (sau) Noretindronă	68-23-5 (sau) 68-22-4	Liant	3×10^{-9}–30×10^{-6}	Steroid	Farmaceutic, agent veterinar
3	Octiltrietoxisilan	2943-75-1	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Silan	Modificator de suprafață
			Substanțe de verificare (6)			
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Farmaceutic, agent veterinar
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutic, agent veterinar
6	Mezo-hexestrol	84-16-2	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Farmaceutic, agent veterinar
7	Tamoxifen	10540-29-1	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Hidrocarbură (ciclică)	Farmaceutic, agent veterinar
8	Genisteină	446-72-0	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Compus heterociclic, flavonoid,	Produs natural

Nr.	Denumirea substanței	Nr. CAS (2)	Răspuns preconizat (3) (4)	Interval de concentrații de testare (M)	Clasa de substanțe chimice MeSH (5)	Clasă de produse (6)
9	Bisfenol A	80-05-7	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Fenol	Substanță chimică intermediară
10	Zaralonionă	17924-92-4	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-3}	Compus heterociclic, lactonă	Produs natural
11	Butilparaben	94-26-8	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-3}	Acid carboxilic, fenol	Conservant
12	Atrazină	1912-24-9	Non-liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Compus heterociclic	Erbicid
13	Ftalat de di-n-butil (DBP) (7)	84-74-2	Non-liant (8)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Hidrocarbură (ciclică), ester	Plastifiant, substanță chimică intermediară
14	Corticosteron	50-22-6	Non-liant	1×10^{-11}-1×10^{-4}	Steroid	Produs natural

(1) Dacă o substanță de verificare nu mai este disponibilă în comerț, poate fi utilizată o substanță cu aceeași clasificare de legare de ER, având o putere comparabilă și fiind din aceeași clasă de substanțe chimice.
(2) Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service.
(3) Clasificare ca liant de ERαasau non-liant în timpul studiului de validare pentru analizele de legare de hrER CERI și FW (2).
(4) Activitatea de legare de ER s-a bazat pe documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru testele de legare de ER și TA (9), precum și pe datele empirice și pe alte informații obținute din studii de referință publicate și revizuite (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Database) a National Library of Medicine din Statele Unite (material disponibil la adresa: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) DBP poate fi utilizat ca non-liant martor alternativ testat cu o concentrație maximă de 10^{-4} M.
(8) Limita de solubilitate pentru această substanță este 10^{-4} M. Utilizarea și clasificarea substanței ftalat de di-n-butil (DBP) ca non-liant au fost bazate pe testarea până la 10^{-4} M, deoarece s-a observat că substanța este insolubilă la 10^{-3}M (de exemplu, turbiditate) în unele laboratoare în timpul studiilor de pre-validare.

Teste de solubilitate și identificarea intervalului de concentrații pentru substanțele chimice de testat

19. Ar trebui efectuat un test preliminar pentru a determina limita de solubilitate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru a identifica intervalul de concentrații adecvat care să fie utilizat la efectuarea testului. Limita de solubilitate a fiecărei substanțe chimice de testat va fi determinată inițial în solvent și confirmată ulterior în condiții de testare. Concentrația finală testată în cadrul analizei nu ar trebui să depășească 1 mM. Testul pentru identificarea intervalului cuprinde un martor tratat cu solvent și diluții în serie de 8 log, pornind de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, cel mult 1 mM, în funcție de limita de solubilitate), și se consemnează gradul de tulburare sau precipitatul. Concentrațiile din cel de-al doilea și cel de-al treilea experiment ar trebui să fie ajustate după caz pentru o mai bună caracterizare a curbei concentrație-răspuns.

Criteriile de acceptabilitate a unui test

20. Acceptarea sau respingerea unui test se bazează pe evaluarea rezultatelor obținute pentru estrogenul și martorul de referință utilizați pentru fiecare experiment. În primul rând, pentru placa 1, curbele complete de concentrații pentru martorii de referință, în cadrul fiecărui experiment, ar trebui să fie în concordanță cu valorile de măsurare ale performanței cu parametrii de formare a curbei (de exemplu, IC_{50} și Hillslope) pe baza rezultatelor raportate pentru protocoalele respective pentru analizele CERI și FW (apendicele 2 și 3) și a datelor privind martorii testați anterior din laboratorul care efectuează testul. Toți martorii (estrogenul de referință, liantul slab și non-liantul) ar trebui să fie clasificați în mod corect pentru fiecare experiment. În al doilea rând, martorii de pe toate plăcile ulterioare trebuie să fie evaluați pentru asigurarea consecvenței cu placa 1. Ar trebui să se utilizeze un interval suficient de concentrații ale substanței chimice de testat pentru a defini cu claritate partea superioară a curbei de legare competitivă. Variabilitatea între replici la fiecare concentrație a substanței chimice de testat, precum și între cele trei teste independente ar trebui să fie rezonabilă și justificată din punct de vedere științific. Capacitatea de a efectua în mod consecvent testul ar trebui să fie demonstrată prin dezvoltarea și întreținerea unei baze de date istorice pentru estrogenul și martorii de referință. Ca o măsură a reproductibilității în cadrul laboratorului, pot fi utilizate abateri standard (SD) sau coeficienți de variație (CV) pentru mediile de pe curbele estrogenului și martorului de referință ca lianți slabi care corelează parametrii din cadrul mai multor experimente. La analizarea rezultatelor privind martorii de pe placă din cadrul fiecărei testări, precum și pentru fiecare substanță chimică de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională.

În plus, ar trebui să fie îndeplinite următoarele principii referitoare la criteriile de acceptabilitate:

— Datele ar trebui să fie suficiente pentru evaluarea cantitativă a legării de ER.

— Concentrațiile testate ar trebui să rămână în intervalul de solubilitate al substanței chimice de testat.

Analiza datelor

21. Procedura specifică de analiză a datelor pentru datele privind legarea prin saturație și legarea competitivă ar trebui să respecte principiile esențiale pentru caracterizarea interacțiunilor receptor-ligand. De regulă, datele privind legarea prin saturație sunt analizate cu ajutorul unui model de regresie neliniară care determină legarea totală și legarea nespecifică. Este posibil să fie necesară o corecție pentru sărăcirea ligandului [de exemplu, Swillens, 1995, (19)] atunci când se stabilește Bmax și Kd. Datele provenite din analizele privind legarea competitivă sunt transformate, de regulă [de exemplu, legarea și concentrația procentuală a substanței chimice de testat (log M)]. Estimările valorii log (IC_{50}) pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri. În urma unei analize inițiale, ar trebui să se stabilească parametrii curbei și să se verifice vizual cât de bine sunt încadrate datele privind legarea pe curba de legare competitivă generată. În unele cazuri, poate fi necesară o analiză suplimentară pentru a obține cea mai bună curbă [de exemplu, prin stabilirea de limite pentru partea superioară și/sau cea inferioară a curbei, utilizarea regulii de 10 %, a se vedea apendicele 4 și referința 2 (secțiunea III.A.2).

22. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate (punctul 20) indică faptul că sistemul de analiză funcționează în mod corespunzător, dar nu asigură faptul că orice test specific va genera date precise. Reproducerea rezultatelor corecte ale primului test indică cel mai bine faptul că au fost generate date precise.

Criterii generale de interpretare a datelor

23. În prezent, nu există nicio metodă convenită în mod universal pentru interpretarea datelor privind legarea de ER. Însă evaluările calitative (de exemplu, liant/non-liant) și/sau cantitative [de exemplu, log IC_{50}, afinitatea de legare relativă (RBA)] ale activității mediate de hrER ar trebui să fie bazate pe date empirice și un raționament științific solid.

Raport testului

24. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Test:

— analiza utilizată;

Martor/substanță de referință/substanță chimică de testat

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritate, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este practic fezabil etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent/vehicul:

— caracterizare (natură, furnizor și lot);

— justificarea alegerii solventului/vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște;

Receptori:

— sursa receptorilor (furnizor, nr. catalog, lot, specia receptorului, concentrația receptorului activ pusă la dispoziție de furnizor, certificarea din partea furnizorului)

— caracterizarea receptorilor (inclusiv rezultatele privind legarea prin saturație): Kd, Bmax,

— păstrarea receptorilor

— ligand marcat radioactiv:

— furnizor, nr. catalog, lot, activitate specifică

Condiții de testare:

— limitele de solubilitate în condiții de analiză;

— componența soluției tampon de legare;

— concentrația receptorului;

— concentrația detectorului (și anume, ligand marcat radioactiv);

— concentrațiile substanței chimice de testat;

— procent de vehicul în analiza finală;

— temperatura și timpul de incubație;

— metoda legării/separării;

— martori pozitivi și negativi/substanțe de referință;

— criterii pentru caracterizarea testelor ca fiind pozitive, negative sau echivoce;

Verificarea de acceptabilitate:

— valorile efective IC_{50} și Hillslope pentru martorii pozitivi/substanțele de referință testate în paralel;

Rezultate:

— date brute și integrate/libere;

— verificarea confirmării de denaturare, dacă este cazul;

— dacă există, cea mai redusă valoare a concentrației efective (LEC);

— valorile RBA și/sau IC_{50}, după caz;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— analize statistice, dacă este cazul, împreună cu o măsură de eroare și de încredere (de exemplu, SEM, SD, CV sau 95 % CI) și o descriere a modului în care au fost obținute aceste valori;

Discutarea rezultatelor:

— aplicarea regulii de 10 %

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (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, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (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 (nr. 226), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) OCDE (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 222), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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. și 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 nr. 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) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 67), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, 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): Japonia. 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.

Apendicele 1

Definiții și Abrevieri

Regula de 10 %: O opțiune de excludere de la analiză a punctelor de date în cazul în care media replicilor pentru valoarea procentuală a legării specifice de [^{3}H]17β-estradiol este de cel puțin 10 %, peste nivelul observat pentru valoarea medie la o concentrație mai mică (a se vedea apendicele 4).

Criterii de acceptabilitate: Standarde minime pentru efectuarea de controale experimentale și standarde de referință. Toate criteriile de acceptabilitate ar trebui să fie îndeplinite pentru ca un experiment să fie considerat valabil.

Precizie (concordanță): Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (1).

CF: Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea disruptorilor endocrini.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV: Coeficient de variație

E2: 17β-estradiol

ED: Perturbare endocrină

hERα: Receptor alfa de estrogen uman

ER: Receptor de estrogen

Activitate estrogenă: Capacitatea unei substanțe chimice de a imita 17β-estradiol în capacitatea sa de a lega receptori de estrogen. Legarea de hERα poate fi detectată prin această metodă de testare.

IC50: Jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat inhibitoare.

ICCVAM: Comitetul de coordonare între agenții cu privire la validarea metodelor alternative (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Reproductibilitatea între laboratoare: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproductibilitatea între laboratoare este determinată în timpul proceselor de pre-validare și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes între laboratoare, denumită de asemenea, reproductibilitate între laboratoare (1).

Reproductibilitatea în cadrul laboratorului: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (1).

LEC: Cea mai scăzută concentrație efectivă este cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat care produce un răspuns (și anume, cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat la care coeficientul de inducție multiplicată este diferit din punct de vedere statistic de martorul tratat cu vehicul testat în paralel).

Testul „me-too”: O expresie colocvială utilizată pentru un test care este, din punct de vedere structural și funcțional, similar cu o metodă de testare de referință validată și acceptată. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară.

PBTG: Orientarea privind testarea pe baza performanței

Standarde de performanță: Standarde bazate pe o metodă de testare validată, care asigură baza pentru evaluarea comparabilității unui test propus similar din punct de vedere al mecanismului și funcțional. Sunt incluse (1) componente esențiale ale testului; (2) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanța acceptabilă a metodei de testare validate; și (3) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin testul propus la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (1).

Substanțe de verificare: Un subset de substanțe de referință incluse în standardele de performanță, care pot fi utilizate de către laboratoare pentru a demonstra competența tehnică cu o analiză standardizată. Criteriile de selecție pentru aceste substanțe includ, de regulă, faptul că acestea reprezintă intervalul de răspunsuri, sunt disponibile în comerț și pentru acestea există date de referință de înaltă calitate.

Competență: Capacitatea demonstrată de a efectua în mod corespunzător un test înainte de a testa substanțe necunoscute.

Estrogen de referință: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Metode de testare de referință: Testele pe care se bazează PBTG 493.

RBA:: Afinitate de legare relativă. Valoarea RBA a unei substanțe se calculează ca procent din log (IC_{50}) pentru substanță cu raportare la log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol

Relevanță: Descrierea relației dintre un test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (1).

Fiabilitate: Un indicator al faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare.

SD: Abatere standard.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Metodă de testare validată: Un test pentru care au fost realizate studii de validare pentru determinarea relevanței (inclusiv a preciziei) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de precizat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (1).

Validare: Procesul prin care se stabilește fiabilitatea și relevanța unei anumite abordări, metode, test, proces sau evaluări specifice pentru un scop definit (1).

Apendicele 2

ANALIZELE DE LEGARE PRIN SATURAȚIE ȘI LEGARE COMPETITIVĂ DE RECEPTORUL DE ESTROGEN (ERA) IN VITRO FREYBERGER-WILSON UTILIZÂND RECOMBINANT ERA DE LUNGIME TOTALĂ

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Această analiză de legare prin saturație și legare competitivă *in vitro* de receptorul de estrogen (ERα) utilizează un receptor uman de lungime totală ERα (hrERα) care este produs în și izolat de celulele unor insecte infectate cu baculovirus. Protocolul, care a fost dezvoltat de Freyberger și Wilson, a fost supus unui studiu internațional de validare în mai multe laboratoare (2) care a demonstrat relevanța și fiabilitatea acestuia în scopul prevăzut al analizei.

2. Această analiză este o procedură de depistare pentru identificarea substanțelor care pot lega hrERα în lungime totală. Aceasta este utilizată pentru a stabili capacitatea unei substanțe chimice de testat de a concura cu 17β-estradiol pentru legarea de hrERα. Rezultatele cantitative ale analizei pot include valoarea IC_{50} (un indicator al concentrației unei substanțe chimice de testat care este necesară pentru a desprinde jumătate din [^{3}H]17βestradiol de hrERα) și afinitățile de legare relative ale substanțelor chimice de testat pentru hrERα comparativ cu 17β-estradiol. În scopul depistării substanțelor chimice, rezultatele acceptabile ale analizei calitative pot include clasificări ale substanțelor chimice de testat ca lianți ai hrERα, non-lianți sau substanțe echivoce pe baza criteriilor descrise pentru curbele pentru legare.

3. Analiza folosește un ligand radioactiv care necesită obținerea de către laborator a unei licențe pentru materiale radioactive. Toate procedurile cu radioizotopi și substanțe chimice periculoase ar trebui să respecte regulamentele și procedurile descrise în legislația națională.

4. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „**INTRODUCERE GENERALĂ**” și „**COMPONENTE ALE ANALIZEI DE LEGARE DE hrER**” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta orientare privind testarea sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Analiza legării hrERα măsoară capacitatea unui ligand marcat radioactiv ([3H]17βestradiol) de a se lega de ER în prezența concentrațiilor din ce în ce mai mari ale unei substanțe chimice de testat (și anume, concurent). Substanțele chimice de testat care prezintă o afinitate mare pentru ER concurează cu ligandul marcat radioactiv la o concentrație mai mică în comparație cu substanțele chimice care prezintă o afinitate mai redusă pentru receptor.

6. Această analiză cuprinde două componente principale: un experiment de legare prin saturație pentru a caracteriza parametrii de interacțiune receptor-ligand, urmat de un experiment de legare competitiv care caracterizează concurența dintre o substanță chimică de testat și un ligand marcat radioactiv pentru legarea de ER.

7. Scopul experimentului de legare prin saturație este de a caracteriza un anumit lot de receptori în ceea ce privește afinitatea de legare și numărul în pregătirea pentru experimentul de legare competitivă. Experimentul de legare prin saturație măsoară, în condiții de echilibru, afinitatea unei concentrații fixe a receptorului de estrogen pentru ligandul său natural (reprezentată de constanta de disociere, Kd) și concentrația locurilor cu receptor activ (Bmax).

8. Experimentul de legare competitivă măsoară afinitatea unei substanțe de a concura cu [3H]17β-estradiol pentru legarea de ER. Afinitatea este cuantificată prin concentrația substanței chimice de testat care, în stare de echilibru, inhibă 50 % din legarea specifică a [3H]17β-estradiol (denumită „concentrație inhibitoare de 50 %” sau IC50). Aceasta poate fi evaluată, de asemenea, utilizând afinitatea de legare relativă (RBA, în raport cu valoarea IC50 a estradiolului, măsurată separat în cadrul aceluiași test). Experimentul de legare competitivă măsoară legarea [3H]17β-estradiol la o concentrație fixă în prezența unui interval mare (opt ordine de mărime) de concentrații ale substanței chimice de testat. Datele sunt apoi corelate, dacă este posibil, într-o formă de ecuație Hill (Hill, 1910) care descrie desprinderea ligandului radioactiv de către un liant competitiv dintr-un loc. Gradul de desprindere a estradiolului marcat radioactiv, în stare de echilibru, este folosit pentru a caracteriza substanța chimică de testat ca liant, non-liant sau ca o substanță care generează un răspuns echivoc.

PROCEDURA

Demonstrarea performanței acceptabile a proteinei hrERα

9. Înainte de efectuarea sistematică a analizelor de legare prin saturație și de legare competitivă, ar trebui să se demonstreze performanța corespunzătoare a fiecărui nou lot de hrERα în laboratorul în care acesta va fi utilizat. Pentru a demonstra performanța ar trebui să se utilizeze un proces în două etape. Aceste etape sunt următoarele:

— Se desfășoară o analiză de legare a [^{3}H]-17β-estradiol prin saturație pentru a demonstra specificitatea și saturația hrERα. Analiza regresiei non-liniare a acestor date (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) și schița Scatchard ulterioară ar trebui să documenteze afinitățile de legare de hrERα ale [^{3}H]-17β-estradiol (Kd) și numărul receptorilor (Bmax) pentru fiecare lot de hrERα.

— Se desfășoară o analiză de legare competitivă cu ajutorul substanțelor martor [estrogenul de referință (17β-estradiol)], al unui liant slab (de exemplu, noretinodrel sau noredronă) și al unui non-liant (octiltrietoxisilan, OTES). Fiecare laborator ar trebui să stabilească o bază de date istorică pentru a documenta consecvența IC_{50} și alte valori relevante pentru estrogenul de referință și liantul slab obținute în urma experimentelor și pentru diferite loturi de hrERα. Parametrii curbelor privind legarea competitivă pentru substanțele martor ar trebui să se încadreze în limitele intervalului de încredere de 95 % (a se vedea tabelul 1), acestea fiind dezvoltate pe baza datelor din laboratoarele care au participat la studiul de validare pentru această analiză (2).

Tabelul 1

Criterii de performanță elaborate pentru estrogenul de referință și liantul slab, analiza FW privind legarea hrER.

Substanță	Parametru	Media [a]	Abaterea standard (n)	Interval de încredere de 95 % [b]	
				Limita inferioară	Limita superioară
17β-estradiol	Partea superioară (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Partea inferioară (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Panta Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	- 8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Partea superioară (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Partea inferioară (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Panta Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindronă [c]	Partea superioară (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Partea inferioară (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Panta Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$(M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Media (n) ± abaterea standard (SD) au fost calculate utilizând estimările parametrilor de creare a curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în patru laboratoare în timpul studiului de validare (a se vedea anexa N la referința 2).

[b] Intervalele de încredere de 95 % sunt furnizate ca ghid pentru criteriile de acceptabilitate.

[c] Testarea noretindronei a fost opțională pentru sub-sarcina 4 în timpul studiului de validare (a se vedea referința 2, a se vedea sub-sarcina 4). Astfel, media ± SD (n) au fost calculate folosind estimările curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în două laboratoare.
Intervalul pentru IC_{50}va depinde de valoarea Kd specifică preparatului cu receptori și de concentrația ligandului marcat radioactiv utilizat în cadrul fiecărui laborator. Va fi acceptabilă o ajustare adecvată pentru intervalul IC_{50}în funcție de condițiile utilizate pentru desfășurarea analizei.

Demonstrarea competenței laboratorului

10. A se vedea punctele 17 și 18, precum și tabelul 2 din „**COMPONENTE ALE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA DE hrER**" ale acestei metode de testare. Fiecare analiză (legare prin analiză și legare competitivă) ar trebui să conste în trei testări independente (și anume, cu diluții proaspete de receptor, substanțe chimice și reactivi) în zile diferite și fiecare testare ar trebui să cuprindă trei replici.

Determinarea concentrației receptorului (hrERα)

11. Concentrația receptorului activ variază ușor în funcție de lot și de condițiile de păstrare. Din acest motiv, ar trebui să se determine concentrația receptorului activ, astfel cum a fost primită de la furnizor. Aceasta va determina concentrația corespunzătoare a receptorului activ la momentul testării.

12. În condiții corespunzătoare legării competitive (și anume, 1 nM [^{3}H]-estradiol), ar trebui să se incubeze concentrații nominale de 0,25, 0,5, 0,75 și 1 nM ale receptorului în absența (legare totală) și prezența (legare nespecifică) unei cantități de 1 μM estradiol neetichetat. Legarea specifică, calculată ca diferență între legarea totală și legarea nespecifică, este schițată în comparație cu concentrația nominală a receptorului. Concentrația receptorului, care determină valorile specifice de legare, reprezentând 20 % din marcajul radioactiv adăugat, este corelată cu concentrația nominală a receptorului și această concentrație a receptorului ar trebui utilizate pentru experimente de legare prin saturație și legare competitivă. În mod frecvent, o concentrație hrER finală de 0,5 nM va respecta această condiție.

13. În cazul în care criteriul de 20 % nu poate fi respectat în mod repetat, ar trebui verificat setul experimental pentru identificarea unor posibile erori. Nerespectarea criteriului de 20 % poate indica faptul că există foarte puțini receptori activi în lotul recombinant și ar trebui atunci să se aibă în vedere utilizarea altui lot de receptori.

Analiza saturației

14. Ar trebui să se evalueze opt concentrații din ce în ce mai mari de [^{3}H]17β-estradiol în trei replici, în următoarele trei condiții (a se vedea tabelul 2):

— în absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în prezența ER. Astfel se determină legarea totală prin măsurarea radioactivității în godeurile care au doar [3H]17β-estradiol.

— În prezența unei concentrații multiplicate de 1 000 de ori de 17β-estradiol nemarcat peste 17β-estradiol marcat și în prezența ER. Intenția acestei condiții este de a satura locurile cu legare activă cu 17β-estradiol nemarcat și, prin măsurarea radioactivității în godeuri, de a determina legarea nespecifică. Orice cantitate de estradiol rămasă la cald, care se poate lega de receptor, se consideră că se leagă într-un loc nespecific, întrucât cantitatea de estradiol rece ar trebui să fie într-o concentrație atât de mare încât să se lege de toate locurile specifice disponibile de pe receptor.

— În absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în absența ER (determinarea radioactivității totale)

Preparatul de [^{3}H]-17β-estradiol și soluții 17β-estradiol nemarcate

15. Diluțiile de [^{3}H]-17β-estradiol ar trebui să fie preparate prin adăugarea de soluție tampon pentru analiză la o soluție mamă de 12 nM de [^{3}H]-17β-estradiol pentru a obține concentrații inițiale de la 0,12 nM la 12 nM. Concentrațiile finale de analiză, de la 0,03 la 3,0 nM, se vor obține prin adăugarea a 40 μl din aceste soluții în godeurile de analiză respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri (într-un volum final de 160 μl). Prepararea soluției tampon de analiză, a soluției mamă [^{3}H]-17β-estradiol și a diluțiilor, precum și determinarea concentrațiilor sunt descrise în detaliu în protocolul FW (2).

16. Diluțiile soluțiilor etanolice cu 17β-estradiol ar trebui să se prepare prin adăugarea de soluție tampon de analiză pentru a obține opt concentrații în creștere, cu valori inițiale de la 0,06 μM la 6 μM. Prin adăugarea a 80 μl din aceste soluții în godeurile de testare respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri (într-un volum final de 160 μl), se vor obține concentrațiile finale de analiză, de la 0,03 μM la 3 μM. Concentrația finală de 17β-estradiol nemarcat în fiecare godeu din cadrul analizei privind legarea nespecifică ar trebui să fie de 1 000 de ori concentrația marcată a [^{3}H]-17β- estradiol. Prepararea diluțiilor 17β-estradiol nemarcate este descrisă în detaliu în protocolul FW (2).

17. Ar trebui să fie utilizată concentrația nominală a receptorului care prezintă o legare specifică de 20 ± 5 % (a se vedea punctele 12-13). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată imediat înainte de utilizare.

18. Plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri sunt pregătite astfel cum este ilustrat în tabelul 2, cu 3 replici per concentrație. În apendicele 2.2 este prezentat un exemplu de distribuire a concentrației și volumului de [^{3}H]-17β-estradiol, de 17β-estradiol nemarcat, de soluție tampon și de receptor.

Tabelul 2

Distribuția pe placa de microtitrare în cadrul analizei privind legarea prin saturație

	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			Legare totală (solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 µM E2			Legare nespecifică
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: receptor de estrogen
E2:: 17β-estradiol nemarcat

19. Plăcile de microtitrare pentru analiză ar trebui să fie incubate de la 2° până la 8 °C timp de 16-20 de ore și așezate pe un rotator în perioada de incubație.

Măsurarea [3H]-17β-estradiol legat de hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα ar trebui să fie separat de [^{3}H]-17β-estradiol liber prin adăugarea a 80 µl de suspensie rece DCC în fiecare godeu, agitându-se plăcile de microtitrare timp de 10 minute și apoi supuse centrifugării timp de 10 minute la aproximativ 2 500 RPM. Pentru a reduce la minim desprinderea legăturii [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα în cursul acestui proces, este extrem de important ca soluțiile tampon și godeurile de analiză să fie păstrate la temperaturi între 2 și 8 °C și ca fiecare etapă să fie parcursă rapid. Este necesar un agitator pentru plăcile de microtitrare pentru ca acestea să fie prelucrate în mod eficient și rapid.

21. Apoi ar trebui să se extragă cu multă atenție o cantitate de 50 µl de supernatant care conține [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα pentru a evita orice contaminare a godeurilor prin atingerea DCC și care ar trebui să fie așezată pe o a doua placă de microtitrare.

22. Apoi se adaugă în fiecare godeu (A1-B12 și D1-E12) 200 µl de fluid de scintilație, care poate să convertească energia cinetică a emisiilor nucleare în energie luminoasă. Godeurile G1-H12 (identificate ca valoare DPMS totală) reprezintă diluții în serie de [^{3}H]17βestradiol (40 µl) care ar trebui introduse direct în lichidul de scintilație din godeurile plăcii de măsurare, astfel cum se indică în tabelul 3, și anume, aceste godeuri conțin doar 200 µl de fluid de scintilație și diluția corespunzătoare de [3H]-17β-estradiol. Aceste măsuri demonstrează cât de mult [^{3}H]-17β-estradiol, în DPMS, a fost adăugat în fiecare set de godeuri pentru legarea totală și legarea nespecifică.

Tabelul 3

Distribuția pe placa de microtitrare în cadrul analizei privind legarea prin saturație, măsurarea radioactivității

	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			Legare totală (solvent)
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 E_2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER+ 0,10 µM E_2			Legare nespecifică
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2 (total dpms)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Total dpms - (*)
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]-17β-estradiol
ER:: receptor de estrogen
E2:: 17β-estradiol nemarcat
dpms:: dezintegrări pe minut
(*) Diluțiile în serie la cald ale [^{3}H]-estradiol marcat prezentate aici ar trebui adăugate direct în 200 µl de fluid de scintilație în godeurile G1-H12.

23. Măsurarea ar trebui să înceapă cu un decalaj de cel puțin 2 ore, iar timpul de numărare ar trebui să fie de 40 de minute per godeu. Ar trebui să se utilizeze un contor de scintilație pe placa de microtitrare pentru determinarea dpm/godeu cu o corecție de atenuare. În mod alternativ, în cazul în care nu există un contor de scintilație pentru placa de microtitrare, eșantioanele pot fi măsurate într-un contor convențional. În aceste condiții, se poate avea în vedere o reducere a timpului de numărare.

Analiza privind legarea competitivă

24. Analiza privind legarea competitivă măsoară gradul de legare al unei singure concentrații de [^{3}H]-17β-estradiol în prezența unor concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. La fiecare concentrație din cadrul unei testări ar trebui să se utilizeze trei replici concomitent. În plus, pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să se efectueze trei teste la momente diferite. Substanțele pentru analiză ar trebui să fie configurate pe una sau mai multe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri.

Martori

25. Atunci când se efectuează analiza, ar trebui să se includă în fiecare experiment solventul și martorii tratați în paralel (și anume, estrogenul de referință, liantul slab și non-liantul). Pe fiecare placă, în timpul fiecărei testări, ar trebui să se utilizeze curbe complete de concentrații pentru estrogenul de referință și martori (și anume, liant slab și non-liant). Toate celelalte plăci ar trebui să conțină fiecare (i) E2 și un liant slab în trei replici la o concentrație ridicată (desprindere maximă) și medie (aproximativ IC_{50}); (ii) martor tratat cu solvent și legare nespecifică, fiecare în cel puțin trei replici. Procedurile pentru prepararea soluției tampon de analiză, a martorilor, [^{3}H]-17β-estradiol, hrERα și a soluțiilor cu substanță chimică de testat sunt descrise la referința 2 (anexa K, a se vedea Protocolul privind testarea FW).

Martor tratat cu solvent:

26. Martorul tratat cu solvent indică faptul că solventul nu interacționează cu sistemul de testare și, de asemenea, măsoară legarea totală (TB). Etanolul este solventul preferat. În mod alternativ, în cazul în care cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat nu este solubilă în etanol, poate fi utilizat DMSO. Concentrația de etanol sau DMSO, dacă este utilizată, în godeurile analizei finale este de 1,5 % și nu poate să depășească 2 %.

Martor tampon:

27. Martorul tampon (BC) nu ar trebui să conțină nici solvent, nici substanță chimică de testat, ci toate celelalte componente ale analizei. Rezultatele martorului tampon sunt comparate cu martorul tratat cu solvent pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză.

Liant puternic (estrogen de referință)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) este ligandul endogen și se leagă cu un grad de afinitate mare de ER, subtipul alfa. Pentru fiecare analiză privind legarea competitivă hrERα ar trebui să se pregătească o curbă standard utilizând 17β-estradiol nemarcat pentru a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp, în același laborator. Ar trebui să se prepare opt soluții cu 17β-estradiol nemarcate în etanol, având concentrații în godeurile de analiză cuprinse în intervalul 100 nM-10 pM (de la -7 [logM] la -11 [logM]), repartizate după cum urmează: (-7 [logM], -8 [logM], -8,5 [logM], -9 [logM], - 9,5 [logM], -10 [logM], -11 [logM]). Cea mai mare concentrație de 17β-estradiol nemarcată (1 μM) servește, de asemenea, drept indicator de legare nespecifică. Această concentrație se distinge prin eticheta „NSB" în tabelul 4, chiar dacă aceasta este, de asemenea, integrată în curba standard.

Liant slab

29. Un liant slab [noretinodrel (CAS 68-23-5) sau noretindronă (CAS 68-22-40] ar trebui să fie inclus pentru a demonstra sensibilitatea fiecărui experiment și a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp. Ar trebui să se prepare opt soluții de liant slab în etanol, având concentrații în godeurile de analiză cuprinse între 3 nM și 30 μM (de la -8,5 [logM] la -4,5 [logM]), repartizate după cum urmează: -4,5 [logM], -5 [logM], 5,5 [logM], -6 [logM], -6,5 [logM], -7 [logM],-7,5 [logM], -8,5 [logM].

Non-liant

30. Ca martor negativ ar trebui să se utilizeze octiltrietoxisilan (OTES, CAS 2 943-75-1) (nonliant). Acesta asigură faptul că, așa cum este efectuată analiza, va detecta momentul în care substanțele chimice de testat nu se leagă de hrERα. Ar trebui să se prepare opt soluții de non-liant în etanol, având concentrații în godeurile de analiză cuprinse între 0,1 nM și 1 000 μM (de la -10 [logM] la -3 [logM]), în creșteri treptate ale valorii log. Ftalatul de di*n*butil (DBP) poate fi utilizat ca și non-liant martor alternativ. S-a demonstrat că solubilitatea sa maximă este -4 [logM].

Concentrația hrERα

31. Ar trebui să fie utilizată cantitatea de receptori care prezintă o legare specifică de 20 ± 5 % de 1 nm de ligant radioactiv (a se vedea punctele 12-13 din apendicele 2). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată imediat înainte de utilizare.

[3H]-17β-estradiol

32. Concentrația [^{3}H]-17β-estradiol în godeurile de analiză ar trebui să fie de 1,0 nM.

Substanțe chimice de testat

33. În primul rând, trebuie să se efectueze un test al solubilității pentru a determina limita de solubilitate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru a identifica intervalul de concentrații adecvat care să fie utilizat la efectuarea protocolului de testare. Limita de solubilitate a fiecărei substanțe chimice de testat va fi determinată inițial în solvent și confirmată ulterior în condiții de testare. Concentrația finală testată în cadrul analizei nu ar trebui să depășească 1 mM. Testul pentru identificarea intervalului cuprinde un martor tratat cu solvent și diluții în serie de 8 log, pornind de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, cel mult 1 mM, în funcție de limita de solubilitate), și se consemnează gradul de tulburare sau precipitatul (a se vedea, de asemenea, punctul 35). Substanța chimică de testat ar trebui să fie testată folosind curbe ale concentrației repartizate la 8 log, astfel cum sunt definite în testul anterior de stabilire a intervalului. Concentrațiile din cel de-al doilea și cel de-al treilea experiment ar trebui să fie ajustate după caz pentru o mai bună caracterizare a curbei concentrație-răspuns.

34. Diluțiile substanței chimice de testat ar trebui să fie preparate în solvent adecvat (a se vedea punctul 26 din apendicele 2). În cazul în care concentrația maximă a substanței chimice de testat nu este solubilă nici în etanol, nici în DMSO, iar dacă se adaugă mai mult solvent, concentrația solventului în eprubeta finală ar fi mai mare decât limita acceptabilă, concentrația maximă poate fi redusă la următoarea concentrație inferioară. În acest caz, se poate adăuga o concentrație suplimentară la limita inferioară a seriei de concentrații. Alte concentrări din cadrul seriei ar trebui să rămână neschimbate.

35. Soluțiile cu substanță chimică de testat ar trebui să fie monitorizate atent atunci când se adaugă la godeul de analiză, deoarece substanța chimică testată se poate precipita atunci când este adăugată în acesta. Datele pentru toate godeurile care conțin precipitat ar trebui să fie excluse de la formarea curbei, iar motivul excluderii datelor ar trebui să fie consemnat.

36. În cazul în care există informații anterioare din alte surse care furnizează o valoare log(IC_{50}) pentru o substanță chimică de testat, ar putea fi adecvat ca diluțiile să se repartizate geometric [și anume, 0,5 unități log în jurul valorii preconizate log(IC_{50}). Rezultatul final ar trebui să reflecte o marjă suficientă de concentrații pe fiecare parte a valorii log(IC_{50}), inclusiv pe partea superioară și cea inferioară, astfel încât curba pentru legătură să poată fi caracterizată în mod corespunzător.

Organizara plăcii de analiză

37. Ar trebui să se pregătească plăci de microtitrare etichetate luând în considerare incubațiile în șase replici cu coduri pentru martorul tratat cu solvent, cea mai mare concentrație a estrogenului de referință, care constituie, de asemenea, un indicator al legăturii nespecifice (NSB), și soluția tampon martor, precum și luând în considerare incubațiile în trei replici cu coduri pentru fiecare dintre cele opt concentrații ale martorului non-liant (octiltrietoxisilan), cele șapte concentrații inferioare pentru estrogenul de referință, cele opt niveluri ale dozelor de concentrații ale liantului slab și cele opt concentrații ale fiecărei substanțe chimice de testat (TC). În tabelul 4 de mai jos este prezentat un exemplu de model de diagramă a plăcii pentru curbele de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martor. Se utilizează plăci de microtitrare suplimentare pentru substanțele chimice de testat, care ar trebui să includă martori pe placă (și anume, 1) E2 și un liant slab în trei replici având o concentrație ridicată (desprindere maximă) și medie (de aproximativ IC_{50}); 2) martor tratat cu solvent și soluție de legare nespecifică, fiecare în șase replici (tabelul 5). În apendicele 2.3 este prezentat un exemplu de fișă de configurare a plăcilor de microtitrare pentru analiză competitivă, care utilizează trei substanțe chimice de testat necunoscute. Concentrațiile indicate în tabelele 4 și 5 reprezintă concentrațiile finale ale analizei. Concentrația maximă pentru E2 ar trebui să fie 1×10^{-7} M, iar pentru liantul slab, ar trebui să se utilizeze cea mai mare concentrație utilizată pentru liantul slab pe placa 1. Concentrația IC_{50} trebuie să fie stabilită de laborator pe baza bazei sale de date cu martori testați anterior. Se preconizează că această valoare va fi similară cu cea observată în studiile de validare (a se vedea tabelul 1).

Tabelul 4

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare, curbe de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martori (placa 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (doar solvent)			TB (doar solvent)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Soluție săracă (*)		
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	Soluție săracă (pentru mediu la cald) (**)			Soluție săracă (pentru mediu la cald) (**)			Martor tampon			Martor tampon		

În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)
(*) soluție săracă reală, godeul nu este utilizat
(**) soluția săracă nu a fost utilizată în timpul incubației, ci pentru a confirma radioactivitatea totală adăugată.

Tabelul 5

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare, curbe de concentrație complete pentru substanțele chimice de testat și martorii de pe placă.

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (doar solvent)			TB (doar solvent)			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})		

În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)

Încheierea analizei privind legarea competitivă

38. Astfel cum se arată în tabelul 6, în fiecare godeu ar trebui să se adauge 80 µl de martor tratat cu solvent, martor tampon, estrogen de referință, liant slab, non-liant și substanțe chimice de testat preparate în soluția-tampon a analizei. Apoi se adaugă în fiecare godeu 40 µl dintr-o soluție 4 nM [3H]-17β-estradiol. După o rotire ușoară timp de 10-15 minute la temperaturi între 2° și 8 °C, ar trebui să se adauge 40 µl din soluția hrERα. Plăcile de microtitrare pentru analiză ar trebui să fie incubate de la 2° până la 8 °C timp de 16-20 de ore și așezate pe un rotator în perioada de incubație.

Tabelul 6

Volumul componentelor de analiză pentru testul privind legarea competitivă hrER, plăci de microtitrare

Volum (µl)	Componentă
80	1/7-β-estradiol nemarcat, noretinodrel, OTES, substanțe chimice de testat, solvent sau soluție tampon
40	4 nM de soluție [^{3}H]-17β-estradiol
40	Soluție hrERα având concentrația determinată
160	Volumul total în fiecare godeu de analiză

39. Cuantificarea legării [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, în urma separării [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα de [^{3}H]-17β-estradiol liber, prin adăugarea, în fiecare godeu, a 80 µl de suspensie DCC rece, ar trebui să fie efectuată astfel cum este descris la punctele 20-23 pentru analiza privind legarea prin saturație.

40. Godeurile H1-6 [identificate ca având soluție săracă (pentru mediu cald) în tabelul 4] reprezintă DPMS al [^{3}H]-estradiol marcat în 40 µl. Partea alicotă de 40 µl ar trebui să fie introdusă direct în lichidul de scintilație din godeurile H1-H6.

Criterii de acceptabilitate

Analiza privind legarea prin saturație

41. Curba specifică privind legarea ar trebui să ajungă la un platou, întrucât au fost utilizate concentrații crescătoare de [^{3}H]-17β-estradiol, care indică saturația hrERα cu ligandul.

42. Legarea specifică la 1 nM de [3H]-17β-estestradiol ar trebui să fie situată în intervalul acceptabil 15 %-25 % din radioactivitatea totală măsurată medie adăugată de la o testare la alta. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine, iar analiza saturației ar trebui să fie repetată.

43. Datele ar trebui să producă o reprezentare grafică liniară Scatchard.

44. Legarea nespecifică nu ar trebui să fie excesivă. Valoarea pentru legarea nespecifică ar trebui, de regulă, să fie < 35 % din legarea totală. Însă, raportul poate depăși ocazional această limită atunci când se măsoară valoarea dpm foarte scăzută pentru concentrația minimă a substanței 17β-estradiol marcat radioactiv testate.

Analiza privind legarea competitivă

45. Concentrațiile din ce în ce mai mari de 17β-estradiol nemarcat ar trebui să desprindă [^{3}H]-17β- estradiol de receptor într-un mod compatibil cu o legarea competitivă dintr-un singur punct.

46. Valoarea IC_{50} pentru estrogenul de referință (și anume, 17β-estradiol) ar trebui să fie aproximativ egal cu concentrația molară a [^{3}H]-17β-estradiol, plus valorile Kd determinate din analiza privind legarea prin saturație.

47. Legarea specifică totală ar trebui să se situeze în mod consecvent în intervalul acceptabil de 20 ± 5 % atunci când concentrația medie măsurată a radioactivității totale adăugate în fiecare godeu a fost de 1 nM în toate testele. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine.

48. Solventul nu ar trebui să modifice sensibilitatea sau reproductibilitatea analizei. Rezultatele martorului tratat cu solvent (godeuri TB) sunt comparate cu martorul tampon pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză. Rezultatele pentru TB și martorul tampon ar trebui să fie comparabile în cazul în care nu există niciun efect al solventului asupra analizei.

49. Non-liantul nu ar trebui să desprindă mai mult de 25 % din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα atunci când se testează maxim 10^{-3} M (OTES) sau 10^{-4} M (DBP).

50. Au fost elaborate criterii de performanță pentru estrogenul de referință și doi lianți slabi (de exemplu, noretinodrel, noretindronă), utilizând date din studiul de validare a analizei FW privind legarea hrER (anexa N la referința 2). Sunt prezentate intervale de încredere de 95 % pentru media (n) +/- SD pentru toate testele pe martori din laboratoarele participante la studiul de validare. Au fost calculate intervale de încredere de 95 % pentru parametrii de formare a curbei (și anume, partea superioară, partea inferioară, Hillslope, logIC_{50}) pentru estrogenul de referință și lianții slabi, precum și pentru valoarea $\log_{10}$RBA a lianților slabi în raport cu estrogenul de referință, fiind furnizate ca și criterii de performanță pentru martorii pozitivi. Tabelul 1 furnizează intervalele preconizate pentru parametrii de formare a curbei care pot fi utilizați ca și criterii de performanță. În practică, intervalul IC_{50} poate varia ușor, în funcție de valoarea Kd a preparatul cu receptori și de concentrația ligandului.

51. Nu au fost elaborate criterii de performanță pentru parametrii de formare a curbei în cazul substanțelor chimice de testat din cauza gamei largi de substanțe chimice de testat posibile și a variației posibilelor afinități și rezultatele (de exemplu, curbă completă, curbă parțială, fără formă de curbă). Însă, la analizarea rezultatelor din cadrul fiecărei testări, în cazul unei substanțe chimice de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională. Ar trebui să se utilizeze un interval suficient de concentrații ale substanței chimice de testat pentru a defini cu claritate partea superioară (de exemplu, o legare de 90-100 %) a curbei de legare competitivă. Variabilitatea între replici la fiecare concentrație a substanței chimice de testat, precum și între cele trei teste independente ar trebui să fie rezonabilă și justificată din punct de vedere științific. Martorii din cadrul fiecărei serii, pentru o substanță chimică de testat, ar trebui să se apropie de măsurile de performanță raportate pentru această analiză FW și să fie în concordanță cu datele privind martorii testați anterior din fiecare laborator.

ANALIZA DATELOR

Analiza privind legarea prin saturație

52. Se măsoară atât legarea totală, cât și cea nespecifică. Pornind de la aceste valori, se calculează legarea specifică a [^{3}H]-17β-estradiol, în condiții de echilibru, la concentrații în creștere, scăzând valoarea legării nespecifice din total. Un grafic al legării specifice versus concentrația [^{3}H]-17β-estradiol ar trebui să ajungă al un platou pentru o legare specifică maximă care indică o saturație a hrERα cu [^{3}H]-17β-estradiol. În plus, analiza datelor ar trebui să documenteze legarea [^{3}H]-17β- estradiol de un singur loc de legare cu un grad ridicat de afinitate. Legarea nespecifică, cea totală și cea specifică ar trebui să fie ilustrate pe o curbă de legare prin saturație. În cadrul unei analize ulterioare a acestor date ar trebui să se utilizeze o analiză de regresie neliniară (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) cu o reprezentare finală a datelor sub forma unui grafic Scatchard.

53. Prin analiza datelor ar trebui să se determine valorile Bmax și Kd doar din datele privind legarea totală, pe baza ipotezei că legarea nespecifică este liniară, cu excepția cazului în care se justifică utilizarea unei metode diferite. În plus, ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Ar trebui să se precizeze metoda aleasă pentru regresia robustă. Ar trebui să se recurgă întotdeauna la corecția pentru sărăcirea ligandului (de exemplu, utilizând metoda lui Swillens, 1995) atunci când se determină valorile Bmax și Kd din datele privind legarea prin saturație.

Analiza privind legarea competitivă

54. Curba de legare competitivă este reprezentată grafic ca fiind o legare specifică [^{3}H]-17β-estradiol versus concentrația (unități de log10) soluției testate în paralel. Concentrația substanței chimice de testat care inhibă 50 % din legarea specifică maximă a [^{3}H]-17β-estradiol constituie valoarea IC_{50}.

55. Estimările valorilor log(IC_{50}) pentru martorii pozitivi (de exemplu, estrogenul de referință și liantul slab) ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Partea superioară, cea inferioară, panta și log(IC_{50}) ar trebui, în general, să rămână necondiționate atunci când se formează aceste curbe. Ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Nu ar trebui să se recurgă la corecția pentru sărăcirea ligandului. În urma analizei inițiale, ar trebui să se examineze fiecare curbă de legare pentru a asigura o corelare corespunzătoare cu modelul. Afinitatea de legare relativă (RBA) a unui liant slab ar trebui să se calculeze ca procent din log (IC_{50}) pentru liantul slab raportat la valoarea log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol. Rezultatele martorilor pozitivi și ale martorului non-liant ar trebui să fie evaluate utilizând valorile de măsurare a performanței analizei de la punctele 45-50 din prezentul apendice 2.

56. Datele pentru toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie analizate printr-o abordare etapizată pentru a se asigura analizarea corespunzătoare a datelor și clasificarea corectă a fiecărei curbe de legare competitivă. Se recomandă ca fiecare testare pentru o substanță chimică de testat să fie supusă inițial unei analize a datelor standardizată care este identică cu cea utilizată pentru estrogenul de referință și lianții slabi martori (a se vedea punctul 55 de mai sus). După încheierea analizei, ar trebui să fie efectuată o analiză tehnică a parametrilor curbei și o verificare vizuală a modului în care datele se încadrează pe curba de legare competitivă generată pentru fiecare testare. În timpul acestei analize tehnice, observațiile privind o scădere dependentă de concentrație în procentul [^{3}H]-17β-estradiol legat în mod specific, variabilitatea scăzută între replicile tehnice la fiecare concentrație chimică și consecvența parametrilor de corelare între cele trei teste constituie indicații bune pentru faptul că analiza și analizele datelor au fost efectuate în mod corespunzător.

Interpretarea datelor

57. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi un liant pentru hrERα în cazul în care poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns în intervalul de date este sub 50 % (figura 1).

58. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi un non-liant pentru hrERα dacă:

— poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată, situat în intervalul de date, este mai mare de 75 % sau

— nu poate fi formată o curbă de legare, iar media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.

59. Substanțele chimice de testat sunt considerate echivoce dacă nu este îndeplinită niciuna dintre condițiile de mai sus (de exemplu, punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

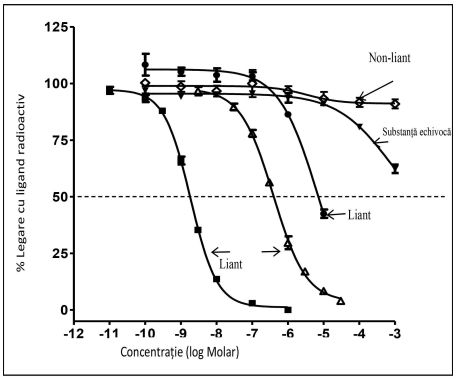
Tabelul 7

Criterii pentru clasificare pe baza curbe de legare competitive pentru o substanță chimică de testat.

Clasificare	Criterii
Liant[a]	Se poate forma o curbă de legare. **Punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este mai mic de 50 %.**
Non-liant[b]	Dacă se poate forma o curbă de legare, **punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este peste 75 %.** Dacă nu se poate forma o curbă de legare, **media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.**
Substanță echivocă[c]	Orice substanță care poate fi testată și care nu este nici liant, nici non-liant (de exemplu, punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

Figura 1

Orice substanță care poate fi testată și care nu este nici liant, nici non-liant (de exemplu, punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).



Exemple de clasificare a unei substanțe chimice de testat utilizând curba de legare competitivă.

60. Se combină mai multe testări realizate într-un laborator pentru o substanță chimică de testat prin atribuirea de valori numerice fiecărei testări și calcularea mediei testelor, astfel cum se arată în tabelul 8. Rezultatele pentru testele combinate din fiecare laborator sunt comparate cu clasificarea preconizată pentru fiecare substanță chimică de testat.

Tabelul 8

Metoda de clasificare a substanței chimice de testat utilizând teste multiple în cadrul unui laborator

Pentru atribuirea unei valori fiecărei testări:	
Clasificare	Valoare numerică
Liant	2
Substanță echivocă	1
Non-liant	0
Pentru clasificarea mediei valorilor numerice ale testelor:	
Clasificare	Valoare numerică
Liant	Media ≥ 1,5
Substanță echivocă	0,5 ≤ media < 1,5
Non-liant	Media < 0,5

RAPORTUL TESTULUI

61. A se vedea punctul 24 din „**COMPONENTELE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA hrER**” din prezenta metodă de testare.

Apendicele 2.1

LISTĂ DE TERMENI

[^{3}H]E2: 17β-estradiol marcat radioactiv cu tritiu

DCC: Cărbune acoperit cu dextran

E2: 17β-estradiol nemarcat (inert)

Soluția-tampon de analiză: 10 mM Tris, 10 mg albumină serică bovină /ml, 2 mM DTT, 10 % glicerol, 0,2 mM leupeptin, pH 7,5

hrERα: Receptor de estrogen recombinant uman alfa

Replică: Unul dintre multiplele godeuri care conțin același conținut la aceleași concentrații și sunt analizate în paralel în cadrul unei singure testări. În acest protocol, fiecare concentrație a substanței chimice de testat este testată în trei replici; cu alte cuvinte, există trei replici care sunt testate simultan la fiecare concentrație a substanței chimice de testat.

Testare: Un set complet de godeuri de pe o placă de microtitrare testate în paralel, care oferă toate informațiile necesare pentru a caracteriza legarea unei substanțe chimice de testat de hrERα (și anume, [^{3}H]-17β-estradiol total adăugat în godeul de analiză, legarea maximă a [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, legarea nespecifică și legarea totală la diferite concentrații ale substanței chimice de testat). O testare ar putea consta dintr-un singur godeu de analiză (și anume, replică) per concentrație, dar, deoarece acest protocol impune efectuarea analizei pe trei replici, o testare constă din trei godeuri de analiză per concentrație. În plus, acest protocol necesită trei teste independente (și anume, neefectuate în paralel) pe substanță chimică.

Apendicele 2.2

ANALIZĂ TIPICĂ A SATURAȚIEI [^{3}H]-17B-ESTRADIOL CU TREI REPLICI DE GODEURI

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri											
Poziție	**Replică**	**Cod tip godeu**	**Concentrație inițială E2 la cald (nM)**	**Volum E2 la cald (µl)**	**Concentrație finală E2 la cald (nM)**	**Concentrație inițială E2 la rece (µM)**	**Volum E2 la rece (µl)**	**Concentrație finală E2 la rece (µM)**	**Volum soluție-tampon (µl)**	**Volum receptor (µl)**	**Total volum în godeuri**
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

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri											
Poziție	**Replică**	**Cod tip godeu**	**Concentrație inițială E2 la cald (nM)**	**Volum E2 la cald (µl)**	**Concentrație finală E2 la cald (nM)**	**Concentrație inițială E2 la rece (µM)**	**Volum E2 la rece (µl)**	**Concentrație finală E2 la rece (µM)**	**Volum soluție-tampon (µl)**	**Volum receptor (µl)**	**Total volum în godeuri**
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

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri											
Poziție	**Replică**	**Cod tip godeu**	**Concentrație inițială E2 la cald (nM)**	**Volum E2 la cald (µl)**	**Concentrație finală E2 la cald (nM)**	**Concentrație inițială E2 la rece (µM)**	**Volum E2 la rece (µl)**	**Concentrație finală E2 la rece (µM)**	**Volum soluție-tampon (µl)**	**Volum receptor (µl)**	**Total volum în godeuri**
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	La cald	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	La cald	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	La cald	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	La cald	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	La cald	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	La cald	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	La cald	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	La cald	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	La cald	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	La cald	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	La cald	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	La cald	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	La cald	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	La cald	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	La cald	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	La cald	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri

Poziție	Replică	Cod tip godeu	Concentrație inițială E2 la cald (nM)	Volum E2 la cald (µl)	Concentrație finală E2 la cald (nM)	Concentrație inițială E2 la rece (µM)	Volum E2 la rece (µl)	Concentrație finală E2 la rece (µM)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum receptor (µl)	Total volum în godeuri
H5	2	La cald	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	La cald	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	La cald	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	La cald	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	La cald	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	La cald	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	La cald	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	La cald	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Este de precizat că godeurile „la cald" sunt goale în timpul incubației. Cantitatea de 40 µl se adaugă doar pentru numărarea scintilației.

Apendicele 2.3:

CONFIGURAȚIA GODEURILOR ÎN ANALIZA LEGĂRII COMPETITIVE

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	A1	1	legare totală	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	legare totală	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	legare totală	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	legare totală	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	legare totală	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	legare totală	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A8	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A9	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	B1	1	E2 la rece	S	S1	2,00 E-07	40	—	40	80	160	1,0 E-07
S	B2	2	E2 la rece	S	S1	2,00 E-07	40	—	40	80	160	1,0 E-07
S	B3	3	E2 la rece	S	S1	2,00 E-07	40	—	40	80	160	1,0 E-07
S	B4	1	E2 la rece	S	S2	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1,0 E-08
S	B5	2	E2 la rece	S	S2	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1,0 E-08
S	B6	3	E2 la rece	S	S2	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1,0 E-08
S	B7	1	E2 la rece	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	B8	2	E2 la rece	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	B9	3	E2 la rece	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	B10	1	E2 la rece	S	S4	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	E2 la rece	S	S4	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	E2 la rece	S	S4	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	E2 la rece	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3,0 E-10
S	C2	2	E2 la rece	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3,0 E-10
S	C3	3	E2 la rece	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3,0 E-10
S	C4	1	E2 la rece	S	S6	2,00 E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	E2 la rece	S	S6	2,00 E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	E2 la rece	S	S6	2,00 E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	E2 la rece	S	S7	2,00 E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	E2 la rece	S	S7	2,00 E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	E2 la rece	S	S7	2,00 E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	soluție săracă	soluție săracă	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	soluție săracă	soluție săracă	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	soluție săracă	soluție săracă	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3,0 E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3,0 E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3,0 E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-07	40		40	80	160	3,0 E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-07	40		40	80	160	3,0 E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-07	40		40	80	160	3,0 E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00 E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00 E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00 E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-08	40	—	40	80	160	3,0 E-08
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-08	40	—	40	80	160	3,0 E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-08	40	—	40	80	160	3,0 E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00 E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00 E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00 E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00 E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00 E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00 E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00 E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00 E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00 E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00 E-07	40	—	40	80	160	3,0 E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00 E-07	40	—	40	80	160	3,0 E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00 E-07	40	—	40	80	160	3,0 E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00 E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00 E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00 E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	H1	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Este de precizat că godeurile „la cald” sunt goale în timpul incubației. Cantitatea de 40 µl se adaugă doar pentru numărarea scintilației.

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	A1	1	legare totală	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	legare totală	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	legare totală	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	legare totală	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	legare totală	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	legare totală	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	C1	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	E1	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E4	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	G1	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 la rece S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 la rece S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 la rece S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 la rece S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 la rece S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 la rece S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Apendicele 3

ANALIZA LEGĂRII RECEPTORULUI DE ESTROGEN *IN VITRO* A INSTITUTULUI DE EVALUARE ȘI CERCETARE ÎN CHIMIE (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE - CERI) CARE UTILIZEAZĂ O PROTEINĂ DIN DOMENIUL DE LEGARE PRIN LIGAND RECOMBINANT UMAN

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Această analiză a legării prin saturație și competitive a receptorului de estrogen ERα *in vitro* utilizează un domeniu de legare a ligandului (LBD) al unui ERα uman (hrERα). Această structură proteică a fost realizată de Institutul de cercetare pentru evaluarea substanțelor chimice (Chemicals Evaluation Research Institute - CERI) din Japonia și există sub formă de proteină de fuziune glutation-S-transferază (GST) și este exprimată în *E. coli*. Protocolul CERI a fost supus unui studiu internațional de validare în mai multe laboratoare (2) care a demonstrat relevanța și fiabilitatea acestuia în scopul prevăzut al analizei.

2. Această analiză este o procedură de depistare pentru identificarea substanțelor care pot lega hrERα. Aceasta este utilizată pentru a stabili capacitatea unei substanțe chimice de testat de a concura cu 17β-estradiol pentru legarea de hrERα-LBD. Rezultatele cantitative ale analizei pot include valoarea IC_{50} (un indicator al concentrației unei substanțe chimice de testat care este necesară pentru a desprinde jumătate din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα) și afinitățile de legare relative ale substanțelor chimice de testat pentru hrERα comparativ cu 17β-estradiol. În scopul depistării substanțelor chimice, rezultatele acceptabile ale analizei calitative pot include clasificări ale substanțelor chimice de testat ca lianți ai hrERα, non-lianți sau substanțe echivoce pe baza criteriilor descrise pentru curbele pentru legare.

3. Analiza folosește un ligand radioactiv care necesită obținerea de către laborator a unei licențe pentru materiale radioactive. Toate procedurile cu radioizotopi și substanțe chimice periculoase ar trebui să respecte regulamentele și procedurile descrise în legislația națională.

4. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „**INTRODUCERE GENERALĂ**” și „**COMPONENTE ALE ANALIZEI DE LEGARE DE hrER**” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta orientare privind testarea sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Analiza legării hrERα măsoară capacitatea unui ligand marcat radioactiv ([^{3}H]17βestradiol) de a se lega de ER în prezența concentrațiilor din ce în ce mai mari ale unei substanțe chimice de testat (și anume, concurent). Substanțele chimice de testat care prezintă o afinitate mare pentru ER concurează cu ligandul marcat radioactiv la o concentrație mai mică în comparație cu substanțele chimice care prezintă o afinitate mai redusă pentru receptor.

6. Această analiză cuprinde două componente principale: un experiment de legare prin saturație pentru a caracteriza parametrii de interacțiune receptor-ligand, urmat de un experiment de legare competitiv care caracterizează concurența dintre o substanță chimică de testat și un ligand marcat radioactiv pentru legarea de ER.

7. Scopul experimentului de legare prin saturație este de a caracteriza un anumit lot de receptori în ceea ce privește afinitatea de legare și numărul în pregătirea pentru experimentul de legare competitivă. Experimentul de legare prin saturație măsoară, în condiții de echilibru, afinitatea unei concentrații fixe a receptorului de estrogen pentru ligandul său natural (reprezentată de constanta de disociere, Kd) și concentrația locurilor cu receptor activ (Bmax).

8. Experimentul de legare competitivă măsoară afinitatea unei substanțe de a concura cu [^{3}H]17β-estradiol pentru legarea de ER. Afinitatea este cuantificată prin concentrația substanței chimice de testat care, în stare de echilibru, inhibă 50 % din legarea specifică a [^{3}H]17β-estradiol (denumită „concentrație inhibitoare de 50 %” sau IC_{50}). Aceasta poate fi evaluată, de asemenea, utilizând afinitatea de legare relativă (RBA, în raport cu valoarea IC_{50} a estradiolului, măsurată separat în cadrul aceluiași test). Experimentul de legare competitivă măsoară legarea [^{3}H]17β-estradiol la o concentrație fixă în prezența unui interval mare (opt ordine de mărime) de concentrații ale substanței chimice de testat. Datele sunt apoi corelate, dacă este posibil, într-o formă de ecuație Hill (Hill, 1910) care descrie desprinderea ligandului radioactiv de către un liant competitiv dintr-un loc. Gradul de desprindere a estradiolului marcat radioactiv, în stare de echilibru, este folosit pentru a caracteriza substanța chimică de testat ca liant, non-liant sau ca o substanță care generează un răspuns echivoc.

PROCEDURA

Demonstrarea performanței acceptabile a proteinei hrERα

9. Înainte de efectuarea sistematică a analizelor de legare prin saturație și de legare competitivă, ar trebui să se demonstreze performanța corespunzătoare a fiecărui nou lot de hrERα în laboratorul în care acesta va fi utilizat. Pentru a demonstra performanța ar trebui să se utilizeze un proces în două etape. Aceste etape sunt următoarele:

— Se desfășoară o analiză de legare a [^{3}H]-17β-estradiol prin saturație pentru a demonstra specificitatea și saturația hrERα. Analiza regresiei non-liniare a acestor date (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) și schița Scatchard ulterioară ar trebui să documenteze afinitățile de legare de hrERα ale [3H]-17β-estradiol (Kd) și numărul receptorilor (Bmax) pentru un anumit lot de hrERα.

— Se desfășoară o analiză de legare competitivă cu ajutorul substanțelor martor [estrogenul de referință (17β-estradiol), un liant slab (de exemplu, noretinodrel sau noredronă) și un nonliant (octiltrietoxisilan, OTES). Fiecare laborator ar trebui să stabilească o bază de date istorică pentru a documenta consecvența IC50 și valorile relevante pentru estrogenul de referință și liantul slab obținute în urma experimentelor și pentru diferite loturi de hrERα. În plus, parametrii curbelor privind legarea competitivă pentru substanțele martor ar trebui să se încadreze în limitele intervalului de încredere de 95 % (a se vedea tabelul 1), acestea fiind dezvoltate pe baza datelor din laboratoarele care au participat la studiul de validare pentru această analiză (2).

Tabelul 1

Criterii de performanță elaborate pentru estrogenul de referință și liantul slab, analiza CERI privind legarea hrER.

Substanță	Parametru	Media [a]	Abaterea standard (n)	Interval de încredere de 95 % [b]	
				Limita inferioară	Limita superioară
17β-estradiol	Partea superioară	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Partea inferioară	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	HillSlope	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	$LogIC_{50}$	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrel	Partea superioară	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Partea inferioară	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	$LogIC_{50}$	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindronă [c]	Partea superioară	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Partea inferioară	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Panta Hill	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	$LogIC_{50}$	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

[a] Media (n) ± abaterea standard (SD) cu mărimea eșantionului (n) au fost calculate utilizând estimările pentru formarea curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în patru laboratoare în timpul studiului de validare (a se vedea anexa N la referința 2).

[b] Intervalele de încredere de 95 % sunt furnizate ca ghid pentru criteriile de acceptabilitate.

[c] Testarea noretindronei a fost opțională pentru sub-sarcina 4 în timpul studiului de validare (a se vedea referința 2, a se vedea sub-sarcina 4). Astfel, media ± SD (n) au fost calculate folosind estimările curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în două laboratoare.
Intervalul pentru IC_{50} va depinde de valoarea Kd specifică preparatului cu receptori și de concentrația ligandului marcat radioactiv utilizat în cadrul fiecărui laborator. Va fi acceptabilă o ajustare adecvată pentru intervalul IC_{50} în funcție de condițiile utilizate pentru desfășurarea analizei.

Demonstrarea competenței laboratorului

10. A se vedea punctele 17 și 18, precum și tabelul 2 din „**COMPONENTE ALE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA DE hrER**" ale acestei metode de testare. Fiecare analiză (legare prin analiză și legare competitivă) ar trebui să conste în trei testări independente (și anume, cu diluții proaspete de receptor, substanțe chimice și reactivi) în zile diferite și fiecare testare ar trebui să cuprindă trei replici.

Determinarea concentrației receptorului (hrERα)

11. Concentrația receptorului activ variază ușor în funcție de lot și de condițiile de păstrare. Din acest motiv, ar trebui să se determine concentrația receptorului activ, astfel cum a fost primită de la furnizor. Aceasta va determina concentrația corespunzătoare a receptorului activ la momentul testării.

12. În condiții corespunzătoare legării competitive (și anume, 0,5 nM [^{3}H]-estradiol), ar trebui să se incubeze concentrații nominale de 0,1, 0,2, 0,4 și 0,6 nM ale receptorului în absența (legare totală) și prezența (legare nespecifică) unei cantități de 1 µM estradiol neetichetat. Legarea specifică, calculată ca diferență între legarea totală și legarea nespecifică, este schițată în comparație cu concentrația nominală a receptorului. Concentrația receptorului, care determină valorile specifice de legare, reprezentând 40 % din marcajul radioactiv adăugat, este corelată cu concentrația receptorului și această concentrație a receptorului ar trebui utilizate pentru experimente de legare prin saturație și legare competitivă. În mod frecvent, o concentrație hrER finală de 0,2 nM va respecta această condiție.

13. În cazul în care criteriul de 40 % nu poate fi respectat în mod repetat, ar trebui verificat setul experimental pentru identificarea unor posibile erori. Nerespectarea criteriului de 40 % poate indica faptul că există foarte puțini receptori activi în lotul recombinant și ar trebui atunci să se aibă în vedere utilizarea altui lot de receptori.

Analiza saturației

14. Ar trebui să se evalueze opt concentrații din ce în ce mai mari de [^{3}H]17β-estradiol în trei replici, în următoarele trei condiții (a se vedea tabelul 2):

a. în absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în prezența ER. Astfel se determină legarea totală prin măsurarea radioactivității în godeurile care au doar [^{3}H]17β-estradiol.

b. În prezența unei concentrații multiplicate de 2000 de ori de 17β-estradiol nemarcat peste 17β-estradiol marcat și în prezența ER. Intenția acestei condiții este de a satura locurile cu legare activă cu 17β-estradiol nemarcat și, prin măsurarea radioactivității în godeuri, de a determina legarea nespecifică. Orice cantitate de estradiol rămasă la cald, care se poate lega de receptor, se consideră că se leagă într-un loc nespecific, întrucât cantitatea de estradiol rece ar trebui să fie într-o concentrație atât de mare încât să se lege de toate locurile specifice disponibile de pe receptor.

c. În absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în absența ER (determinarea radioactivității totale)

Preparatul de [^{3}H]-17β-estradiol, soluții 17β-estradiol nemarcate și hrERα

15. Ar trebui să se prepare o soluție 40 nM de [^{3}H] -17β-estradiol dintr-o soluție mamă de 1 µM de [^{3}H]-17β-estradiol în DMSO, prin adăugarea DMSO (pentru prepararea a 200 nM) și soluție-tampon de analiză la temperatura camerei (pentru a prepara 40 nM). Folosind această soluție de 40 nM, se prepară seria de diluții [^{3}H]-17β-estradiol, variind între 0,313 nM și 40 nM cu soluție-tampon de analiză la temperatura camerei (astfel cum a fost reprezentat pe rândul 12 din tabelul 2). Concentrațiile finale de analiză, cuprinse între 0,0313 și 4,0 nM, se vor obține prin adăugarea a 10 µl din aceste soluții la godeurile de analiză respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri (a se vedea tabelele 2 și 3). Prepararea soluției tampon de analiză, calcularea soluției mamă inițiale de [^{3}H]17βestradiol pe baza activității sale specifice, prepararea diluțiilor și determinarea concentrațiilor sunt descrise în detaliu în protocolul CERI (2).

16. Diluțiile soluțiilor cu 17β-estradiol nemarcate ar trebui să se prepare dintr-o soluție mamă de 1 μM 17β-estradiol prin adăugarea de soluție-tampon de analiză pentru a obține opt concentrații în creștere, cu valori inițiale de la 0,625 μM la 80 μM. Concentrațiile finale de analiză, cuprinse între 0,0625 și 8 μM, se vor obține prin adăugarea a 10 μl din aceste soluții la godeurile de analiză respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri prevăzută pentru măsurarea legării nespecifice (a se vedea tabelele 2 și 3). Prepararea diluțiilor 17β-estradiol nemarcate este descrisă în detaliu în protocolul CERI (2).

17. Ar trebui să fie utilizată concentrația receptorului care prezintă o legare specifică de 40 ± 10 % (a se vedea punctele 12-13). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată cu soluție-tampon de analiză foarte rece, imediat înainte de utilizare, și anume, după ce au fost preparate toate godeurile pentru legare totală, legare nespecifică și doar ligandul la cald.

18. Plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri sunt pregătite astfel cum este ilustrat în tabelul 2, cu trei replici per concentrație de [^{3}H]-17β-estradiol. Distribuirea volumului de [^{3}H]17βestradiol, de 17β-estradiol nemarcat, de soluție tampon și de receptor este prezentată în tabelul 3.

Tabelul 2

Distribuția pe placa de microtitrare în cadrul analizei privind legarea prin saturație

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Pentru măsurarea TB			Pentru măsurarea NSB			Doar pentru determinarea ligandului la cald				Diluții E2 nemarcate pentru coloanele 46 de pe placă	[^{3}H] Diluții E2 pentru coloanele 1-9 de pe placă
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: legare totală,
NSB: legare nespecifică
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradiol
E2: 17β-estradiol nemarcat
(*) Concentrațiile indicate aici sunt concentrațiile finale din fiecare godeu.
(**) Diluțiile soluției E2 nemarcate și a [^{3}H]E2 pot fi preparate pe o placă diferită.

Tabelul 3

Volume ale reactivilor pentru placa de microtitrare cu saturație

Număr rând		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Etape de preparare		Godeuri TB			Godeuri NSB			Doar ligand la cald		
Volumul componentelor pentru godeurile de reacție de mai sus și ordinea adăugării	Soluție-tampon	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 nemarcat din rândul 11 din tabelul 2	—			10 µl			—		
	[3H]E2 de pe rândul 12 din tabelul 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Volumul total al reacției		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubație		**REACȚIE DUPĂ INCUBAȚIE DE DOUĂ ORE**						Cuantificarea radioactivității imediat după preparare. Fără incubație		
Tratament cu 0,4 % DCC		Da			Da			**Nr.**		
Volumul DCC 0,4 %		100 µl			100 µl			—		
Filtrare		Da			Da			Nr.		
MĂSURAREA DPMS										
Volumul de cuantificare adăugat la cocteilul de scintilație		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Dacă se utilizează LSC pentru microplăci pentru măsurarea dpms, nu este adecvată doar prepararea ligandului la cald pe aceeași placă de analiză cu godeuri TB și NSB. Doar ligandul la cald ar trebui să fie preparat pe o placă diferită.

(**) Dacă se utilizează centrifugarea pentru separarea DCC, cantitatea de 50 µl de supernatant ar trebui să fie măsurată prin LSC pentru a se evita contaminarea DCC.

19. Plăcile de microtitrare pentru analiză pentru determinarea legării totale și a legării nespecifice ar trebui să fie incubate la temperatura camerei (22 °C-28 °C) timp de două ore.

Măsurarea [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα

20. După perioada de incubație de două ore, [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα ar trebui să fie separat de [^{3}H]-17β-estradiol liber prin adăugarea a 100 µl de suspensie DCC 0,4 % rece ca gheața în godeuri. Plăcile ar trebui apoi să fie plasate pe gheață timp de 10 minute, iar amestecul de reacție și suspensia DCC ar trebui să fie filtrate, prin transferarea într-un filtru al plăcii de microtitrare, pentru eliminarea DCC. Apoi ar trebui să se adauge 100 µl de soluție filtrată în lichidul de scintilație din fiole cu LSC pentru determinarea dezintegrării pe minut (dpms) pe fiolă prin numărare în scintilație lichidă.

21. Alternativ, dacă nu este disponibilă un filtru pe microplacă, suspensia DCC poate fi îndepărtată prin centrifugare. Apoi ar trebui să se extragă cu multă atenție o cantitate de 50 µl de supernatant care conține [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα pentru a evita orice contaminare a godeurilor prin atingerea DCC, și care ar trebui să fie utilizată pentru numărare în scintilație.

22. Condiția de unic ligand cald se utilizează pentru determinarea dezintegrării pe minut (dpm) a [^{3}H]-17β-estradiol adăugat în godeurile de analiză. Radioactivitatea ar trebui să fie cuantificată imediat după preparare. Aceste godeuri nu ar trebui să fie incubate și nu ar trebui să fie tratate cu suspensie DCC, dar conținutul lor ar trebui să fie golit direct în lichidul de scintilație. Aceste măsuri demonstrează cât de mult [3H]-17β-estradiol, în DPMS, a fost adăugat în fiecare set de godeuri pentru legarea totală și legarea nespecifică.

Analiza privind legarea competitivă

23. Analiza privind legarea competitivă măsoară gradul de legare al unei singure concentrații de [^{3}H]-17β-estradiol în prezența unor concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. La fiecare concentrație din cadrul unei testări ar trebui să se utilizeze trei replici concomitent. În plus, pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să se efectueze trei teste la momente diferite. Substanțele pentru analiză ar trebui să fie configurate pe una sau mai multe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri.

Martori

24. Atunci când se efectuează analiza, ar trebui să se includă în fiecare experiment solventul și martorii tratați în paralel (și anume, estrogenul de referință, liantul slab și non-liantul). Pe fiecare placă, în timpul fiecărei testări, ar trebui să se utilizeze curbe complete de concentrații pentru estrogenul de referință și martori (și anume, liant slab și non-liant). Toate celelalte plăci ar trebui să conțină (i) E2 și un liant slab în trei replici la o concentrație ridicată (desprindere maximă, și anume, desprindere aproximativ integrală a ligandului marcat radioactiv) și medie (aproximativ IC_{50}); (ii) martor tratat cu solvent și legare nespecifică, fiecare în trei replici. Procedurile pentru prepararea soluției-tampon de analiză, [^{3}H]-17β-estradiol, hrERα și a soluțiilor cu substanță chimică de testat sunt descrise detaliat în protocolul CERI (2).

Martor tratat cu solvent:

25. Martorul tratat cu solvent indică faptul că solventul nu interacționează cu sistemul de testare și, de asemenea, măsoară legarea totală (TB). Solventul preferat este DMSO. În mod alternativ, în cazul în care cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat nu este solubilă în DMSO, poate fi utilizat etanol. Concentrația DMSO în godeurile de analiză finale ar trebui să fie de 2,05 % și ar putea fi mărită până la 2,5 % în cazul în care substanța chimică de testat este lipsită de solubilitate. Nu ar trebui să se utilizeze concentrații DMSO peste 2,5 % din cauza interferenței unor concentrații mai mari de solvenți cu analiza. Pentru substanțele chimice de testat care nu sunt solubile în DMSO, dar sunt solubile în etanol, se poate utiliza o soluție de maxim 2 % etanol în analiză, fără interferențe.

Martor tampon:

26. Martorul tampon (BC) nu ar trebui să conțină nici solvent, nici substanță chimică de testat, ci toate celelalte componente ale analizei. Rezultatele martorului tampon sunt comparate cu martorul tratat cu solvent pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză.

Liant puternic (estrogen de referință)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) este ligandul endogen și se leagă cu un grad de afinitate mare de ER, subtipul alfa. Pentru fiecare analiză privind legarea competitivă hrERα ar trebui să se pregătească o curbă standard utilizând 17β-estradiol nemarcat pentru a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp, în același laborator. Ar trebui să se prepare opt soluții de 17β-estradiol nemarcat în DMSO și în soluția-tampon de analiză, iar concentrațiile finale din godeurile de analiză vor fi utilizate pentru curba standard , cu următoarea repartizare: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Cea mai mare concentrație de 17β-estradiol nemarcat (1 µM) ar trebui să servească drept indicator al legării nespecifice. Această concentrație se distinge prin eticheta „NSB” în tabelul 4, chiar dacă aceasta este, de asemenea, integrată în curba standard.

Liant slab

28. Un liant slab [noretinodrel (CAS 68-23-5) sau, ca alternativă, noretindronă (CAS 68-22-40] ar trebui să fie inclus pentru a demonstra sensibilitatea fiecărui experiment și a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp. Ar trebui să se prepare opt soluții de liant slab în DMSO și în soluția-tampon de analiză, iar concentrațiile finale din godeurile de analiză fiind următoarele: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} și 10^{-9} M.

Non-liant

29. Ca martor negativ ar trebui să se utilizeze octiltrietoxisilan (OTES, CAS 2943-75-1) (nonliant). Acesta asigură faptul că, așa cum este efectuată analiza, aceasta va detecta substanțele chimice de testat care nu se leagă de hrERα. Ar trebui să se prepare opt soluții de non-liant în DMSO și în soluția-tampon de analiză, iar concentrațiile finale din godeurile de analiză fiind următoarele: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Ftalatul de dinbutil (DBP, CAS 84-72-2) poate fi utilizat ca non-liant alternativ, însă poate fi testat doar la maxim 10^{-4}M. S-a demonstrat că solubilitatea maximă a DBP în cadrul analizei este 10^{-4}M.

Concentrația hrERα

30. Ar trebui să fie utilizată cantitatea de receptori care prezintă o legare specifică de 40 ± 10 % (a se vedea punctele 12-13 din apendicele 3). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată prin diluția hrERα funcțional în soluție-tampon de analiză rece ca gheața, imediat înainte de utilizare.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Concentrația [^{3}H]-17β-estradiol finală în godeurile de analiză ar trebui să fie de 0,5 nM.

Substanțe chimice de testat

32. În primul rând, trebuie să se efectueze un test al solubilității pentru a determina limita de solubilitate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru a identifica intervalul de concentrații adecvat care să fie utilizat la efectuarea protocolului de testare. Limita de solubilitate a fiecărei substanțe chimice de testat va fi determinată inițial în solvent și confirmată ulterior în condiții de testare. Concentrația finală testată în cadrul analizei nu ar trebui să depășească 1 mM. Testul pentru identificarea intervalului cuprinde un martor tratat cu solvent și diluții în serie de cel puțin 8 log, pornind de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, cel mult 1 mM, în funcție de limita de solubilitate), și se consemnează gradul de tulburare sau precipitatul (a se vedea, de asemenea, punctul 35 din apendicele 3). După ce se determină intervalul de concentrații pentru testare, o substanță chimică de testat ar trebui să fie testată folosind concentrații de 8 log repartizate în mod corespunzător, astfel cum este definit în testul preliminar de stabilire a intervalului. Concentrațiile testate în cel de-al doilea și cel de-al treilea experiment ar trebui să fie apoi ajustate după caz pentru o mai bună caracterizare a curbei concentrație-răspuns, dacă este necesar.

33. Diluțiile substanței chimice de testat ar trebui să fie preparate în solvent adecvat (a se vedea punctul 25 din apendicele 3). În cazul în care concentrația maximă a substanței chimice de testat nu este solubilă nici în DMSO, nici în etanol, iar dacă se adaugă mai mult solvent, concentrația solventului în eprubeta finală ar fi mai mare decât limita acceptabilă, concentrația maximă poate fi redusă la următoarea concentrație inferioară. În acest caz, se poate adăuga o concentrație suplimentară la limita inferioară a seriei de concentrații. Alte concentrări din cadrul seriei ar trebui să rămână neschimbate.

34. Soluțiile cu substanță chimică de testat ar trebui să fie monitorizate atent atunci când se adaugă la godeul de analiză, deoarece substanța chimică testată se poate precipita atunci când este adăugată în acesta. Datele pentru toate godeurile care conțin precipitat ar trebui să fie excluse de la formarea curbei, iar motivul excluderii datelor ar trebui să fie consemnat.

35. În cazul în care există informații anterioare din alte surse care furnizează o valoare log(IC_{50}) pentru o substanță chimică de testat, ar putea fi adecvat ca diluțiile să se repartizate geometric mai apropiate, în jurul valorii preconizate log(IC_{50}) (și anume, 0,5 unități de log). Rezultatele finale ar trebui să reflecte o marjă suficientă de concentrații pe fiecare parte a valorii log(IC50), inclusiv pe partea superioară și cea inferioară, astfel încât curba pentru legătură să poată fi caracterizată în mod corespunzător.

Organizara plăcii de analiză

36. Ar trebui să se pregătească plăci de microtitrare etichetate utilizând incubații în șase replici pentru martorul tratat cu solvent, cea mai mare concentrație a estrogenului de referință (E2), care constituie, de asemenea, un indicator al legăturii nespecifice (NSB), soluția-tampon martor și incubații în trei replici pentru fiecare dintre cele opt concentrații ale martorului non-liant (octiltrietoxisilan), cele șapte concentrații inferioare pentru estrogenul de referință (E2), cele opt concentrații ale liantului slab (noretinodrel sau noretindronă) și cele opt concentrații ale fiecărei substanțe chimice de testat (TC). În tabelul 4 de mai jos este prezentat un exemplu de model de diagramă a plăcii pentru curbele de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martori. Se utilizează plăci de microtitrare suplimentare pentru substanța chimică de testat, care ar trebui să includă martori pe placă [și anume, (i) E2 și un liant slab în trei replici având o concentrație ridicată (desprindere maximă) și medie (de aproximativ IC_{50}); (ii) martor tratat cu solvent (ca legare totală) și soluție de legare nespecifică, fiecare în șase replici (tabelul 5). În apendicele 3.3 este prezentat un exemplu de fișă de configurare a plăcilor de microtitrare pentru analiză competitivă, care utilizează trei substanțe chimice de testat necunoscute. Concentrațiile indicate în fișa de lucru, precum și în tabelele 4 și 5 se referă la concentrațiile finale utilizate în fiecare godeu de analiză. Concentrația maximă pentru E2 ar trebui să fie 1×10^{-7} M, iar pentru liantul slab, ar trebui să se utilizeze cea mai mare concentrație utilizată pentru liantul slab pe placa 1. Concentrația IC_{50} trebuie să fie stabilită de laborator pe baza bazei sale de date cu martori testați anterior. Se preconizează că această valoare va fi similară cu cea observată în studiile de validare (a se vedea tabelul 1).

Tabelul 4

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare ([1]), ([2])**curbe de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martori (placa 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Martor tampon și martor pozitiv (E2)			Slab pozitiv (noretinodrel)			Martor negativ (OTES)			TB și NSB		
A	Soluție săracă (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (martor tratat cu solvent) (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			Martor tampon		
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			Soluție săracă (pentru mediu la cald) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Eșantion constituit pentru placa de microtitrare standard pentru a fi analizată în cadrul fiecărui experiment.
([2]) Este de precizat că această placă de microtitrare se aranjează utilizând diluțiile efectuate pe placa de diluții descrisă pentru standardele din secțiunile anterioare.
În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)
(*) soluție săracă reală, godeul nu este utilizat
(**) soluția săracă nu a fost utilizată în timpul incubației, ci pentru a confirma radioactivitatea totală adăugată.

Tabelul 5

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare, plăci suplimentare pentru substanțele chimice de testat (TC) și martorii de pe placă.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Substanța chimică de testat-1 (TC-1)			Substanța chimică de testat-2 (TC-2)			Substanța chimică de testat-3 (TC-3)			Martori		
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 (Martor tratat cu solvent)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)

Încheierea analizei privind legarea competitivă

37. Cu excepția godeurilor pentru legare totală și soluții sărace (pentru medii calde), astfel cum se arată în tabelul 6, 50 µl de soluție-tampon de analiză ar trebui să se introducă în fiecare godeu și să se amestece cu 10 µl de martor tratat cu solvent, estrogen de referință (E2), liant slab, non-liant și, respectiv, substanțe chimice de testat, respectiv 10 µl de soluție [3H]-17β-estradiol de 5 nM. Apoi o cantitate de 30 µl de soluție receptoare rece ca gheața a fost adăugată în fiecare placă și amestecată ușor. Soluția hrERα ar trebui să fie ultimul reactiv de adăugat. Plăcile de microtitrare de analiză ar trebui să fie incubate la temperatura camerei (22°-28 °C) timp de 2 ore.

Tabelul 6

Volumul componentelor de analiză pentru testul privind legarea competitivă hrER, plăci de microtitrare

Etape de preparare		Altele decât godeurile TB	Godeuri TB	Soluție săracă (pentru mediu cald)
Volumul componentelor pentru godeurile de reacție de mai sus și ordinea adăugării	Soluție-tampon de analiză la temperatura camerei	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 nemarcat, liant slab, non-liant, solvent și substanțe chimice de testat (*)	10 µl	–	–
	[3H]-17β-estradiol pentru a produce o concentrație finală de 0,5 nM (adică 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	concentrația hrERα astfel cum este determinată (a se vedea punctele 12-13)	30 µl	30 µl	—
Volumul total în fiecare godeu de analiză		100 µl	100 µl	100 µl

(*) preparat corespunzător pentru a obține concentrația finală în limitele de concentrație acceptabile ale solventului

38. Cuantificarea legării [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, în urma separării [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα de [^{3}H]-17β-estradiol liber, prin adăugarea, în fiecare godeu, a 100 µl de suspensie DCC rece ca gheața, ar trebui să fie efectuată astfel cum este descris la punctele 21-23 din apendicele 3 pentru analiza privind legarea prin saturație.

39. Godeurile G10-12 și H10-12 [identificate ca având soluție săracă (pentru mediu cald) în tabelul 4] reprezintă DPMS al [3H]-estradiol marcat în 10 µl. Partea alicotă de 10 µl ar trebui să fie introdusă direct în lichidul de scintilație.

Criterii de acceptabilitate

Analiza privind legarea prin saturație

40. Curba specifică privind legarea ar trebui să ajungă la un platou, întrucât au fost utilizate concentrații crescătoare de [^{3}H]-17β-estradiol, care indică saturația hrERα cu ligandul.

41. Legarea specifică la 0,5 nM de [^{3}H]-17β-estestradiol ar trebui să fie situată în intervalul acceptabil 30 %-50 % din radioactivitatea totală măsurată medie adăugată de la o testare la alta. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine, iar analiza saturației ar trebui să fie repetată.

42. Datele ar trebui să producă o reprezentare grafică liniară Scatchard.

43. Legarea nespecifică nu ar trebui să fie excesivă. Valoarea pentru legarea nespecifică ar trebui, de regulă, să fie < 35 % din legarea totală. Însă, raportul poate depăși ocazional această limită atunci când se măsoară valoarea dpm foarte scăzută pentru concentrația minimă a substanței 17β-estradiol marcat radioactiv testate.

Analiza privind legarea competitivă

44. Concentrațiile din ce în ce mai mari de 17β-estradiol nemarcat ar trebui să desprindă [^{3}H]17β-estradiol de receptor într-un mod compatibil cu o legarea competitivă dintr-un singur punct.

45. Valoarea IC_{50} pentru estrogenul de referință (și anume, 17β-estradiol) ar trebui să fie aproximativ egal cu concentrația molară a [^{3}H]-17β-estradiol, plus valorile Kd determinate din analiza privind legarea prin saturație.

46. Legarea specifică totală ar trebui să se situeze în mod consecvent în intervalul acceptabil de 40 ± 10 % atunci când concentrația medie măsurată a radioactivității totale adăugate în fiecare godeu a fost de 0,5 nM în toate testele. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine.

47. Solventul nu ar trebui să modifice sensibilitatea sau reproductibilitatea analizei. Rezultatele martorului tratat cu solvent (godeuri TB) sunt comparate cu martorul tampon pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză. Rezultatele pentru TB și martorul tampon ar trebui să fie comparabile în cazul în care nu există niciun efect al solventului asupra analizei.

48. Non-liantul nu ar trebui să desprindă mai mult de 25 % din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα atunci când se testează maxim 10^{-3} M (OTES) sau 10^{-4} M (DBP).

49. Au fost elaborate criterii de performanță pentru estrogenul de referință și doi lianți slabi (de exemplu, noretinodrel, noretindronă), utilizând date din studiul de validare a analizei CERI privind legarea hrER (anexa N la referința 2). Sunt prezentate intervale de încredere de 95 % pentru medie +/- SD (n) pentru toate testele pe martori din cadrul celor patru laboratoare care au participat la studiul de validare. Au fost calculate intervale de încredere de 95 % pentru parametrii de formare a curbei (și anume, partea superioară, partea inferioară, Hillslope și logIC_{50}) pentru estrogenul de referință și lianții slabi, precum și pentru valoarea $\log_{10}$RBA a lianților slabi în raport cu estrogenul de referință. Tabelul 1 furnizează intervalele preconizate pentru parametrii de formare a curbei care pot fi utilizați ca și criterii de performanță. În practică, intervalul IC_{50} poate varia ușor, în funcție de valoarea Kd derivată experimental a preparatul cu receptori și de concentrația ligandului utilizaztă pentru analiză.

50. Nu au fost elaborate criterii de performanță pentru parametrii de formare a curbei în cazul substanțelor chimice de testat din cauza gamei largi de substanțe chimice de testat posibile și a variației posibilelor afinități și rezultatele (de exemplu, curbă completă, curbă parțială, fără formă de curbă). Însă, la analizarea rezultatelor din cadrul fiecărei testări, în cazul unei substanțe chimice de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională. Ar trebui să se utilizeze un interval suficient de concentrații ale substanței chimice de testat pentru a defini cu claritate partea superioară (de exemplu, o legare de 90-100 %) a curbei de legare competitivă. Variabilitatea între replici la fiecare concentrație a substanței chimice de testat, precum și între cele trei teste independente ar trebui să fie rezonabilă și justificată din punct de vedere științific. Martorii din cadrul fiecărei serii, pentru o substanță chimică de testat, ar trebui să se apropie de măsurile de performanță raportate pentru această analiză FW și să fie în concordanță cu datele privind martorii testați anterior din fiecare laborator.

ANALIZA DATELOR

Analiza privind legarea prin saturație

51. Se măsoară atât legarea totală, cât și cea nespecifică. Pornind de la aceste valori, se calculează legarea specifică a [^{3}H]-17β-estradiol, în condiții de echilibru, la concentrații în creștere, scăzând valoarea legării nespecifice din total. Un grafic al legării specifice versus concentrația [^{3}H]-17β-estradiol ar trebui să ajungă al un platou pentru o legare specifică maximă care indică o saturație a hrERα cu [^{3}H]-17β-estradiol. În plus, analiza datelor ar trebui să documenteze legarea [^{3}H]-17β- estradiol de un singur loc de legare cu un grad ridicat de afinitate. Legarea nespecifică, cea totală și cea specifică ar trebui să fie ilustrate pe o curbă de legare prin saturație. În cadrul unei analize ulterioare a acestor date ar trebui să se utilizeze o analiză de regresie neliniară (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) cu o reprezentare finală a datelor sub forma unui grafic Scatchard.

52. Prin analiza datelor ar trebui să se determine valorile Bmax și Kd doar din datele privind legarea totală, pe baza ipotezei că legarea nespecifică este liniară, cu excepția cazului în care se justifică utilizarea unei metode diferite. În plus, ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Ar trebui să se precizeze metoda aleasă pentru regresia robustă. Ar trebui să se recurgă întotdeauna la corecția pentru sărăcirea ligandului (de exemplu, utilizând metoda lui Swillens, 1995) atunci când se determină valorile Bmax și Kd din datele privind legarea prin saturație.

Analiza privind legarea competitivă

53. Curba de legare competitivă este reprezentată grafic ca fiind o legare specifică [^{3}H]17βestradiol versus concentrația (unități de log10) soluției testate în paralel. Concentrația substanței chimice de testat care inhibă 50 % din legarea specifică maximă a [^{3}H]-17β-estradiol constituie valoarea IC_{50}.

54. Estimările valorilor log(IC_{50}) pentru martorii pozitivi (de exemplu, estrogenul de referință și liantul slab) ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Partea superioară, cea inferioară, panta și log(IC_{50}) ar trebui, în general, să rămână necondiționate atunci când se formează aceste curbe. Ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Nu ar trebui să se recurgă la corecția pentru sărăcirea ligandului. În urma analizei inițiale, ar trebui să se examineze fiecare curbă de legare pentru a asigura o corelare corespunzătoare cu modelul. Afinitatea de legare relativă (RBA) a unui liant slab ar trebui să se calculeze ca procent din log (IC_{50}) pentru liantul slab raportat la valoarea log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol. Rezultatele martorilor pozitivi și ale martorului non-liant ar trebui să fie evaluate utilizând valorile de măsurare a performanței analizei de la punctele 44-49 din prezentul apendice 3.

55. Datele pentru toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie analizate printr-o abordare etapizată pentru a se asigura analizarea corespunzătoare a datelor și clasificarea corectă a fiecărei curbe de legare competitivă. Se recomandă ca fiecare testare pentru o substanță chimică de testat să fie supusă inițial unei analize a datelor standardizată care este identică cu cea utilizată pentru estrogenul de referință și lianții slabi martori (a se vedea punctul 54 din prezentul apendice 3). După încheierea analizei, ar trebui să fie efectuată o analiză tehnică a parametrilor curbei și o verificare vizuală a modului în care datele se încadrează pe curba de legare competitivă generată pentru fiecare testare. În timpul acestei analize tehnice, observațiile privind o scădere dependentă de concentrație în procentul [^{3}H]17βestradiol legat în mod specific, variabilitatea scăzută între replicile tehnice la fiecare concentrație chimică și consecvența parametrilor de corelare între cele trei teste constituie indicații bune pentru faptul că analiza și analizele datelor au fost efectuate în mod corespunzător.

Interpretarea datelor

56. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi un liant pentru hrERα în cazul în care poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns în intervalul de date este sub 50 % (figura 1).

57. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi un non-liant pentru hrERα dacă:

— poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată, situat în intervalul de date, este mai mare de 75 % sau

— nu poate fi formată o curbă de legare, iar media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.

58. Substanțele chimice de testat sunt considerate echivoce dacă nu este îndeplinită niciuna dintre condițiile de mai sus (de exemplu, punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

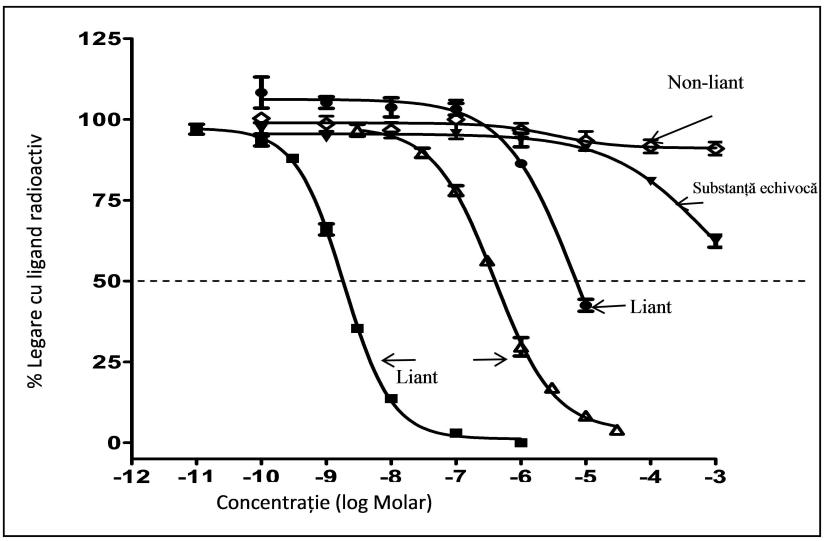
Tabelul 7

Criterii pentru clasificare pe baza curbei de legare competitive pentru o substanță chimică de testat.

Clasificare	Criterii
Liant[a]	Se poate forma o curbă de legare. **Punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este mai mic de 50 %.**
Non-liant[b]	Dacă se poate forma o curbă de legare, **punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este peste 75 %.** Dacă nu se poate forma o curbă de legare, **media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.**
Substanță echivocă[c]	Orice substanță care poate fi testată și care nu este nici liant, nici non-liant de exemplu, punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

Figura 1

Exemple de clasificare a unei substanțe chimice de testat utilizând curba de legare competitivă.



59. Se combină mai multe testări realizate într-un laborator pentru o substanță chimică de testat prin atribuirea de valori numerice fiecărei testări și calcularea mediei testelor, astfel cum se arată în tabelul 8. Rezultatele pentru testele combinate din fiecare laborator sunt comparate cu clasificarea preconizată pentru fiecare substanță chimică de testat.

Tabelul 8

Metoda de clasificare a substanței chimice de testat utilizând teste multiple în cadrul unui laborator

Pentru atribuirea unei valori fiecărei testări:	
Clasificare	**Valoare numerică**
Liant	2
Substanță echivocă	1
Non-liant	0
Pentru clasificarea mediei valorilor numerice ale testelor:	
Clasificare	**Valoare numerică**
Liant	Media ≥ 1,5
Substanță echivocă	0,5 ≤ media < 1,5
Non-liant	Media < 0,5

RAPORTUL TESTULUI

60. A se vedea punctul 24 din „COMPONENTELE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA hrER” din prezenta metodă de testare.

Apendicele 3.1

Listă de Termeni

[^{3}H]E2: 17β-estradiol marcat radioactiv cu tritiu

DCC: Cărbune acoperit cu dextran

E2: 17β-estradiol nemarcat (inert)

Soluția-tampon de analiză: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, conținând 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % Glycerol, 0,2 mM Leupeptin, 1 mM Dithiothreitol și 10 mg/ml albumină serică bovină

hrERα: Receptor de estrogen recombinant uman alfa (domeniu de legare cu ligand)

Replică: Unul dintre multiplele godeuri care conțin același conținut la aceleași concentrații și sunt analizate în paralel în cadrul unei singure testări. În acest protocol, fiecare concentrație a substanței chimice de testat este testată în trei replici; cu alte cuvinte, există trei replici care sunt testate simultan la fiecare concentrație a substanței chimice de testat.

Testare: Un set complet de godeuri de pe o placă de microtitrare testate în paralel, care oferă toate informațiile necesare pentru a caracteriza legarea unei substanțe chimice de testat de hrERα (și anume, [^{3}H]-17β-estradiol total adăugat în godeul de analiză, legarea maximă a [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, legarea nespecifică și legarea totală la diferite concentrații ale substanței chimice de testat). O testare ar putea consta dintr-un singur godeu de analiză (și anume, replică) per concentrație, dar, deoarece acest protocol impune efectuarea analizei pe trei replici, o testare constă din trei godeuri de analiză per concentrație. În plus, acest protocol necesită trei teste independente (și anume, neefectuate în paralel) pe substanță chimică.

Apendicele 3.2

CONFIGURAȚIA GODEURILOR ÎN ANALIZA LEGĂRII COMPETITIVE

Placă	**Poziție**	**Replică**	**Tip godeu**	**Cod godeu**	**Cod concentrație**	**Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)**	**Soluție mamă hrER (µl)**	**Volum soluție-tampon (µl)**	**Volum detector (E2 la cald) (µL)**	**Volum din placa de diluție (µL)**	**Volum final (µl)**	**Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)**
S	A1	1	Soluție săracă	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Soluție săracă	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Soluție săracă	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 la rece	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	E2 la rece	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	E2 la rece	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	E2 la rece	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	E2 la rece	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	E2 la rece	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	E2 la rece	S	S3	3,16 E-09	30	50	10	10	100	3,2 E-10
S	D2	2	E2 la rece	S	S3	3,16 E-09	30	50	10	10	100	3,2 E-10

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	D3	3	E2 la rece	S	S3	3,16 E-09	30	50	10	10	100	3,2 E-10
S	E1	1	E2 la rece	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	E2 la rece	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	E2 la rece	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	E2 la rece	S	S5	3,16 E-08	30	50	10	10	100	3,2 E-09
S	F2	2	E2 la rece	S	S5	3,16 E-08	30	50	10	10	100	3,2 E-09
S	F3	3	E2 la rece	S	S5	3,16 E-08	30	50	10	10	100	3,2 E-09
S	G1	1	E2 la rece	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	E2 la rece	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	E2 la rece	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	E2 la rece	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	E2 la rece	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	E2 la rece	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E-07	30	50	10	10	100	3,2 E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E-07	30	50	10	10	100	3,2 E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E-07	30	50	10	10	100	3,2 E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E-06	30	50	10	10	100	3,2 E-07

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E-06	30	50	10	10	100	3,2 E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E-06	30	50	10	10	100	3,2 E-07
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E-05	30	50	10	10	100	3,2 E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E-05	30	50	10	10	100	3,2 E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E-05	30	50	10	10	100	3,2 E-06
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E-04	30	50	10	10	100	3,2 E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E-04	30	50	10	10	100	3,2 E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E-04	30	50	10	10	100	3,2 E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (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

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (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	OTES8 DBP7	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	legare totală	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	legare totală	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	legare totală	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	legare totală	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	B11	5	legare totală	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	legare totală	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	E2 la rece (ridicat)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	E2 la rece (ridicat)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	E2 la rece (ridicat)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Martor tampon	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Martor tampon	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Martor tampon	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Martor tampon	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Martor tampon	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H1	—	90	—	10	—	100	—

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	G11 (*)	2	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Necunoscut 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Necunoscut 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Necunoscut 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Necunoscut 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Necunoscut 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Necunoscut 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Necunoscut 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Necunoscut 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Necunoscut 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	D1	1	Necunoscut 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Necunoscut 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Necunoscut 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Necunoscut 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Necunoscut 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Necunoscut 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Necunoscut 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Necunoscut 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Necunoscut 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Necunoscut 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Necunoscut 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Necunoscut 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Necunoscut 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Necunoscut 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	H3	3	Necunoscut 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Necunoscut 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Necunoscut 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Necunoscut 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Necunoscut 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Necunoscut 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Necunoscut 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Necunoscut 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Necunoscut 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Necunoscut 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Necunoscut 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Necunoscut 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Necunoscut 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Necunoscut 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	E5	2	Necunoscut 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Necunoscut 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Necunoscut 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Necunoscut 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Necunoscut 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Necunoscut 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Necunoscut 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Necunoscut 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Necunoscut 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Necunoscut 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Necunoscut 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Necunoscut 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Necunoscut 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Necunoscut 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	B7	1	Necunoscut 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Necunoscut 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Necunoscut 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Necunoscut 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Necunoscut 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Necunoscut 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Necunoscut 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Necunoscut 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Necunoscut 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Necunoscut 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Necunoscut 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Necunoscut 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Necunoscut 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Necunoscut 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	F9	3	Necunoscut 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Necunoscut 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Necunoscut 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Necunoscut 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Necunoscut 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Necunoscut 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Necunoscut 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Martor E2 (max)	S	E2 max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Martor E2 (max)	S	E2 max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Martor E2 (max)	S	E2 max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Martor E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Martor E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Martor E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	C10	1	Martor NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C11	2	Martor NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C12	3	Martor NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	D10	1	Martor NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Martor NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Martor NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	E2 la rece (ridicat)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	E2 la rece (ridicat)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	E2 la rece (ridicat)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	G10	1	legare totală	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	legare totală	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	legare totală	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	legare totală	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	legare totală	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	legare totală	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	-

(*) Este de precizat că godeurile „la cald” sunt goale în timpul incubației. Cantitatea de 10 µl se adaugă doar pentru numărarea scintilației.

Apendicele 4

CONSIDERAȚII PENTRU ANALIZA DATELOR DIN ANALIZA PRIVIND LEGAREA COMPETITIVĂ HREH

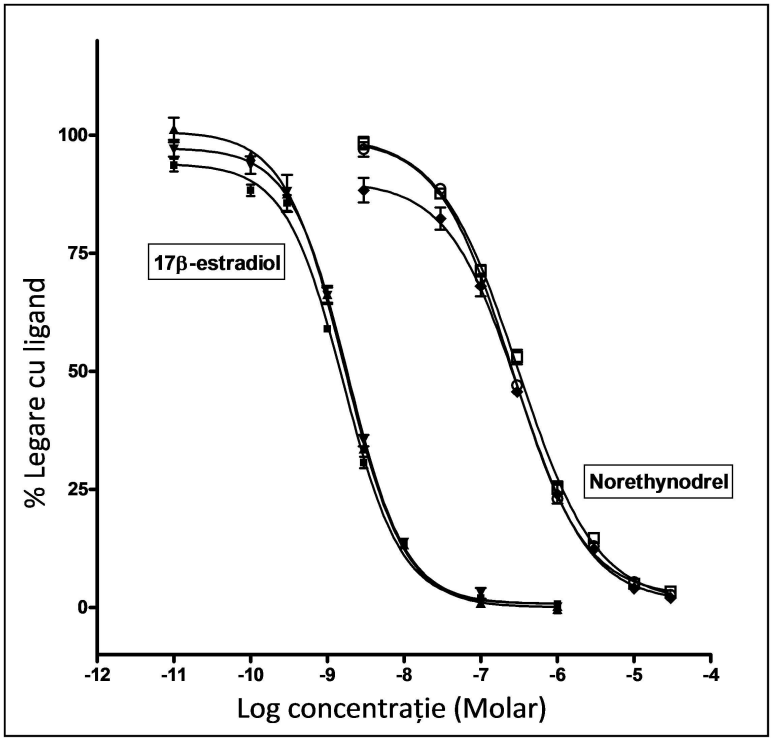
1. Analiza privind legarea competitivă hrERα măsoară gradul de legare al unei singure concentrații de [^{3}H]-17β-estradiol în prezența unor concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. Curba de legare competitivă este reprezentată grafic ca fiind o legare specifică [^{3}H]-17β-estradiol versus concentrația (unități de log10) soluției testate în paralel. Concentrația substanței chimice de testat care inhibă 50 % din legarea specifică maximă a [^{3}H]-17β-estradiol constituie valoarea IC_{50}.

Analiza datelor pentru estrogenul de referință și liantul slab (1)

2. Datele din testele pe martori se transformă (adică procentul de legare specifică [^{3}H]17βestradiol și concentrația log a substanței chimice martor) în vederea unei analize ulterioare. Estimările valorilor log(IC_{50}) pentru martorii pozitivi (de exemplu, estrogenul de referință și liantul slab) ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri (de exemplu, BioSoft; GraphPad Prism) (2). Partea superioară, cea inferioară, panta și log(IC50) poate să rămână, de regulă, necondiționate atunci când se formează aceste curbe. Ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Ar trebui să se precizeze metoda aleasă pentru regresia robustă. Corecția pentru sărăcirea ligandului nu a fost necesară pentru analizele FW sau CERI hrER, dar poate fi avută în vedere dacă este necesar. În urma analizei inițiale, ar trebui să se examineze fiecare curbă de legare pentru a asigura o corelare corespunzătoare cu modelul. Afinitatea de legare relativă (RBA) a unui liant slab poate fi calculată ca procent din log (IC_{50}) pentru liantul slab raportat la valoarea log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol. Rezultatele pentru martorii pozitivi și pentru martorul non-liant ar trebui să fie evaluate utilizând măsuri ale performanței analizei și criterii de acceptabilitate, astfel cum sunt descrise în prezenta metodă de testare (punctul 20), apendicele 2 (analiza FW, punctele 41-51) și apendicele 3 (analiza CERI, punctele 41-51). În figura 1 sunt prezentate exemple de trei teste pentru estrogenul de referință și liantul slab.

Figura 1

Exemple de curbe de legare competitivă pentru estrogenul de referință și liantul slab martor



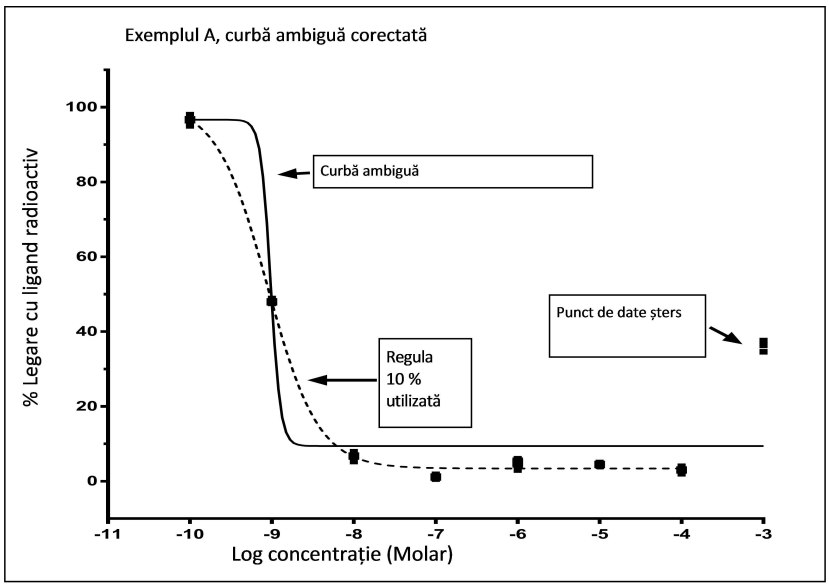
Analiza datelor pentru substanțele chimice de testat

3. Datele pentru toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie analizate printr-o abordare etapizată pentru a se asigura analizarea corespunzătoare a datelor și clasificarea corectă a fiecărei curbe de legare competitivă. Fiecare testare pentru o substanță chimică de testat să fie supusă inițial unei analize a datelor standardizată care este identică cu cea utilizată pentru estrogenul de referință și lianții slabi martori. După încheierea analizei, ar trebui să fie efectuată o analiză tehnică a parametrilor curbei și o verificare vizuală a modului în care datele se încadrează pe curba de legare competitivă generată pentru fiecare testare. În timpul acestei analize tehnice, observațiile privind o scădere dependentă de concentrație în procentul [^{3}H]-17β-estradiol legat în mod specific, variabilitatea scăzută între replicile tehnice la fiecare concentrație chimică și consecvența parametrilor de corelare între cele trei teste constituie indicații bune pentru faptul că analiza și analizele datelor au fost efectuate în mod corespunzător. La examinarea rezultatelor fiecărui test, pentru o substanță chimică de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională, iar datele utilizate pentru a clasifica fiecare substanță chimică de testat ca liant sau non-liant ar trebui să fie justificabile din punct de vedere științific.

4. Ocazional, ar putea exista exemple de date care necesită o atenție suplimentară pentru a analiza și a interpreta în mod corespunzător datele privind legarea hrER. Există studii anterioare care au arătat cazuri în care analiza și interpretarea datelor privind legarea competitivă de receptori pot fi complicate de o creștere a valorii procentuale a legării specifice atunci când se testează substanțe chimice la cele mai mari concentrații (figura 2). Aceasta este o problemă bine-cunoscută care a fost întâlnită atunci când au fost utilizate protocoale pentru o serie de analize privind legarea competitivă de receptori (3). În aceste cazuri, se observă un răspuns dependent de concentrație la concentrații mai mici, dar deoarece concentrația substanței chimice de testat se apropie de limita solubilității, gradul de desprindere a [^{3}H]17β-estradiol nu mai scade. În aceste cazuri, datele pentru concentrațiile mai mari indică faptul că s-a atins limita biologică a analizei. De exemplu, acest fenomen este asociat de multe ori cu insolubilitatea substanței chimice și precipitarea la concentrații ridicate sau poate fi, de asemenea, o reflectare a depășirii capacității cărbunelui acoperit cu dextran de a prinde ligandul marcat radioactiv nelegat în timpul procedurii de separare la cele mai mari concentrații chimice. Includerea unor astfel de puncte de date atunci când se înregistrează datele privind legarea competitivă pe o curbă sigmoidă poate conduce uneori la o clasificare eronată a potențialului de legătură de ER în cazul unei substanțe chimice de testat (figura 2). Pentru a evita acest lucru, protocolul pentru analizele FW și CERI privind legarea de hrER include o opțiune de a exclude din analize punctele de date în cazul în care media replicilor pentru legarea procentuală specifică a [^{3}H]17β-estradiol este de cel puțin 10 %, peste media observată la o concentrație mai mică (și anume, aceasta este denumită regula de 10 %). Această regulă poate fi folosită o singură dată pentru o anumită curbă și trebuie să existe date care rămân pentru cel puțin 6 concentrații, astfel încât curba să poată fi corect clasificată.

Figura 2

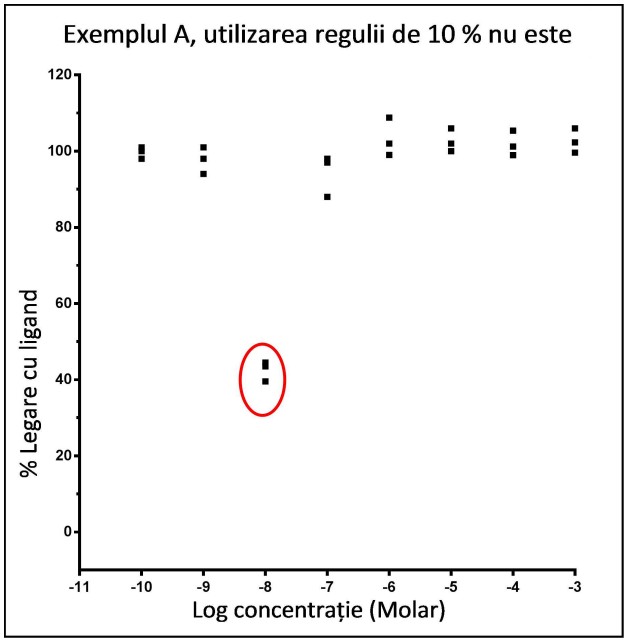
Exemple, curbe privind legarea competitivă cu și fără utilizarea regulii de 10 %.

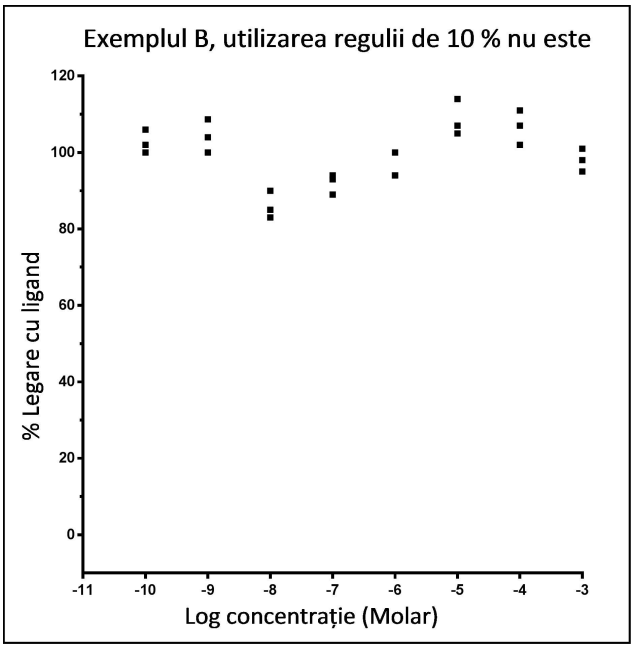


5. Utilizarea adecvată a regulii de 10 % pentru a corecta aceste curbe ar trebui să fie analizată cu atenție și rezervată pentru cazurile în care există o indicație clară a unui liant al hrER. În cursul desfășurării experimentelor pentru studiul de validare a analizei FW privind legarea de hrER, s-a observat că, uneori, regula de 10 % a avut o consecință neintenționată și neprevăzută. Substanțele chimice care nu au interacționat cu receptorul (și anume, nonlianți reali) au prezentat adesea o variabilitate de aproximativ 100 % în legarea ligandului radioactiv, care a depășit 10 % în intervalul de concentrații testate. În cazul în care valoarea cea mai scăzută s-a întâmplat să fie la un nivel redus de concentrare, datele privind toate concentrațiile mai mari ar putea fi eliminate din analiză prin utilizarea regulii de 10 %, chiar dacă aceste concentrări ar putea fi utile în stabilirea statutului de non-liant al substanței chimice. Figura 3 prezintă exemple în care utilizarea regulii de 10 % nu este adecvată.

Figura 3

Exemple, date privind legarea competitivă în cazul cărora utilizarea regulii de 10 % nu este adecvată.





Referințe

(1) OCDE (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 (nr. 226), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) Motulsky H. și 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 TESTELE *IN VITRO* PRIVIND SENSIBILIZAREA CUTANATĂ, CARE ABORDEAZĂ EVENIMENTUL IMPORTANT PRIVIND ACTIVAREA CELULELOR DENDRITICE ASUPRA PARCURSULUI RĂSPUNSURILOR ADVERSE (ADVERSE OUTCOME PATHWAY - AOP) PENTRU SENSIBILIZAREA CUTANATĂ

INTRODUCERE GENERALĂ

Metodă de testare bazată pe evenimentul important privind activarea celulelor dendritice

1. O substanță sensibilizantă pentru piele înseamnă o substanță care conduce la o reacție alergică în urma contactului cu pielea, astfel cum este definit în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). Există un acord general cu privire la principalele evenimentele biologice care stau la baza sensibilizării cutanate. Cunoștințele existente cu privire la mecanismele biologice și chimice asociate cu sensibilizarea cutanată au fost sintetizate sub forma unui parcurs al răspunsurilor adverse (AOP) în cadrul programului OCDE AOP (2), începând cu evenimentul declanșator molecular, prin evenimentele intermediare, până la efectele adverse, și anume dermatita alergică de contact. În acest caz, evenimentul declanșator molecular (mai exact, primul eveniment important) este reprezentat de legarea covalentă a substanțelor electrofile de centrele nucleofile din proteinele din piele. Al doilea eveniment important în acest AOP se desfășoară în cheratinocite și include răspunsuri inflamatorii, precum și modificări ale expresiei genice asociate cu parcursurile de semnalizare de celule specifice, precum parcursurile care depind de elemente de răspuns antioxidant/electrofil (ERA). Al treilea eveniment important este activarea celulelor dendritice (CD), de regulă evaluate prin exprimarea markerilor celulari de suprafață specifici, chemochine și citocine. Al patrulea eveniment important este activarea și proliferarea celulară T, care este evaluată în mod indirect în testul local asupra ganglionilor limfatici murini (LLNA) (3).

2. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 442E (2017). Aceasta descrie teste *in vitro* care abordează mecanismele descrise în cadrul evenimentului important privind activarea celulelor dendritice ale AOP pentru sensibilizarea cutanată (2). MT cuprinde teste care urmează să fie utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP.

   Testele descrise în prezenta MT sunt:

   — Testul de activare a liniilor celulare umane (h-CLAT)

   — Testul U937 de activare a liniilor celulare (U-SENS ™)

   — Testul Interleuk-8 Reporter Gene Assay (testul IL-8 Luc)

3. Testele incluse în această metodă de testare și în Orientarea TG corespunzătoare a OCDE pot fi diferite în ceea ce privește procedura utilizată pentru a genera datele și valorile măsurate, dar pot fi utilizate în mod nediscriminatoriu pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor privind evenimentul cheie cu privire la activarea celulelor dendritice ale AOP pentru sensibilizarea cutanată, beneficiind în același timp de acceptarea reciprocă a datelor a OCDE.

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

Context și principii ale testelor incluse în metoda de testare bazată pe evenimentul important

4. Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, de regulă, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice care utilizează cobai, testul de maximizare pe cobai (GPMT) al lui Magnusson și Kligman și testul Buehler (MT B.6) (4) evaluează atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Testele pe murini, LLNA (MT B.42) (3) și cele două variante ale sale care nu sunt radioactive, LLNA: DA (MT B.50) (5) și LLNA: BrdU-ELISA (MT B.51) (6), toate evaluează exclusiv răspunsul de inducție și, de asemenea, au fost acceptate, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punctul de vedere al bunăstării animalelor, alături de o măsurare obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.

5. Au fost adoptate metode de testare *in chemico* și *in vitro* recente, care sunt bazate pe mecanică și care abordează primul eveniment important [(MT B.59; Testul reactivității directe a peptidelor (7)] și al doilea eveniment important [(MT B.60; metoda de testare ARE-Nrf2 ale luciferazei (8)] al sensibilizării cutanate AOP, pentru a contribui la evaluarea potențialului de pericol de sensibilizare cutanată pe care îl prezintă substanțele chimice.

6. Încercările descrise în prezenta metodă de testare măsoară fie modificarea în exprimarea markerului (markerilor) celular(i) de suprafață asociat (asociați) procesului de activare a monocitelor și a CD în urma expunerii la substanțe sensibilizante (de exemplu: CD54, CD86), fie modificările în exprimarea IL-8, o citocină asociată cu activarea CD. Au fost raportate substanțe sensibilizante pentru piele pentru a induce exprimarea markerilor cu membrană celulară, precum CD40, CD54, CD80, CD83 și CD86, în plus față de inducerea citocinelor proinflamatorii, precum IL-1β și TNF-α, precum și a mai multor chemochine, inclusiv IL-8 (CXCL8) și CCL3 (9) (10) (11) (12), asociate cu activarea CD (2).

7. Însă, întrucât activarea CD reprezintă doar un singur eveniment important al AOP privind sensibilizarea cutanată (2) (13), este posibil ca informațiile obținute în urma testelor care măsoară doar markerii activării CD să nu fie suficiente pentru a concluziona cu privire la prezența sau absența potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele obținute în urma testelor descrise în cadrul acestei metode de testare sunt propuse pentru susținerea diferențierii dintre substanțele sensibilizante pentru piele (mai exact, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și substanțele nesensibilizante atunci când sunt utilizate în cadrul strategiilor integrate pentru testare și evaluare (IATA), împreună cu alte informații suplimentare relevante, de exemplu, cele rezultate din teste *in vitro* care abordează alte evenimente importante ale AOP privind sensibilizarea cutanată, precum și metode care nu implică testarea, inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoage (13). Exemple de utilizare de date generate în urma acestor teste în cadrul abordărilor definite, mai exact, al abordărilor standardizate atât în legătură cu setul de surse informaționale utilizate, cât și în cadrul procedurii aplicate datelor pentru obținerea de previziuni, au fost publicate (13) și pot fi folosite ca elemente utile în cadrul IATA.

8. Testele descrise în prezenta metodă de testare nu pot fi folosite pe cont propriu, nici pentru a subclasifica substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite în GHS al ONU/Regulamentul CLP, pentru autoritățile care pun în aplicare aceste două subcategorii opționale, și nici pentru a prevedea potența pentru deciziile în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, rezultatele pozitive obținute cu aceste metode pot fi utilizate în mod independent pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

9. Termenul „substanță chimică de testat" este utilizat în această metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării [1] și nu are legătură cu aplicabilitatea testelor la testarea substanțelor monocomponente și a substanțelor și/sau amestecurilor multicomponente. În prezent sunt disponibile informații limitate privind aplicabilitatea testelor la substanțe/amestecuri multicomponente (14) (15). Cu toate acestea, testele sunt aplicabile din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente. Cu toate acestea, înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate în scopul respectiv [2]. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. În plus, atunci când se testează substanțe sau amestecuri multicomponente, se ia în considerare posibila interferență a componentelor citotoxice cu răspunsurile observate.

[1] În iunie 2013, reuniunea comună a OCDE a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat" care descrie ceea ce este testat în orientările OCDE noi și actualizate privind testele.

[2] Această teză a fost propusă și convenită în cadrul reuniunii WNT din aprilie 2014

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A șasea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OCDE (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. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Studiu pe ganglionul limfatic local.

(4) Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.

(5) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată: Studiu pe ganglionul limfatic local: DA.

(6) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată: Studiu pe ganglionul limfatic local: BrdU-ELISA.

(7) Capitolul B.59 din prezenta anexă: Sensibilizarea cutanată in chemico: Testul reactivității directe a peptidelor (Direct Peptide Reactivity Assay – DPRA).

(8) Capitolul B.60 din prezenta anexă: Sensibilizarea cutanată *in vitro*: Metoda de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL și 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 și Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y și Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OCDE (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, anexele 1 și 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: 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.

Apendicele 1

Sensibilizarea Cutanată in vitro: Testul de Activare a Liniilor Celulare Umane (h-clat)

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Testul h-CLAT cuantifică modificările produse la nivelul exprimării markerilor celulari de suprafață asociați cu procesul de activare a monocitelor și celulelor dendritice (CD) (și anume, CD86 și CD54), la nivelul liniei celulare monocitice umane THP-1 afectate de leucemie în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1)(2). Nivelurile de exprimare măsurate ale markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54 sunt apoi utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante.

2. Testul h-CLAT a fost evaluat într-un laborator de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (EURL ECVAM) - un studiu de validare coordonat și o evaluare inter pares independentă ulterioară desfășurată de către Comitetul științific consultativ al EURL ECVAM (ESAC). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, testul h-CLAT a fost recomandat de EURL ECVAM (3) pentru a fi utilizat în cadrul unei IATA în vederea sprijinirii diferențierii între substanțele sensibilizante și cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor h-CLAT în combinație cu alte informații sunt prezentate în referințele bibliografice (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. Testul h-CLAT s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în tehnici de cultură celulară și analiza citometriei de flux. Nivelul de reproductibilitate în estimări, care poate fi preconizat în urma testării, este de ordinul a 80 % în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare (3) (12). Rezultatele generate și incluse în studiul de validare (13), precum și în alte studii publicate (14), indică, în general, faptul că, în comparație cu rezultatele LLNA, precizia de deosebire a substanțelor sensibilizante pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de cele nesensibilizante este de 85 % (N = 142) cu o sensibilitate de 93 % (94/101) și o specificitate de 66 % (27/41) (pe baza unei analize repetate efectuate de EURL ECVAM (12), având în vedere toate datele existente și neluând în calcul rezultatele negative pentru substanțele chimice cu o valoare a Log Kow mai mare de 3,5, astfel cum este descris la alineatul (4). Există o probabilitate mai mare ca estimările negative false realizate prin testul h-CLAT să vizeze substanțe chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nu substanțe chimice care prezintă un nivel ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (4) (13) (15). Coroborate, aceste informații indică utilitatea metodei h-CLAT în ceea ce privește contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru testul h-CLAT ca test independent sunt doar orientative, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile, metoda h-CLAT s-a dovedit a fi aplicabilă substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost stabilit în cadrul studiilor *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice (3) (14) (15). Metoda h-CLAT se aplică substanțelor chimice de testat solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu se sedimentează sau se separă de solvent/vehicul în diferite faze) într-un solvent/vehicul adecvat [a se vedea alineatul (14)]. Substanțele chimice de testat cu un Log Kow mai mare de 3,5 tind să producă rezultate negative false (14). Prin urmare, nu ar trebui să fie luate în considerare rezultatele negative obținute în cazul substanțelor chimice de testat având o valoare Log Kow mai mare de 3,5. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute în cazul substanțelor chimice de testat având o valoare Log Kow mai mare de 3,5 ar putea fi totuși utilizate pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca substanță sensibilizantă pentru piele. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare utilizate (16), cât și din cauza condițiilor experimentale, prohaptenele (și anume, substanțele care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P 450) și prehaptenele (și anume, substanțe activate prin autooxidare), în special cele cu o rată de oxidare lentă, pot furniza, de asemenea, rezultate negative la testul h-CLAT (15). Substanțele chimice de testat fluorescente pot fi analizate prin testul h-CLAT (17); cu toate acestea, substanțele chimice de testat fluorescente puternice care emit la aceeași lungime de undă ca și izotiocianatul de fluoresceină (FITC) sau iodura de propidiu (PI) vor interfera cu detecția prin citometria de flux și, astfel, nu pot fi evaluate în mod corect folosind anticorpi conjugați cu FITC sau PI. Într-un astfel de caz, se pot folosi alți anticorpi marcați cu fluorocrom sau alți markeri de citotoxicitate, cu condiția să se poată demonstra că acestea oferă rezultate similare celor generate de anticorpii marcați cu FITC [a se vedea alineatul (24)] sau PI [a se vedea alineatul (18)], de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 1-2. Având în vedere cele de mai sus, rezultatele negative ar trebui interpretate în contextul limitărilor menționate și împreună cu alte surse de informații în cadrul IATA. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a metodei h-CLAT la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui utilizate pentru respectivele categorii specifice.

5. Conform descrierii de mai sus, metoda h-CLAT susține diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante. Însă aceasta poate să contribuie, de asemenea, la evaluarea potenței de sensibilizare (4)(5)(9) atunci când este utilizată în abordări integrate precum IATA. Cu toate acestea, se impun studii suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina în ce mod ar putea rezultatele h-CLAT să fundamenteze evaluarea potenței.

6. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Metoda h-CLAT reprezintă un test *in vitro* care cuantifică modificările expresiei markerului celular de suprafață (și anume, CD86 și CD54) pe o linie celulară monocitică umană afectată de leucemie, celule THP-1, în urma expunerii timp de 24 de ore la substanța chimică de testat. Aceste molecule de suprafață constituie markeri tipici de activare THP-1 monocitică și pot imita activarea DC, care joacă un rol esențial în pregătirea de celule de tip T. Modificările expresiei markerului de suprafață se măsoară prin citometria de flux în urma colorării celulelor cu anticorpi marcați cu fluorocrom. De asemenea, măsurarea citotoxicității este efectuată în același timp cu scopul de a se evalua dacă se produce o reglare în sus a expresiei markerului de suprafață în cazul concentrațiilor subcitotoxice. Intensitatea relativă a fluorescenței markerilor de suprafață, în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul, se calculează și se utilizează în modelul predictiv [a se vedea alineatul (26)], pentru a susține diferențierea între substanțe sensibilizante și nesensibilizante

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

8. Înainte de a introduce testul descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71 pentru utilizare de rutină, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice utilizând cele zece substanțe de verificare menționate în apendicele 1.2. În plus, utilizatorii testului ar trebui să întrețină o bază de date istorică incluzând date generate în urma verificărilor de reactivitate [a se vedea alineatul (11)] și a martorilor pozitivi și a celor tratați cu solvenți/vehicule [a se vedea alineatele (20)-(22)] și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul lor este menținută în timp.

PROCEDURA

9. Acest test este bazat pe protocolul nr. 158 (18) h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM), care reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de validare coordonat de EURL ECVAM. Se recomandă utilizarea acestui protocol atunci când se pune în aplicare și se utilizează metoda h-CLAT în laborator. Componentele și procedurile principale pentru metoda h-CLAT sunt descrise în continuare, în două etape: *testul de determinare a dozei* și *măsurarea expresiei CD86/CD54*.

Pregătirea celulelor

10. Linia celulară monocitică umană afectată de leucemie, și anume THP-1, ar trebui să fie utilizată pentru desfășurarea metodei h-CLAT. Se recomandă ca celulele (TIB-202™) să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection.

11. Celulele THP-1 sunt cultivate la 37°C în atmosferă de 5 % CO_2 și de umiditate, în mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal bovin (FBS), 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 100 de unități/ml de penicilină și 100 µg/ml de streptomicină. Poate fi evitată utilizarea penicilinei și a streptomicinei în mediul de cultură. Însă, într-un astfel de caz, utilizatorii ar trebui să verifice dacă absența antibioticelor din mediul de cultură nu are niciun impact asupra rezultatelor, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare enumerate în apendicele 1.2. În orice caz, pentru a reduce la minimum riscul de contaminare, bunele practici de cultură celulară ar trebui să fie urmate independent de prezența sau absența antibioticelor în mediul de cultură celulară. Celulele THP-1 sunt însămânțate în mod obișnuit la 2-3 zile la densitatea de 0,1-0,2 × 10^6 celule/ml. Acestea ar trebui să fie menținute la densități cuprinse între 0,1 și 1,0 × 10^6 celule/ml. Înainte de a le utiliza pentru testare, celulele ar trebui să fie calificate prin efectuarea unui control de reactivitate. Controlul de reactivitate ar trebui să fie efectuat asupra celulelor folosindu-se martori pozitivi, 2,4-dinitroclorbenzen (DNCB) (CAS nr. 97-00-7, puritate ≥ 99 %) și sulfat de nichel ($NiSO_4$) (CAS nr. 10101-97-0, puritate ≥ 99 %) și martorul negativ, acidul lactic (AL) (CAS nr. 50-21-5, puritate ≥ 85 %), la două săptămâni după decongelare. Atât DNCB, cât și $NiSO_4$ ar trebui să genereze un răspuns pozitiv al markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54, iar AL ar trebui să genereze un răspuns negativ al markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54. Sunt utilizate pentru analiză numai celulele pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes. Celulele pot fi reproduse până la două luni după decongelare. Numărul de trecere nu ar trebui să depășească 30. Verificarea de reactivitate ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 20-24.

12. În scopul testării, celulele THP-1 sunt însămânțate la o densitate de 0,1 × 10^6 celule/ml sau de 0,2 × 10^6 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură timp de 72 de ore sau, respectiv, 48 de ore. Este important ca densitatea celulară din balonul de cultură, imediat după perioada de cultivare prealabilă, să fie cât mai consecventă posibil în fiecare experiment (aplicându-se una dintre cele două condiții de cultivare prealabilă descrise mai sus), deoarece densitatea celulară din balonul de cultură, imediat după cultivarea prealabilă, ar putea afecta expresia CD86/CD54 indusă de alergeni (19). În ziua testării, celulele recoltate din balonul de cultură sunt suspendate din nou în mediu de cultură proaspăt, la 2 × 10^6 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o tavă cu fund plat cu 24 de godeuri (500 µl, 1 × 10^6 celule/godeu) sau pe o tavă cu fund plat cu 96 de godeuri (80 µl, 1,6 × 10^5 celule/godeu).

Testul de determinare a dozei

13. Se efectuează *un test de determinare a dozei* pentru determinarea CV75, care este concentrația substanței chimice de testat, în urma căruia să se ajungă la o viabilitate celulară (VC) de 75 % în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul. Valoarea CV75 este utilizată pentru a determina concentrația substanțelor chimice de testat pentru măsurarea expresiei *CD86/CD54* [a se vedea alineatele (20)-(24)].

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

14. Substanțele chimice de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru metoda h-CLAT, substanțele chimice de testat sunt dizolvate sau dispersate în mod stabil [a se vedea, de asemenea, alineatul (4)] în soluție salină sau în mediu ca prime opțiuni de solvent/vehicul sau în dimetil sulfoxid (DMSO, puritate ≥99 %) ca a doua opțiune de solvent/vehicul dacă substanța chimică de testat nu este solubilă sau nu formează dispersii stabile în cei doi solvenți/vehicule anterioare, în concentrații finale de 100 mg/ml (în soluție salină sau în mediu) sau de 500 mg/ml (în DMSO). Se pot utiliza și alți solvenți/vehicule decât cele descrise mai sus în cazul în care se prezintă o justificare științifică suficientă. Ar trebui să se țină seama de stabilitatea substanței chimice de testat în solventul/vehiculul final.

15. Pornind de la soluțiile mamă ale substanțelor de testat de 100 mg/ml (în soluție salină sau medie) sau de 500 mg/ml (în DMSO), ar trebui să fie parcurse următoarele etape de diluare:

— Pentru soluția salină sau mediu ca solvent/vehicul: Se prepară opt soluții mamă (opt concentrații) cu ajutorul unor diluții în serie duble utilizând solventul/vehiculul aferent. Aceste soluții mamă sunt apoi diluate în continuare de 50 de ori în mediu de cultură (soluții de lucru). În cazul în care concentrația finală în partea superioară, în tava de 1 000 µg/ml, nu este toxică, concentrația maximă ar trebui să fie determinată din nou prin efectuarea unui nou test de citotoxicitate. Concentrația finală în placă nu ar trebui să depășească 5 000 µg/ml în cazul substanțelor chimice de testat dizolvate sau dispersate în mod stabil în soluție salină sau în mediu salin.

— În cazul DMSO ca solvent/vehicul: Se prepară opt soluții mamă (opt concentrații) cu ajutorul unor diluții în serie duble utilizând solventul/vehiculul aferent. Aceste soluții mamă sunt apoi diluate în continuare de 250 de ori în mediu de cultură (soluții de lucru). Concentrația finală în plăci nu ar trebui să depășească 1 000 µg/ml, chiar dacă această concentrație nu este toxică.

Soluțiile de lucru sunt utilizate, în cele din urmă, pentru expunere prin adăugarea unui volum egal de soluție de lucru la volumul suspensiei celulare THP-1 din placă (a se vedea, de asemenea, punctul 17) pentru a obține încă o diluare dublă (de regulă, plaja finală de concentrații de pe placă este de 7,81-1 000 µg/ml).

16. Martorul tratat cu solvent/vehicul utilizat în metoda h-CLAT este mediu de cultură [pentru substanțele chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil (a se vedea punctul 4 fie în mediu, fie în soluție salină) sau DMSO (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în DMSO) testat la o singură concentrație finală în placă de 0,2 %. Acesta este supus aceluiași proces de diluție descris pentru soluțiile de lucru de la punctul 15.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

17. Mediul de cultură sau soluțiile de lucru descrise la punctele 15 și 16 sunt amestecate 1: 1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe placa cu fund plat de 24 sau 96 de godeuri (a se vedea punctul 12). Plăcile tratate sunt apoi incubate timp de 24 ± 0,5 ore la 37°C în soluție cu 5 % CO_2. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat, de exemplu, prin acoperirea etanșă a plăcilor înainte de incubația cu substanțele chimice de testat (20).

Colorarea cu iodură de propidiu (IP)

18. După 24 ± 0,5 ore de expunere, celulele sunt transferate în eprubete de eșantioane și colectate prin centrifugare. Se îndepărtează supernatantele și se suspendă din nou celulele rămase în 200 µl (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau în 600 µl (în cazul plăcii cu 24 de godeuri) de soluție salină tamponată cu fosfat conținând 0,1 % albumină din ser bovin (soluție tampon de colorare). Se transferă 200 µl de suspensie celulară pe o placă cu fund rotund de 96 de godeuri (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau în micro-eprubetă (în cazul unei plăci cu 24 de godeuri) și se spală de două ori într-o cantitate de 200 µl (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau de 600 µl (în cazul plăcii cu 24 de godeuri) de soluție tampon de colorare. În cele din urmă, celulele sunt suspendate din nou în soluție tampon de colorare (de exemplu, 400 µl) și se adaugă soluție IP (de exemplu, 20 µl) (spre exemplu, concentrația finală a IP este de 0,625 µg/ml). Se pot utiliza alți markeri de citotoxicitate, cum ar fi 7-aminoactinomicina D (7-AAD), albastru de tripan sau alții, în cazul în care se poate demonstra că acțiunile de colorare alterative generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 1.2.

Măsurarea citotoxicității prin citometria de flux și estimarea valorii CV75

19. Absorbția IP este analizată utilizând citometria de flux la canalul de acumulare FL-3. Sunt acumulate în total 10 000 de celule vii (IP negativă). Viabilitatea celulară poate fi calculată folosind următoarea ecuație prin programul de analiză citometrică. Atunci când viabilitatea celulară este scăzută, trebuie să se acumuleze până la 30 000 de celule, inclusiv celule moarte. În mod alternativ, pot fi acumulate date timp de un minut după inițierea analizei.

$$\textit{Viabilitatea celulară} = \frac{\textit{Numărul de celule vii}}{\textit{Numărul total de celule acumulate}} \times 100$$

Valoarea CV75 (a se vedea punctul 13), adică o concentrație care indică o rată de 75 % a THP-1 de supraviețuire a celulelor (25 % citotoxicitate), este calculată prin interpolare log-lineară folosind următoarea ecuație:

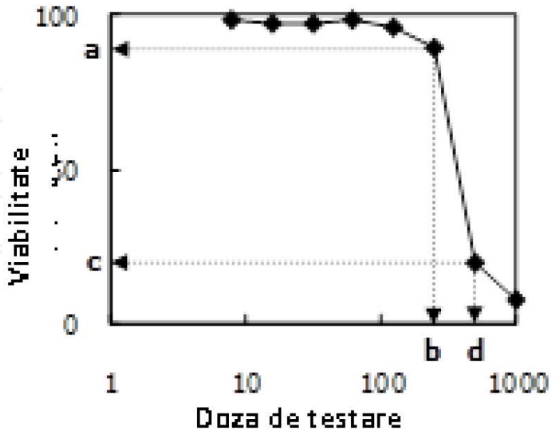
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

Unde:

a reprezintă valoarea minimă a viabilității celulare peste 75 %

c reprezintă valoarea maximă a viabilității celulare sub 75 %

b și d sunt concentrații care arată valoarea viabilității celulare a și, respectiv, c



Se pot utiliza alte abordări pentru derivarea valorii CV75, cu condiția să se demonstreze că acest lucru nu are niciun impact asupra rezultatelor (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare).

Măsurarea expresiei CD86/CD54

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

20. Solventul/vehiculul corespunzător (soluție salină, medie sau DMSO; a se vedea punctul 14) este utilizat pentru a dizolva sau a dispersa în mod stabil substanțele chimice de testat. Substanțele chimice de testat sunt diluate mai întâi la concentrația corespunzătoare valorii de 100 de ori (pentru soluția salină sau mediu) sau de 500 de ori (pentru DMSO) din 1,2 × CV75, determinate în *testul de determinare a dozei* (a se vedea punctul 19). În cazul în care valoarea CV75 nu poate fi determinată (și anume, dacă nu se observă un grad suficient de citotoxicitate în *testul de determinare a dozei*), ar trebui utilizată ca și concentrație inițială cea mai mare concentrație solubilă sau dispersată în mod stabil a substanței chimice de testat preparată împreună cu fiecare solvent/vehicul. Concentrația finală în placă nu ar trebui să depășească valoarea de 5 000 µg/ml (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 1 000 µg/ml (în cazul DMSO). Apoi sunt efectuate diluții în serie de 1,2 ori folosind solventul/vehiculul aferent pentru a obține soluțiile mamă [opt concentrații cuprinse între 100×1,2 × CV75 și 100×0,335 × CV75 (în cazul soluției saline sau al mediului) sau între 500×1,2 × CV75 și 500×0,335 × CV75 (în cazul DMSO)] pentru a fi testate prin metoda h-CLAT (a se vedea protocolul DB-ALM nr. 158 pentru un exemplu al schemei de dozare). Soluțiile mamă sunt apoi diluate în continuare de 50 de ori (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 250 de ori (în cazul DMSO) în mediul de cultură (soluțiile de lucru). Aceste soluții de lucru sunt utilizate, în cele din urmă, pentru expunerea la un alt factor final de diluare dublă în placă. În cazul în care rezultatele nu îndeplinesc criteriile de acceptare descrise la punctele 29 și 30 cu privire la viabilitatea celulară, *testul de determinare a dozei* poate fi repetat pentru a determina o valoare CV75 mai exactă. Este de precizat faptul că pot fi utilizate doar plăci cu 24 de godeuri pentru măsurarea expresiei CD86/CD54.

21. Martorul tratat cu solvent/vehicul este preparat astfel cum este descris la punctul 16. Martorul pozitiv utilizat în metoda h-CLAT este DNCB (a se vedea punctul 11), pentru care soluțiile mamă sunt preparate în DMSO și diluate astfel cum este descris în cazul soluțiilor mamă de la punctul 20. DNCB ar trebui utilizat ca martor pozitiv pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54* la o concentrație unică finală în placă (de regulă, 4,0 µg/ml). Pentru a obține o concentrație de 4,0 µg/ml a DNCB în placă, se prepară o soluție mamă de 2 mg/ml de DNCB, care este apoi diluată în continuare de 250 de ori în mediu de cultură până la o soluție de lucru de 8 µg/ml. În mod alternativ, valoarea CV75 a DNCB, care este determinată în fiecare instalație de testare, ar putea fi utilizată, de asemenea, ca o concentrație a martorului pozitiv. Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor. În cazul martorilor pozitivi, concentrația finală unică în placă nu ar trebui să depășească valoarea de 5 000 µg/ml (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 1 000 µg/ml (în cazul DMSO). Criteriile de acceptare a testelor sunt aceleași cu cele descrise pentru substanța chimică testată (a se vedea punctul 29), cu excepția ultimului criteriu de acceptare, deoarece martorul pozitiv este testat într-o singură concentrație.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

22. Pentru fiecare substanță chimică de testat și substanță martor este necesar un singur experiment pentru a obține o predicție. Fiecare experiment constă în cel puțin două testări independente pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54* (a se vedea punctele 26-28). Fiecare test independent este efectuat într-o altă zi sau în aceeași zi, cu condiția ca pentru fiecare test: a) să se prepare soluții mamă și soluții de lucru ale substanțelor chimice de testat și ale soluțiilor de anticorpi independente și proaspete și b) să se utilizeze celule recoltate în mod independent (de exemplu, se colectează celule din flacoane de cultură diferite); însă celulele pot proveni din aceeași trecere. Substanțele chimice de testat și substanțele martor preparate ca soluții de lucru (500 µl) sunt amestecate cu 500 µl de celule suspendate (1 x 10^6 celule) la un raport de 1:1, iar celulele sunt incubate timp de 24 ± 0,5 ore, conform descrierii de la punctele 20 și 21. În cadrul fiecărui test, o singură replică pentru fiecare concentrație a substanței chimice de testat și a substanței martor este suficientă, deoarece se obține o predicție din cel puțin două teste independente.

Colorarea și analiza celulelor

23. După 24 ± 0,5 ore de expunere, celulele sunt transferate din placa de 24 de godeuri în eprubete pentru probe, colectate prin centrifugare și apoi spălate de două ori cu 1 ml de soluție tampon de colorare (dacă este necesar, se pot lua măsuri suplimentare de spălare). După spălare, celulele sunt blocate cu 600 µl de soluție de blocare [soluție tampon de colorare care conține globulină 0,01 % (g/v) (fracția Cohn fracțiune II, III, umană; SIGMA, #G2388-10G sau echivalentul)] și incubate la 4°C timp de 15 minute. După blocare, celulele sunt împărțite în trei părți alicote de 180 µl pe o placă de 96 de godeuri cu fund rotund sau în micro-eprubetă.

24. După centrifugare, celulele sunt colorate cu 50 µl de soluție de anticorpi anti-CD86, anti-CD54 sau de șoarece IgG1 (izotip) etichetată FITC la 4°C timp de 30 de minute. Anticorpii descriși în protocolul DB-ALM nr. 158 al testului h-CLAT (18) ar trebui să fie utilizați prin diluarea în proporție de 3:25 v/v [pentru CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)] sau de 3:50 v/v [pentru CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6,5B5) și IgG1 (DAKO, #X0927)] cu soluție tampon de colorare. Acești factori de diluție a anticorpilor au fost definiți de către dezvoltatorii de teste ca fiind cei care asigură cel mai bun raport semnal/zgomot. Pe baza experienței dezvoltatorilor de teste, intensitatea fluorescenței anticorpilor este, de obicei, consecventă între diferite loturi. Cu toate acestea, utilizatorii ar putea avea în vedere titrarea anticorpilor în condițiile din laboratorul propriu pentru a defini cele mai bune concentrații de utilizare. Se pot utiliza și alți anticorpi anti-CD86 marcați cu fluorocrom și/sau anti-CD54 în cazul în care se poate demonstra că aceștia generează rezultate similare cu cele ale anticorpilor conjugați FITC, de exemplu prin testarea substanțelor de

verificare din apendicele 1.2. Trebuie remarcat faptul că modificarea clonei sau a furnizorului anticorpilor descriși în protocolul h-CLAT DB-ALM nr. 158 (18) poate afecta rezultatele. După ce sunt spălate de două sau de mai multe ori în 150 µl de soluție-tampon de colorare, celulele sunt resuspendate în soluție-tampon de colorare (de exemplu, 400 µl) și se adaugă soluție IP (de exemplu, 20 µl pentru a obține o concentrație finală de 0,625 µg/ml) sau o altă soluție a markerului de citotoxicitate (a se vedea punctul 18). Nivelurile de expresie ale CD86 și CD54 și viabilitatea celulară sunt analizate folosind citometria de flux.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

25. Expresia CD86 și CD54 este analizată utilizând citometria de flux la canalul de acumulare FL-1. Pe baza intensității medii geometrice a fluorescenței (MFI), intensitatea relativă a fluorescenței (RFI) a CD86 și CD54 pentru celule și celule tratate chimic cu martor (ctrl) pozitiv se calculează conform ecuației următoare:

$$RFI = \frac{MFI\ celule\ tratate\ cu\ substanța\ chimică – MFI\ celule\ cu\ martor\ izotip\ tratate\ cu\ substanța\ chimică}{MFI\ celule\ ctrl\ tratate\ cu\ solvent\ sau\ vehicul – MFI\ celule\ ctrl\ izotip\ tratate\ cu\ solvent\ sau\ vehicul} \times 100$$

Viabilitatea celulară de la celulele cu martor izotip (ctrl) (care sunt colorate cu anticorpi IgG1 (izotip) de șoarece) este calculată, de asemenea, conform ecuației descrise la punctul 19.

Model predictiv

26. Pentru măsurarea expresiei *CD86/CD54*, fiecare substanță chimică de testat este testată prin cel puțin două teste independente pentru a se obține o singură estimare (POZITIV sau NEGATIV). O estimare h-CLAT este considerată POZITIVĂ dacă este îndeplinită cel puțin una dintre următoarele condiții în cadrul derulării a 2 sau a cel puțin 2 din 3 teste independente; în caz contrar, estimarea h-CLAT este considerată NEGATIVĂ (figura 1):

— Valoarea RFI a CD86 este mai mare sau egală cu 150 % la orice concentrație testată (cu viabilitate celulară ≥ 50 %);

— Valoarea RFI a CD54 este mai mare sau egală cu 200 % la orice concentrație testată (cu viabilitate celulară ≥ 50 %).

27. Pe baza celor de mai sus, dacă primele două teste generează rezultate pozitive pentru CD86 și/sau rezultate pozitive pentru CD54, estimarea h-CLAT este considerată a fi POZITIVĂ și nu este necesară derularea unui al treilea test. În mod similar, în cazul în care primele două teste sunt negative pentru ambii markeri, estimarea h-CLAT este considerată a fi NEGATIVĂ (ținând seama în mod corespunzător de dispozițiile de la punctul 30), fără a fi necesară derularea unui al treilea test. Însă, dacă rezultatele primelor două teste nu sunt concordante pentru cel puțin unul dintre markeri (CD54 sau CD86), este necesară derularea unui al treilea test, iar estimarea finală va fi bazată pe rezultatul majoritar al celor trei teste individuale (și anume, două din trei). În acest sens, ar trebui remarcat faptul că, dacă sunt derulate două teste independente, iar unul este pozitiv doar pentru CD86 (denumit în continuare „P_1”) și celălalt este pozitiv doar pentru CD54 (denumit în continuare „P_2”), este necesară derularea unui al treilea test. În cazul în care acest al treilea test este negativ pentru ambii markeri (denumiți în continuare „N”), estimarea h-CLAT este considerată ca fiind NEGATIVĂ. Pe de altă parte, în cazul în care al treilea test este pozitiv pentru oricare dintre markeri (P_1 sau P_2) sau pentru ambii markeri (denumit în continuare „P_{12}”), estimarea h-CLAT este considerată POZITIVĂ.

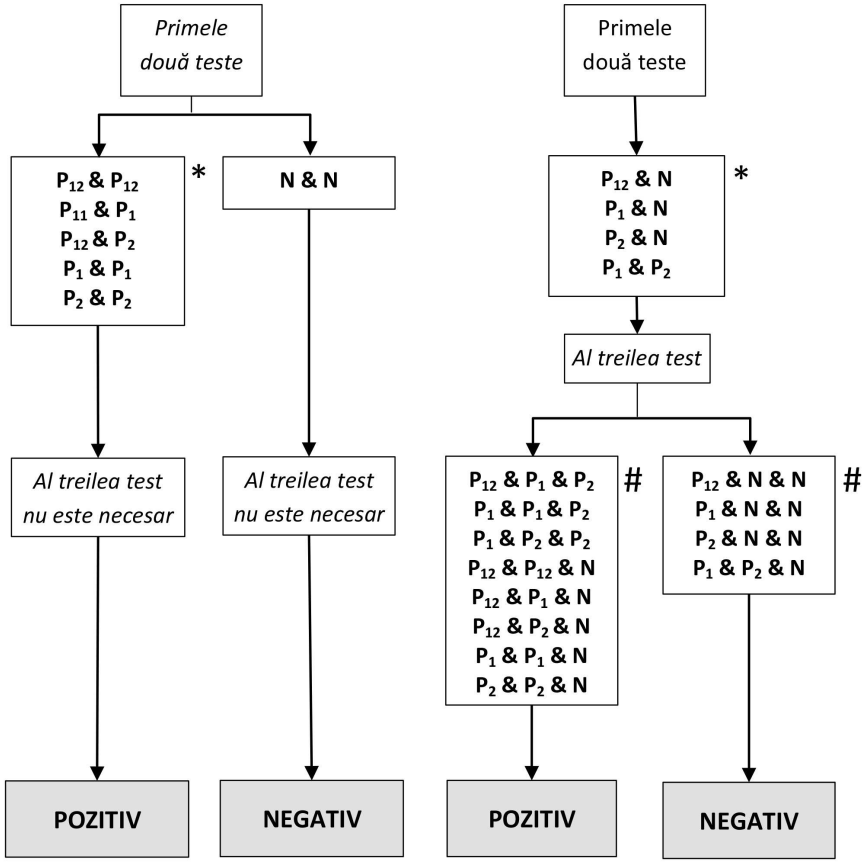


Figura 1: Model predictiv utilizat în metoda h-CLAT. O estimare h-CLAT ar trebui să fie analizată în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 7 și 8 din Introducerea generală.

P_1: test cu estimare pozitivă doar pentru CD86; P_2; test cu estimare pozitivă doar pentru CD54; P_{12}: test cu estimare pozitivă pentru CD86 și CD54; N: test cu estimare pozitivă pentru CD86 sau CD54.

*Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste, independent de ordinea în care acestea ar putea fi obținute.

#Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul cele trei teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste prezentate în caseta de mai sus, însă nu reflectă ordinea în care acestea ar putea fi obținute.

28. Pentru substanțele chimice de testat estimate ca fiind POZITIVE cu testul h-CLAT, ar putea fi determinate opțional două valori ale concentrațiilor efectivă (CE), CE150 pentru CD86 și CE200 pentru CD54, și anume concentrația la care substanțele chimice de testat au indus o valoare RFI de 150 sau 200. Aceste valori CE ar putea contribui la evaluarea potenței de sensibilizare (9) atunci când sunt utilizate în abordări integrate precum IATA (4) (5) (6) (7) (8). Acestea sunt calculate pe baza ecuațiilor următoare:

$$EC150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200\ (for\ CD54) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

unde

A_{conc} este concentrația cea mai scăzută în µg/ml cu RFI > 150 (CD86) sau 200 (CD54)

B_{conc} este concentrația cea mai ridicată în µg/ml cu RFI < 150 (CD86) sau 200 (CD54)

A_{RFI} este valoarea RFI la concentrația cea mai scăzută cu RFI > 150 (CD86) sau 200 (CD54)

B_{RFI} este valoarea RFI la concentrația cea mai ridicată cu RFI < 150 (CD86) sau 200 (CD54)

Cu scopul de a deriva cu o precizie mai mare valorile CE150 și CE200, se pot solicita trei teste independente pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54*. Valorile finale ale CE150 și CE200 sunt determinate apoi ca valoarea mediană a valorilor CE calculate în cadrul celor trei teste independente. Atunci când numai două din trei teste independente îndeplinesc criteriile de pozitivitate (a se vedea punctele 26-27), se adoptă valoarea cea mai mare CE150 sau CE200 dintre cele două valori calculate.

Criterii de acceptare

29. Atunci când este utilizată metoda h-CLAT (22) (27), trebuie să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare.

— Viabilitatea celulară a mediului și a martorilor tratați cu solvenți/vehicule ar trebui să fie mai mare de 90 %.

— La martorul tratat cu solvent/vehicul, valorile RFI ale CD86 și CD54 nu ar trebui să fie peste criteriile pozitive (RFI ≥150 % pentru CD86 și RFI ≥ 200 % pentru CD54). Valorile RFI ale martorului tratat cu solvent/vehicul se calculează cu ajutorul formulei descrise la punctul 25 [„valoarea IMF a substanței chimice" ar trebui să fie înlocuită cu „valoarea IMF a solventului/vehiculului", iar „valoarea IMF a solventului/vehiculului" ar trebui să fie înlocuită cu „valoarea IMF a martorului (mediului)"].

— În cazul martorilor pentru mediu și a celor tratați cu solvent/vehicul, raportul IMF al CD86 și CD54 pe martor izotop ar trebui să fie > 105 %.

— În cazul martorului pozitiv (DNCB), valorile RFI pentru CD86 și CD54 ar trebui să respecte criteriile pozitive (RFI ≥ 150 pentru CD86 și RFI ≥ 200 pentru CD54) și viabilitatea celulară ar trebui să fie mai mare de 50 %.

— Pentru substanța chimică de testat, viabilitatea celulară ar trebui să fie peste 50 % în cel puțin patru concentrații verificate în cadrul fiecărui test.

30. Rezultatele negative sunt acceptabile numai pentru substanțele chimice de testat care prezintă o viabilitate celulară mai mică de 90 % la cea mai mare concentrație testată (și anume, 1,2 x CV75 conform schemei de diluție în serie descrise la punctul 20). În cazul în care viabilitatea celulară la 1,2 × CV75 este mai mare sau egală cu 90 %, rezultatul negativ ar trebui să fie eliminat. Într-un astfel de caz, se recomandă să se încerce reluarea procesului de selecție a dozei prin repetarea testului pentru determinarea CV75. Ar trebui remarcat faptul că, atunci când se utilizează 5 000 µg/ml în soluție salină (sau mediu ori alți solvenți/vehicule), 1 000 µg/ml în DMSO sau concentrația solubilă maximă ca și concentrație de testare maximă a unei substanțe chimice de testat, un rezultat negativ este acceptabil chiar dacă viabilitatea celulară este mai mare de 90 %.

Raportul testului

31. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

Substanța monocomponentă

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Aspectul fizic, Log Kow, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Martori

Martor pozitiv

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Aspectul fizic, Log K_{ow}, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există și dacă este cazul;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor, dacă este cazul.

Martor negativ și tratat cu solvent/vehicul

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori tratați cu solvent/vehicul decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— Descrierea testului utilizat:

— Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la au fost obținute acestea);

— Citometria de flux utilizată (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentelor, globulina, anticorpii și markerul de citotoxicitate utilizat;

— Procedura utilizată pentru a demonstra capabilitatea laboratorului de a efectua testul prin testarea unor substanțe de verificare și procedura utilizată pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp, de exemplu, datele anterioare privind martorii și/sau datele anterioare privind verificările asupra reactivității.

Criterii de acceptare a testului

— Viabilitatea celulară, valorile IMF și RFI obținute cu martorul solventului/vehiculului în comparație cu intervalele de acceptare;

— Viabilitatea celulară și valorile RFI obținute cu martorul pozitiv în comparație cu intervalele de acceptare;

— Viabilitatea celulară a tuturor concentrațiilor testate ale substanței chimice de testat.

Procedura de testare

— Numărul de teste utilizate;

— Concentrațiile substanței chimice de testat, timpul de aplicare și de expunere utilizat (dacă acestea diferă de cele recomandate)

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— Prezentarea tabelară a datelor, inclusiv a valorilor CV75 (dacă este cazul), a valorilor IMF geometrice individuale, a valorilor RFI, a valorilor de viabilitate celulară, a valorilor CE150/CE200 (dacă este cazul) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv în cadrul fiecărui test, precum și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat în funcție de modelul predictiv;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul metodei h-CLAT;

— Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(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. Material accesibil la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Material accesibil la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, 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 metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Material accesibil la adresa: 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) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris, Franța, 2005, 96 pp.

(22) OCDE (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. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) Organizația Națiunilor Unite ONU (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A cincea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: 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.

Apendicele 1.1

DEFINIțII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (21).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): o serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (22).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV75: Concentrația estimată care indică o viabilitate celulară de 75 %.

EC150: concentrațiile care indică valorile RFI de 150 în expresia CD86

EC200: concentrațiile care indică valorile RFI de 200 în expresia CD54

Citometria de flux: o tehnică citometrică prin care celulele au fost suspendate într-un flux fluid una câte una, printr-o focalizare a luminii care excită și care este difuzată în modele caracteristice asupra celulelor și a componentelor acestora; celulele sunt etichetate frecvent cu markeri fluorescenți, astfel încât lumina să fie absorbită mai întâi și apoi emisă la frecvențe modificate.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (Strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

Martor pentru mediu: O probă replică netratată care conține toate componentele unui sistem de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul de testare.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Prehaptene: substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice

Prohaptene: substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată

Intensitatea relativă a fluorescenței (RFI): Valorile relative ale intensității medii a fluorescenței (MFI) la celulele tratate chimic comparativ cu MFI din celulele tratate cu solvent/vehicul.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (21).

Fiabilitate: Măsuri ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (21).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (21).

Soluție tampon de colorare: O soluție salină tamponată cu fosfat conținând o cantitate de 0,1 % albumină din ser bovin.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (21).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestei metode.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care se referă la elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (23).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Test valabil: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (21).

Apendicele 1.2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea în mod corect a estimării h-CLAT pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CV75, EC150 și EC200 care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin 8 dintre cele 10 substanțe de verificare. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele sensibilizării cutanate. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu metoda h-CLAT. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru metoda h-CLAT (3) (14).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda h-CLAT

Substanțe de verificare	NR CAS	Stare fizică	Estimare *in vivo* [1]	CV75 Interval de referință în µg/ml [2]	Rezultate h-CLAT pentru CD86 (Interval de referință pentru EC150 în µg/ml) [2]	Rezultate h-CLAT pentru CD54 (Interval de referință pentru EC200 în µg/ml) [2]
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solid	Sensibilizant (extrem)	2-12	Pozitiv (0,5-10)	Pozitiv (0,5-15)
4-fenilendiamină	106-50-3	Solid	Sensibilizant (puternic)	5-95	Pozitiv (<40)	Negativ (>1,5) [3]
Sulfat de nichel	10101-97-0	Solid	Sensibilizant (moderat)	30-500	Pozitiv (<100)	Pozitiv (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Sensibilizant (moderat)	30-400	Negativ (>10) [3]	Pozitiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Lichid	Sensibilizant (slab)	>20	Negativ (>5) [3]	Pozitiv (<250)
Imidazolidinil uree	39236-46-9	Solid	Sensibilizant (slab)	25-100	Pozitiv (20-90)	Pozitiv (20-75)
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Non-sensibilizant	>5 000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Glicerină	56-81-5	Lichid	Non-sensibilizant	>5 000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Non-sensibilizant	1500-5 000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Acid 4-aminobenzoic	150-13-0	Solid	Non-sensibilizant	>1 000	Negativ (>1 000)	Negativ (>1 000)

Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

([1]) Previzionarea pericolelor (și a potenței) *in vivo* se bazează pe date LLNA (3) (14). Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (24).

([2]) Pe baza valorilor istorice observate (13) (25).

([3]) Din punct de vedere istoric, au fost obținute preponderent rezultate negative pentru acest marker și, prin urmare, este de așteptat, cel mai probabil, un rezultat negativ. Intervalul furnizat a fost stabilit pe baza celor câteva rezultate pozitive istorice observate. În cazul în care se obține un rezultat pozitiv, valoarea CE ar trebui să se încadreze în intervalul de referință raportat.

Apendicele 2

SENSIBILIZAREA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL U937 DE ACTIVARE A LINIEI CELULARE (U-SENS™)

CONSIDERAțII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Testul U-SENS™ cuantifică modificarea produsă la nivelul exprimării unui marker celular de suprafață asociat cu procesul de activare a monocitelor și celulelor dendritice (CD) (și anume, CD86), la nivelul liniei celulare umane U937 afectate de limfomul histiocitar în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1). Nivelurile de exprimare măsurate ale markerului celular de suprafață CD86 de la nivelul liniei celulare U937 sunt apoi utilizate pentru susținerea diferențierii între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele.

2. Testul U-SENS™ a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare (2) coordonat de L'Oreal și ulterior supus unei evaluări independente inter pares efectuate de Comitetul Consultativ Științific (ESAC) al laboratorului de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM) (3). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, U-SENS™ a fost recomandat de EURL ECVAM (4) pentru a fi utilizat în cadrul unei IATA în vederea sprijinirii diferențierii între substanțele sensibilizante și cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. În documentul său de orientare privind raportarea abordărilor structurate ale integrării datelor și ale surselor de informații individuale utilizate în cadrul IATA pentru sensibilizarea pielii, OCDE abordează în prezent o serie de studii de caz care descriu diferite strategii de testare și modele de predicție. Una dintre diferitele abordări definite este bazată pe testul U-SENS (5). În literatura de specialitate (4) (5) (7) sunt prezentate, de asemenea, exemple de utilizare a datelor U-SENS™, în combinație cu alte informații, inclusiv date istorice și actuale valabile despre oameni (6).

3. Testul U-SENS™ s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în tehnici de cultură celulară și analiza citometriei de flux. Nivelul de reproductibilitate în estimări, care poate fi preconizat în urma testării, este de ordinul a 90 % și 84 % în același laborator și între laboratoare (8). Rezultatele generate și incluse în studiul de validare (8), precum și în alte studii publicate (1), indică, în general, faptul că, în comparație cu rezultatele LLNA, precizia de deosebire a sensibilizantelor pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de substanțele nesensibilizante este de 86 % (N = 166) cu o sensibilitate de 91 % (118/129) și o specificitate de 65 % (24/37). În comparație cu rezultatele umane, precizia de deosebire a sensibilizantelor pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de substanțele nesensibilizante este de 77 % (N = 101) cu o sensibilitate de 100 % (58/58) și o specificitate de 47 % (20/43). Există o probabilitate mai mare ca estimările negative false realizate prin U-SENS™, comparativ cu LLNA, să vizeze substanțe chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nu substanțe chimice care prezintă un nivel ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (1) (8) (9). Coroborate, aceste informații indică utilitatea testului U-SENS™ în ceea ce privește contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru U-SENS™ ca test independent sunt doar orientative, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile în prezent, testul U-SENS ™ s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat (inclusiv ingrediente cosmetice, de exemplu, conservanți, surfactanți, agenți activi, coloranți) care acoperă o varietate de grupe funcționale organice, de proprietăți fizico-chimice, de grade de potență de sensibilizare cutanată (determinate în studii *in vivo*), precum și spectrul de mecanisme de reacție cunoscute a fi asociate cu sensibilizarea cutanată (și anume, acceptorul Michael, formarea bazei Schiff, agentul de transfer pe bază acrilică, reacția de substituție nucleofilă bimoleculară [SN2] sau reacția de substituție nucleofilă aromatică [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Testul U-SENS™ se aplică substanțelor chimice de testat care sunt solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu se sedimentează sau se separă de solvent/vehicul în diferite faze) într-un solvent/vehicul adecvat [a se vedea alineatul (13)]. Substanțele chimice din setul de date, careu au fost raportate ca fiind prehaptene (și anume, substanțe activate prin oxidare) sau prohaptene (și anume, substanțe care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P450), au fost corect estimate prin testul U-SENS™ (1) (10). Substanțele care perturbă membrana pot conduce la rezultate fals pozitive datorită unei creșteri

nespecifice a expresiei CD86, întrucât 3 din 7 rezultate fals pozitive aferente clasificării de referință *in vivo* au fost surfactanți (1). Ca atare, rezultatele pozitive obținute cu surfactanți ar trebui să fie luate în considerare cu prudență, iar rezultatele negative cu surfactanți ar putea fi totuși utilizate pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca nefiind nesensibilizantă. Substanțele chimice de testat fluorescente pot fi analizate prin testul U-SENS™ (1); cu toate acestea, substanțele chimice de testat fluorescente puternice care emit la aceeași lungime de undă ca și izotiocianatul de fluoresceină (FITC) sau iodura de propidiu (PI) vor interfera cu detecția prin citometria de flux și, astfel, nu pot fi evaluate în mod corect folosind anticorpi conjugați cu FITC (rezultate potențial fals pozitive) sau PI (viabilitatea nu este măsurabilă). Într-un astfel de caz, se pot folosi alți anticorpi marcați cu fluorocrom sau alți markeri de citotoxicitate, cu condiția să se poată demonstra că acestea oferă rezultate similare celor generate de anticorpii marcați cu FITC sau PI [a se vedea alineatul (18)], de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. Având în vedere cele de mai sus, rezultatele pozitive obținute cu surfactanți și rezultatele negative obținute cu substanțele chimice de testat fluorescente puternic ar trebui interpretate în contextul limitărilor menționate și împreună cu alte surse de informații în cadrul IATA. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a testului U-SENS™ la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui utilizate pentru respectivele categorii specifice.

5. Conform descrierii de mai sus, testul U-SENS™ susține diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele. Însă acesta poate contribui, de asemenea, la evaluarea potenței de sensibilizare atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA. Cu toate acestea, se impun studii suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina în ce mod ar putea rezultatele U-SENS™ să fundamenteze evaluarea potenței.

6. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 2.1.

Principiul Testului

7. Testul U-SENS™ reprezintă un test *in vitro* care cuantifică modificările expresiei markerului celular de suprafață la nivelul unei linii celulare umane, celule U937, afectate de limfomul histiocitar în urma expunerii timp de 45±3 ore la substanța chimică de testat. Markerul de suprafață CD86 este un marker tipic de activare U937. CD86 este cunoscut ca fiind o moleculă co-stimulatorie care poate să imite activarea monocitică, jucând un rol esențial în pregătirea de celule de tip T. Modificările expresiei markerului celular de suprafață CD86 se măsoară prin citometria de flux în urma colorării celulelor cu anticorpi etichetați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC). De asemenea, măsurarea citotoxicității este efectuată (de exemplu, utilizând PI) în același timp cu scopul de a se evalua dacă se produce o reglare în sus a expresiei markerului celular de suprafață CD86 în cazul concentrațiilor subcitotoxice. Indicele de simulare (IS) al markerului celular de suprafață CD86, în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul, se calculează și se utilizează în modelul predictiv (a se vedea punctul 19), pentru a susține diferențierea între sensibilizante și nesensibilizante.

Demonstrarea Performanței

8. Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice pentru metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice, utilizând cele 10 substanțe de verificare enumerate în apendicele 2.2, în conformitate cu bunele practici privind metodele *in vitro* (11). În plus, utilizatorii testelor ar trebui să mențină o bază de date istorice generate în urma verificărilor de reactivitate (a se vedea punctul 11) și cu martori pozitivi și tratați cu solvent/vehicul (a se vedea punctele 15-16) și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul propriu este asigurată în timp.

Procedura

9. Acest test se bazează pe protocolul nr. 183 al U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) (12). Procedurile standard de operare (PSO) ar trebui să fie utilizate la punerea în aplicare și utilizarea testului U-SENS™ în laborator. Se poate utiliza un sistem automat de derulare a testului U-SENS ™ dacă se poate demonstra că acesta generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. Componentele și procedurile principale pentru testul U-SENS™ sunt descrise în continuare.

Pregătirea celulelor

10. Linia celulară umană afectată de limfomul histiocitic, și anume U937 (13), ar trebui să fie utilizată pentru efectuarea testului U-SENS™. Celulele (clona CRL1593.2) ar trebui să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection.

11. Celulele U937 sunt cultivate la 37 °C în atmosferă de 5 % CO_2 și de umiditate, în mediu RPMI-1 640 completat cu 10 % ser fetal de vițel (SFV), 2 mM L-glutamină, 100 de unități/ml de penicilină și 100 µg/ml de streptomicină (mediu complet). Celulele U937 sunt trecute, de regulă, la 2-3 zile la densitatea de 1,5 sau 3 × 10^5 celule/ml. Densitatea celulară nu ar trebui să depășească 2 × 10^6 celule/ml, iar viabilitatea celulară măsurată prin excluderea albastrului de tripan ar trebui să fie ≥ 90 % (nu se aplică la prima trecere după decongelare). Înainte de a le utiliza pentru testare, fiecare lot de celule, SFV sau anticorpi ar trebui să fie calificat prin efectuarea unui control de reactivitate. Verificarea de reactivitate a celulelor ar trebui să fie efectuat folosind martorul pozitiv, acidul picril-sulfonic (acid 2,4,6-trinitrobenzensulfonic: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, puritate de ≥ 99 %) și acidul lactic ca martor negativ (AL) (CASRN 50-21-5, puritate de ≥ 85 %), după cel puțin o săptămână de la decongelare. Pentru verificarea de reactivitate, ar trebui să fie testate șase concentrații finale pentru fiecare dintre cei doi martori (TNBS: 1, 12.5, 25, 50, 75, 100µg/ml și AL: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS solubilizat în mediu complet ar trebui să producă o reacție a CD86 pozitivă și legată de concentrație (de exemplu, în cazul în care o concentrație pozitivă, CD86 S.I. ≥ 150, este urmată de o concentrare cu o valoare a CD86 S.I crescută) și AL solubilizat în mediu complet ar trebui să producă o reacție negativă a CD86 (a se vedea punctul 21). Ar trebui utilizat pentru analiză numai lotul de celule pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes de două ori. Celulele pot fi reproduse până la șapte săptămâni după decongelare. Numărul de trecere nu ar trebui să depășească 21. Verificarea de reactivitate ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 18-22.

12. În scopul testării, celulele U937 sunt însămânțate la o densitate de 3 x 10^5 celule/ml sau de 6 x 10^5 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură pentru două sau, respectiv, o zi. Ar putea fi utilizate alte condiții de cultivare prealabilă decât cele descrise mai sus dacă este asigurată o argumentare științifică suficientă și dacă se poate demonstra că aceasta generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. În ziua testării, celulele recoltate din balonul de cultură sunt suspendate din nou în mediu de cultură proaspăt, la 5 × 10^5 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o placă de 96 de godeuri de 100 µl cu fund plat (densitate celulară finală de 0,5 × 10^5 celule/godeu).

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

13. Evaluarea solubilității este efectuată înainte de testare. În acest scop, substanțele chimice de testat se dizolvă sau se dispersează în mod stabil la o concentrație de 50 mg/ml în mediu complet ca primă opțiune de solvent sau în dimetilsulfoxid (DMSO, puritate de ≥ 99 %) ca al doilea solvent/vehicul dacă substanța chimică de testat nu este solubilă în solventul/vehiculul ca mediu complet. Pentru testare, substanța chimică de testat este dizolvată într-o concentrație finală de 0,4 mg/ml în mediu complet dacă substanța chimică este solubilă în acest solvent/vehicul. Dacă substanța chimică este solubilă numai în DMSO, aceasta se dizolvă la o concentrație de 50 mg/ml. Se pot utiliza și alți solvenți/vehicule decât cele descrise mai sus în cazul în care se prezintă o justificare științifică suficientă. Ar trebui să se țină seama de stabilitatea substanței chimice de testat în solventul/vehiculul final.

14. Substanțele chimice de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Deoarece nu este efectuat un test de determinare a dozelor, prima dată ar trebui să fie testate șase concentrații finale (1, 10, 20, 50, 100 și 200 µg/ml) în solventul/vehiculul corespunzător, fie în mediu complet, fie în mediu de 0,4 % DMSO. Pentru testele ulterioare, începând cu o cantitate de 0,4 mg/ml într-un mediu complet sau 50 mg/ml în DMSO, se prepară soluții de substanțe chimice de testat, cel puțin patru soluții de lucru (și anume, cel puțin patru concentrații) folosind solvent/vehicul corespunzător. Soluțiile de lucru sunt, în final, utilizate pentru tratare prin adăugarea unui volum egal de suspensie celulară U937 (a se vedea punctul 11 de mai sus) la volumul de soluție de lucru din placă pentru a obține o diluție suplimentară dublă (12). Concentrațiile (cel puțin patru concentrații) pentru orice test ulterior sunt alese pe baza rezultatelor individuale ale tuturor testelor anterioare (8). Concentrațiile finale utilizabile sunt de 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 și 200 µg/ml. Concentrația finală maximă este de 200 µg/ml. În cazul]n care se observă o valoare pozitivă a CD86 la 1 µg/ml, se evaluează o cantitate de 0,1 µg/ml pentru a se afla concentrația substanței chimice de testat care nu induce CD86 deasupra pragului pozitiv. Pentru fiecare test, EC150 (concentrația la care o substanță chimică atinge pragul pozitiv al CD86 de 150 %,

a se vedea punctul 19) se calculează dacă se observă o reacție sub forma unei concentrații pozitive de tip CD86. În cazul în care substanța chimică de testat induce o reacție pozitivă a CD86 nelegată de concentrație, calcularea EC150 ar putea să nu fie relevantă, astfel cum este descris în protocolul DB-ALM nr. 183 privind U-SENS ™ (12). Pentru fiecare test, CV70 (concentrația la care o substanță chimică atinge pragul de citotoxicitate de 70 %, a se vedea punctul 19) se calculează ori de câte ori este posibil (12). Pentru a analiza efectul reacției concentrației în urma creșterii CD86, orice concentrații dintre concentrațiile utilizabile ar trebui alese ca fiind repartizate în mod egal între valoarea EC150 (sau cea mai mare concentrație necitotoxică negativă CD86) și CV70 (sau cea mai mare concentrație admisă, și anume, 200 µg/ml). Ar trebui să fie testate minimum patru concentrații pe test și să existe cel puțin două concentrații comune cu testul (testele) anterior (anterioare) pentru comparație.

15. Martorul tratat cu solvent/vehicul și utilizat în testul U-SENS ™ este un mediu complet (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în mediu complet) (a se vedea punctul 4) sau o soluție de 0,4 % DMSO în mediu complet (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în DMSO).

16. Martorul pozitiv utilizat în testul U-SENS ™ este TNBS (a se vedea punctul 11), preparat în mediu complet. TNBS ar trebui utilizat ca martor pozitiv pentru măsurarea expresiei CD86 la o concentrație unică finală în placă (50 µg/ml) determinând o viabilitate celulară de > 70 %. Pentru a obține o concentrație de 50 µg/ml de TNBS în placă, se prepară o soluție mamă de 1 M (și anume, 293 mg/ml) de TNBS în mediu complet, care este apoi diluată de 2 930 de ori în mediu complet până la o soluție de lucru de 100 µg/ml. Acidul lactic (AL, CAS 50-21-5) ar trebui utilizat ca martor negativ în cantitate de 200 µg/ml solubilizat în mediu complet (dintr-o soluție mamă de 0,4 mg/ml). În fiecare placă din cadrul fiecărui test sunt preparate trei replici de martor netratat în mediu complet, martor tratat cu solvent/vehicul, precum și martori negativi și pozitivi (12). Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor. Criteriile de acceptare a testului sunt aceleași cu cele descrise pentru substanța chimică de testat (a se vedea punctul 12).

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

17. Martorul tratat cu solvent/vehicul sau soluțiile de lucru descrise la punctele 14-16 sunt amestecate 1:1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe placa cu fund plat de 96 de godeuri (a se vedea punctul 12). Plăcile tratate sunt apoi incubate timp de 45 ± 3 ore la 37 °C în soluție cu 5 % CO_2. Înainte de incubație, plăcile sunt închise etanș cu membrană semipermeabilă pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între celulele tratate cu substanțe chimice de testat (12).

Colorarea celulelor

18. După 45±3 ore de expunere, celulele sunt transferate într-o placă de microtitrare în formă de V și colectate prin centrifugare. Interferența în solubilitate este definită ca fiind cristale sau picături observate la microscop la 45±3 ore după tratament (înainte de colorarea celulelor). Se îndepărtează supernatantele, iar restul celulelor sunt spălate o singură dată cu o soluție salină cu tampon de fosfat (PBS) de 100 µl rece ca gheața conținând 5 % ser fetal de vițel (soluție tampon de colorare). După centrifugare, celulele sunt resuspendate în 100 µl de soluție tampon de colorare și colorate cu 5 µl (de exemplu, 0,25 µg) de anticorpi anti-CD86 etichetați FITC sau IgG1 (izotip) de șoarece la 4 °C timp de 30 de minute, departe de lumină. Ar trebui să se utilizeze anticorpii descriși în Protocolul DB-ALM nr. 183 al U-SENS ™ (pentru CD86: clona BD-PharMingen #5556 57: Fun-1 sau clona Caltag/Invitrogen # MHCD8601: BU63; și pentru IgG1: BD-PharMingen #5557 48 sau Caltag/Invitrogen # GM4992). Pe baza experienței dezvoltatorilor de teste, intensitatea fluorescenței anticorpilor este, de obicei, consecventă între diferite loturi. Pentru test ar putea fi utilizate alte clone sau alt furnizor de anticorpi pentru care a fost efectuată cu succes verificarea de reactivitate (a se vedea punctul 11). Cu toate acestea, utilizatorii ar putea avea în vedere titrarea anticorpilor în condițiile din laboratorul propriu pentru a defini cea mai bună concentrație de utilizare. Se poate utiliza și un alt

sistem de detecție, de exemplu, anticorpi anti-CD86 marcați cu fluorocrom în cazul în care se poate demonstra că aceștia generează rezultate similare cu cele ale anticorpilor conjugați FITC, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. După spălare de două ori în 100 µl de soluție tampon de colorare și o dată în 100 µl PBS rece ca gheața, celulele sunt resuspendate în PBS rece ca gheața (de exemplu, 125 µl pentru probe analizate manual eprubetă cu eprubetă sau 50 µl utilizând o placă cu auto-eșantionare) și se adaugă soluție IP (concentrație finală de 3 µg/ml). Se pot utiliza alți markeri de citotoxicitate, cum ar fi 7aminoactinomicina D (7-AAD) sau albastru de tripan, în cazul în care se poate demonstra că acțiunile de colorare alternative generează rezultate similare cu IP, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2.

Analiza prin citometria de flux

19. Nivelurile de expresie ale CD86 și viabilitatea celulară sunt analizate folosind citometria de flux. Celulele sunt afișate în interiorul unui segment cu puncte având o dimensiune (FSC) și o granularitate (SSC) stabilite la scara logaritmică pentru a identifica în mod clar populația dintr-un prim grup R1 și a elimina resturile. Pentru fiecare godeu se impune un număr total vizat de 10 000 de celule în grupul (gate) R1. Celulele din același grup R1 sunt afișate pe un segment cu puncte FL3 sau FL4/SSC. Celulele viabile sunt delimitate prin plasarea unui al doilea grup R2 care selectează populația de celule negative de iodură de propidiu (canalul FL3 sau FL4). Viabilitatea celulară poate fi calculată folosind următoarea ecuație prin programul de analiză citometrică. Atunci când viabilitatea celulară este scăzută, ar putea fi acumulate până la 20 000 de celule, inclusiv celule moarte. În mod alternativ, pot fi acumulate date timp de un minut după inițierea analizei.

$$\textit{Viabilitatea celulară} = \frac{\textit{Numărul de celule vii}}{\textit{Numărul total de celule acumulate}} \times 100$$

Apoi se măsoară procentul de celule pozitive FL1 se măsoară între aceste celule viabile grupate sub R2 (în cadrul R1). Exprimarea CD86 la suprafața celulei este analizată pe un segment cu puncte FL1/SSC care formează un grup de celule viabile (R2).

Pentru godeurile cu mediu complet/IgG1, markerul de analiză este stabilit în apropierea populației principale, astfel încât martorii tratați cu mediu complet să aibă IgG1 în intervalul-țintă 0,6-0,9 %.

Interferența culorii este definită ca o schimbare a segmentului cu puncte etichetat cu FITC IgG1 (media geometrică IgG1 FL1 S.I. ≥ 150 %).

Indicele de stimulare (S.I.) al CD86 pentru celulele martorilor (netratate sau în soluție de 0,4 % DMSO) și celulele tratate chimic se calculează conform ecuației următoare:.

$$S.I. = \frac{\%\ \textit{din}\ CD86^{+}\textit{celule tratate} - \%\ \textit{din}\ IgG1^{+}\textit{celule tratate}}{\%\ \textit{din}\ CD86^{+}\textit{control cells} - \%\ \textit{din}\ IgG1^{+}\textit{control cells}} \times 100$$

% din celulele netratate ale martorilor $IgG1^{+}$: denumit drept procent din celulele IgG1 pozitive FL1 definite cu markerul de analiză (interval acceptat de ≥ 0,6 % și < 1,5 %, a se vedea punctul 22) în celulele viabile netratate.

% din celulele tratate/ale martorilor $IgG1^{+}/CD86^{+}$: denumit drept procent din celulele IgG1 pozitive FL1/CD86 măsurate fără deplasarea markerului de analiză între celulele viabile ale martorilor/tratate.

Date Și Raportare

Evaluarea datelor

20. În testul U-SENS ™ se calculează următorii parametri: valoarea CV70, adică o concentrație care indică 70 % din supraviețuirea celulelor U937 (30 % citotoxicitate) și valoarea EC150, și anume, concentrația la care substanțele chimice de testat au indus un indice de stimulare (S.I.) de 150 % pentru CD86.

CV70 se calculează prin interpolare logliniară folosind următoarea ecuație:

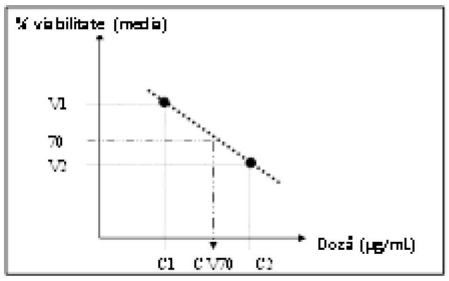
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

Unde:

V1 reprezintă valoarea minimă a viabilității celulare peste 70 %

V2 reprezintă valoarea maximă a viabilității celulare sub 70 %

C1 și C2 sunt concentrații care arată valoarea viabilității celulare V1 și, respectiv, V2



Se pot utiliza alte abordări pentru derivarea valorii CV70, cu condiția să se demonstreze că acest lucru nu are niciun impact asupra rezultatelor (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare).

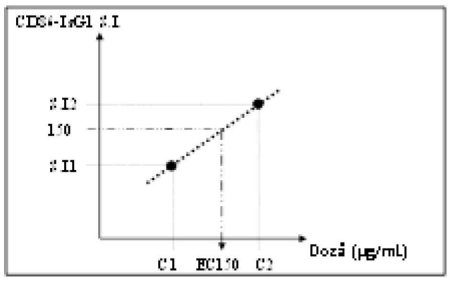
EC150 se calculează prin interpolare logliniară folosind următoarea ecuație:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Unde:

C2 este cea mai mare concentrație în µg/ml cu S.I. al CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 este cea mai redusă concentrație în µg/ml cu S.I. al CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



Se calculează valorile EC150 și CV70

— pentru fiecare test: valorile EC150 și CV70 individuale sunt utilizate ca instrumente de investigare a efectului reacției concentrației generate de creșterea CD86 (a se vedea punctul 14),

— valoarea totală a CV70 este determinată pe baza valorilor viabilității medii (12),

— valoarea totală a EC150 este determinată pe baza valorii medii a S.I. al valorilor CD86 pentru substanța chimică de testat prevăzută ca fiind POZITIVĂ în urma testului U-SENS ™ (a se vedea punctul 21) (12).

Model predictiv

21. Pentru măsurarea expresiei CD86, fiecare substanță chimică de testat este testată în cel puțin patru concentrații și prin cel puțin două teste independente (efectuate în zile diferite) pentru a se obține o singură estimare (NEGATIV sau POZITIV).

— Concluzia individuală a unui test U-SENS ™ este considerată negativă (denumită în continuare „N") dacă S.I. al CD86 este mai mic de 150 % la toate concentrațiile care nu sunt citotoxice (viabilitate celulară ≥ 70 %) și dacă nu se observă interferențe (citotoxicitate, solubilitate: a se vedea punctul 18 sau culoarea: a se vedea punctul 19 indiferent de concentrațiile care nu sunt citotoxice la care este detectată interferența). În toate celelalte cazuri: atunci când S.I. al CD86 este mai mare sau egal cu 150 % și/sau se observă interferențe, concluzia individuală a unui test U-SENS ™ este considerată pozitivă (denumită în continuare „P").

— O estimare în urma unui test U-SENS™ este considerată NEGATIVĂ dacă cel puțin două teste independente sunt negative (N) (figura 1). Dacă primele două teste sunt ambele negative (N), estimarea U-SENS™ este considerată NEGATIVĂ și nu trebuie să fie efectuat un al treilea test.

— O estimare în urma unui test U-SENS™ este considerată POZITIVĂ dacă cel puțin două teste independente sunt pozitive (P) (figura 1). Dacă primele două teste sunt ambele pozitive (P), estimarea U-SENS™ este considerată POZITIVĂ și nu trebuie să fie efectuat un al treilea test.

— Deoarece nu este efectuată o analiză pentru determinarea dozelor, există o excepție în cazul în care, în cadrul primului test, S.I. al CD86 este mai mare sau egal cu 150 % doar la cea mai mare concentrație care nu este citotoxică. Atunci testul este considerat a fi NECONCLUDENT (NC) și ar trebui să se testeze concentrații suplimentare (între cea mai mare concentrație fără citotoxicitate și cea mai scăzută concentrația cu citotoxicitate - a se vedea punctul 20) în cadrul unor teste suplimentare. În cazul în care un test este identificat ca fiind NC, ar trebui să fie efectuate cel puțin încă două teste, precum și un al patrulea test în cazul în care al doilea și al treilea test nu sunt concordante (N și/sau P independent) (figura 1). Testele efectuate în continuare vor fi considerate pozitive chiar dacă numai în cazul unei concentrații care nu este citotoxică este generată o valoare a CD86 egală cu sau peste 150 %, deoarece valoarea concentrației a fost ajustată pentru substanța chimică de testat specifică. Estimarea finală va fi bazată pe rezultatul majoritar al celor trei sau patru teste individuale (și anume: două din trei sau două din patru) (figura 1).

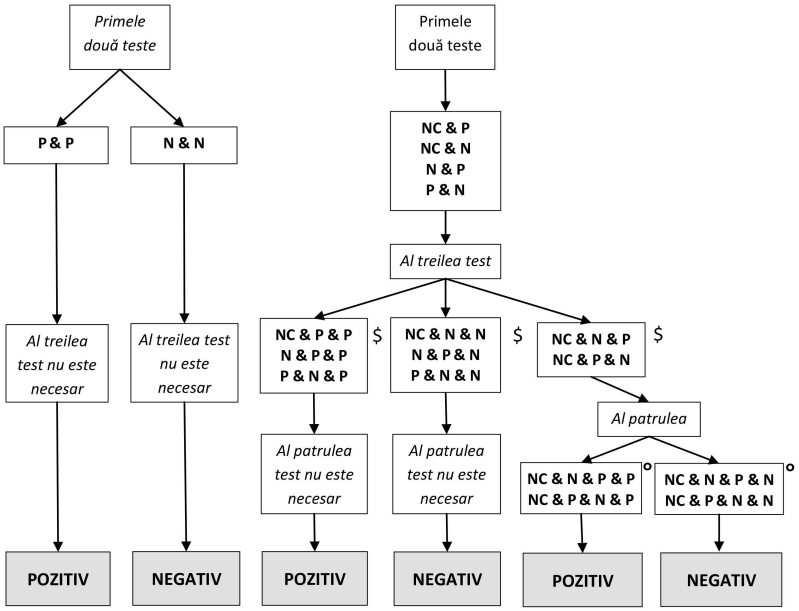


Figura 1: Model predictiv utilizat în testul U-SENS™. O estimare U-SENS™ ar trebui să fie analizată în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 4 și de la punctele 7, 8 și 9 din Introducerea generală.

N: Test fără o valoare pozitivă a CD86 sau observarea unei interferențe;

P: Test cu o valoare pozitivă a CD86 și/sau cu observarea unei (unor) interferențe;

NC: Neconcludent. Primul test fără concluzii atunci când valoarea CD86 este pozitivă numai la cea mai mare concentrație necitotoxică;

#: O concluzie individuală de tipul Neconcludent (NC), care este atribuită numai primului test efectuat determină în mod automat necesitatea efectuării unui al treilea test pentru a ajunge la o majoritate a concluziilor de tip Pozitiv (P) sau Negativ (N) în cadrul a cel puțin două din trei teste independente.

$: Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul cele trei teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste prezentate în caseta de mai sus.

°: Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul cele patru teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor trei teste prezentate în caseta de mai sus.

Criterii de acceptare

22. Atunci când este utilizat testul U-SENS™ (12), ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare.

— La sfârșitul perioadei de expunere de 45±3 ore, viabilitatea medie a celulelor U937 netratate triple trebuia să fie > 90 % și nu se observă nicio deviere a expresiei CD86. Expresia de bază a valorii CD86 a celulelor U937 netratate a trebuit să fie cuprinsă între ≥ 2 % și ≤ 25 %.

— În cazul în care DMSO este utilizat ca solvent, valabilitatea martorului tratat cu vehicul DMSO este evaluată prin calcularea unui S.I. al DMSO în raport cu celulele netratate, iar viabilitatea medie a celulelor triple a trebuit să fie > 90 %. Martorul tratat cu vehicul DMSO este valabil dacă valoarea medie a S.I. triplu al CD86 a fost sub 250 % din valoarea medie a S.I. al valorii CD86 a celulelor U937 netratate.

— Testele sunt considerate valabile dacă cel puțin două din trei valori IgG1 ale celulelor U937 netratate s-au încadrat între ≥ 0,6 % și < 1,5 %.

— Martorul negativ testat în paralel (acidul lactic) este considerat valabil dacă cel puțin două din cele trei replici au fost negative (CD86 S.I. < 150 %) și fără citotoxicitate (viabilitate celulară ≥ 70 %).

— Martorul pozitiv (TNBS) a fost considerat valabil dacă cel puțin două din cele trei replici au fost pozitive (CD86 S.I. < 150 %) și fără citotoxicitate (viabilitate celulară ≥ 70 %).

Raportul testului

23. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat

Substanța monocomponentă

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— aspectul fizic, solubilitate în mediu complet, solubilitate în DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec:

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— aspectul fizic, solubilitate în mediu complet, solubilitate în DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Martori

Martor pozitiv

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— aspectul fizic, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil și dacă este cazul;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor, dacă este cazul.

Martor negativ și tratat cu solvent/vehicul

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori tratați cu solvent/vehicul decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— descrierea testului utilizat;

— Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la au fost obținute acestea);

— citometria de flux utilizată (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentelor, anticorpii și markerul de citotoxicitate utilizat;

— Procedura utilizată pentru a demonstra capabilitatea laboratorului de a efectua testul prin testarea unor substanțe de verificare și procedura utilizată pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp, de exemplu, datele anterioare privind martorii și/sau datele anterioare privind verificările asupra reactivității.

Criterii de acceptare a testului

— viabilitatea celulară valorile S.I. ale CD86 obținute cu martorul tratat cu solvent/vehicul în comparație cu intervalele de acceptare;

— viabilitatea celulară și valorile S.I. obținute cu martorul pozitiv în comparație cu intervalele de acceptare;

— Viabilitatea celulară a tuturor concentrațiilor testate ale substanței chimice de testat.

Procedura de testare

— Numărul de teste utilizate;

— Concentrațiile substanței chimice de testat, timpul de aplicare și de expunere utilizat (dacă acestea diferă de cele recomandate)

— Durata expunerii;

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— Prezentarea tabelară a datelor, inclusiv a valorilor CV70 (dacă este cazul), a valorilor de viabilitate celulară, a valorilor CE150 (dacă este cazul) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv în cadrul fiecărui test, precum și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat în funcție de modelul predictiv;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute în urma testului U-SENS™;

— Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(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. Material accesibil la adresa: 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. Publicație disponibilă la adresa: [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. Publicație disponibilă la adresa: 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) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: [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) OCDE. (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: 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. Material accesibil la adresa: [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) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Organizația Națiunilor Unite ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, a șasea ediție revizuită, New York & Geneva: United Nations Publications. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: 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, Bruxelles. Publicație disponibilă la adresa: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Apendicele 2.1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (14).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): o serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (15).

Reacția concentrației CD86: Există o dependență de concentrație (sau o reacție a concentrației) atunci când o concentrație pozitivă (CD86 S.I. ≥ 150) este urmată de o concentrație cu o valoare S.I. a CD86 în creștere.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV70: Concentrația estimată care indică o viabilitate celulară de 70 %.

Deviere: O deviere este definită prin următoarele situații i) valoarea % corectată a $CD86^+$ a celei de a treia replici a martorului netratat este mai mică decât 50 % din media valorii % corectate a $CD86^+$ a primei și celei de a doua replici ale martorului netratat; și ii) valoarea % corectată a $CD86^+$ a celei de a treia replici a martorului negativ este mai mică decât 50 % din media valorii % corectate a CD86+ a primei și celei de a doua replici ale martorului negativ.

EC150: concentrațiile estimate care arată S.I. de 150 % al expresiei CD86.

Citometria de flux: o tehnică citometrică prin care celulele au fost suspendate într-un flux fluid una câte una, printr-o focalizare a luminii care excită și care este difuzată în modele caracteristice asupra celulelor și a componentelor acestora; celulele sunt etichetate frecvent cu markeri fluorescenți, astfel încât lumina să fie absorbită mai întâi și apoi emisă la frecvențe modificate.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (Strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Prehaptene: substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice, de exemplu, prin oxidare.

Prohaptene: substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (14).

Fiabilitate: Măsuri ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (14).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (14).

S.I.: Indice de stimulare. Valorile relative ale intensității medii a fluorescenței la celulele tratate chimic comparativ cu celulele tratate cu solvent/vehicul.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (14).

Soluție tampon de colorare: O soluție salină tamponată cu fosfat conținând o cantitate de 5 % ser fetal de vițel.

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestui test.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (16).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Test valabil: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (14).

Apendicele 2.2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea în mod corect a estimării U-SENS™ pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CV70 și EC150 care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin 8 dintre cele 10 substanțe de verificare. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele sensibilizării cutanate. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu testul U-SENS™. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru testul U-SENS™ (1) (8).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice cu testul U-SENS™

Substanțe de verificare	NR CAS	Stare fizică	Estimare *in vivo* [1]	U-SENS Solvent/Vehicul	U-SENS CV70 Interval de referință în µg/ml [2]	U-SENS Interval de referință pentru EC150 în µg/ml [2]
4-fenilendiamină	106-50-3	Solid	Sensibilizant (puternic)	Mediu complet [3]	< 30	Pozitiv (≤ 10)
Acid picril-sulfonic	2508-19-2	Lichid	Sensibilizant (puternic)	Mediu complet	>50	Pozitiv (≤ 50)
Maleat de dietil	141-05-9	Lichid	Sensibilizant (moderat)	DMSO	10-100	Pozitiv (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Solid	Sensibilizant (moderat)	Mediu complet	>100	Pozitiv (≤ 50)
Alcool cinamic	104-54-1	Solid	Sensibilizant (slab)	DMSO	>100	Pozitiv (10-100)
4-alilanisol	140-67-0	Lichid	Sensibilizant (slab)	DMSO	>100	Pozitiv (<200)
Zaharină	81-07-2	Solid	Non-sensibilizant	DMSO	>200	Negativ (> 200)
Glicerină	56-81-5	Lichid	Non-sensibilizant	Mediu complet	>200	Negativ (> 200)
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Non-sensibilizant	Mediu complet	>200	Negativ (> 200)
Acid salicilic	69-72-7	Solid	Non-sensibilizant	DMSO	>200	Negativ (> 200)

Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

([1]) Pericolul și estimarea (potența) *in vivo* se bazează pe date LLNA (1) (8). Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (17).

([2]) Pe baza valorilor istorice observate (1) (8).

([3]) Mediu complet: Mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal de vițel, 2 mM L-glutamină, 100 unități/ml penicilină și 100 µg/ml de streptomicină (8).

Apendicele 3

SENSIBILIZARE CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL IL-8 LUC

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Spre deosebire de testele care analizează expresia markerilor celulari de suprafață, testul IL8-Luc cuantifică modificările expresiei IL-8, o citocină asociată activării celulelor dendritice (CD). În linia celulară raportoare de tip IL-8 derivată din THP-1 (THP-G8, determinată pornind de la linia celulară monocitică acută la om afectată de leucemie THP1), expresia IL-8 se măsoară în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1). Expresia luciferazei este utilizată apoi pentru a contribui la diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele.

2. Testul IL-8 Luc a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare (2) realizat de Centrul Japonez pentru Validarea Metodelor Alternative (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods - JaCVAM), **Ministerul economiei, comerțului și industriei** (METI) și Societatea Japoneză **pentru Metode Alternative la Testarea pe Animale (JSAAE**) și, ulterior, supus unei evaluări inter pares independente desfășurate sub auspiciile JaCVAM (3) și ale Ministerului Sănătății, Muncii și Bunăstării (MHLW) cu sprijinul **International Cooperation on Alternative Test** Methods (ICATM). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, testul IL-8 Luc este considerat util în cadrul unei IATA pentru a diferenția substanțele sensibilizante de cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor din cadrul testului IL-8 Luc în combinație cu alte informații sunt prezentate în referințe bibliografice (4) (5) (6).

3. Testul IL-8 Luc s-a dovedit a fi transmisibil la laboratoare cu experiență în cultura celulelor și măsurarea luciferazei. În cadrul aceluiași laborator și între laboratoare ratele de reproductibilitate au fost de 87,7 % și, respectiv, 87,5 % (2). Datele generate în cadrul studiului de validare (2) și alte lucrări publicate (1) (6) arată că, în comparație cu LLNA, prin testul IL-8 Luc un număr de 118 din 143 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative, iar 25 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia testului IL-8 Luc privind distincția între sensibilizantele pentru piele (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nesensibilizantele pentru piele (neîncadrate într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentului CLP) este de 86 % (101/118) cu o sensibilitate de 96 % (92/96) și o specificitate de 41 % (9/22). Cu excepția substanțelor din afara domeniului de aplicabilitate descris mai jos (punctul 5), un număr de 113 din 136 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative prin testul IL-8 Luc, iar 23 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia testului IL-8 Luc este de 89 % (101/113), sensibilitatea de 96 % (92/96) și specificitatea de 53 % (9/17). Folosind datele despre oameni citate în Urbisch et al. (7), prin testul IL-8 Luc un număr de 76 din 90 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative, iar 14 substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia este de 80 % (61/76), sensibilitatea de 93 % (54/58) și specificitatea de 39 % (7/18). Cu excepția substanțelor din afara domeniului de aplicabilitate, un număr de 71 din 84 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative prin testul IL-8 Luc, iar 13 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia este de 86 % (61/71, sensibilitatea de 93 % (54/58) și specificitatea de 54 % (7/13). Există o probabilitate mai mare să apară estimări negative false în urma testului IL-8 Luc în cazul substanțelor chimice care prezintă un nivel scăzut/moderat de potență de sensibilizare cutanată (subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (6). Împreună, informațiile sprijină rolul testului IL-8 Luc în ceea ce privește identificarea pericolelor de sensibilizare a pielii. Valoarea preciziei furnizate pentru testul IL-8 Luc ca și test independent este doar orientativă, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea testelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile, testul IL-8 Luc s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost stabilit în cadrul studiilor *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice (2) (6).

5. Deși testul IL-8 Luc utilizează X-VIVO™ 15 ca și solvent, prin acesta au fost evaluate în mod corect substanțele chimice având Log K_{ow} >3,5, precum și cele având o solubilitate în apă de aproximativ 100 μg/ml, astfel cum a fost calculată prin EPI Suite™, iar performanța acestuia de a detecta sensibilizantele cu o solubilitate mai scăzută în apă este mai bună decât a testului IL-8 Luc în care se utilizează dimetilsulfoxid (DMSO) ca și solvent (2). Însă rezultatele negative obținute în cazul substanțelor chimice de testat care nu se dizolvă în 20 mg/ml pot produce rezultate negative false din cauza incapacității acestora de a se dizolva în X-VIVO™ 15. Prin urmare, nu ar trebui să se ia în considerare rezultatele negative în cazul acestor substanțe chimice. În cadrul studiului de validare a fost observată o rată ridicată de rezultate negative false în cazul anhidridelor. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare (8) și a condițiilor experimentale, este posibil ca prohaptenele (substanțe care necesită activare metabolică) și prehaptenele (substanțe activate prin oxidare cu aer) să genereze rezultate negative în cadrul testului. Cu toate acestea, deși rezultatele negative pentru prehaptene/prohaptene ar trebui să fie interpretate cu prudență, prin testul IL-8 Luc 11 din 11 prehaptene, 6/6 prohaptene și 6/8 prehaptene/prohaptene au fost estimate corect în cadrul setului de date pentru IL-8 Luc (2). Pe baza revizuirii cuprinzătoare efectuate recent asupra a trei teste care nu se bazează pe animale (DPRA, KeratinoSens™ și h-CLAT) pentru a detecta prehaptene și prohaptene (9) și pe baza faptului că celulele THP-G8 utilizate în testul IL-8 Luc constituie o linie celulară derivată din THP-1 care este utilizată în testul h-CLAT, testul IL-8 Luc poate contribui, de asemenea, la creșterea sensibilității testelor care nu se bazează pe animale pentru a detecta prehaptene și prohaptene în combinația cu alte teste. Surfactanții testați până la acest moment au generat rezultate pozitive (false) indiferent de tipul lor (de exemplu, cationic, anionic sau non-ionic). În cele din urmă, substanțele chimice care interferează cu luciferaza pot avea efecte asupra activității/măsurării acesteia, cauzând o inhibiție aparentă sau o creștere a luminiscenței (10). De exemplu, concentrațiile de fitoestrogen mai mari de 1 μM au fost raportate a interfera cu semnalele de luminiscență ale altor teste asupra genei raportoare bazate pe luciferază din cauza supraactivării genei raportoare pentru luciferază. În consecință, trebuie să se examineze cu atenție expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau compuși, care este suspectată de a produce o activare similară fitoestrogenilor a genei raportoare pentru luciferază (11). Pe baza considerațiilor de mai sus, surfactanții, anhidridele și substanțele chimice care interferează cu luciferaza sunt în afara domeniului de aplicabilitate al acestui test. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a testului IL-8 Luc la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, testul nu ar trebui utilizat pentru respectivele categorii specifice.

6. Conform descrierii de mai sus, testul IL-8 Luc susține diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele. Sunt necesare studii suplimentare, de preferat pe baza datelor umane, pentru a stabili dacă rezultatele testului IL-8 Luc pot contribui la evaluarea potenței atunci când sunt analizate împreună cu alte surse de informații.

7. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 3.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Testul IL-8 Luc utilizează o linie celulară monocitică umană afectată de leucemie THP-1 obținută de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, SUA). Utilizând această linie celulară, Departamentul de Dermatologie din cadrul Universității School of Medicine din Tohoku a stabilit o linie celulară raportoare IL-8 derivată din THP-1, denumită THP-G8, care poartă gene de luciferază Stable Luciferase Orange (SLO) și Stable Luciferase Red (SLR) sub controlul promotorilor IL-8 și, respectiv, ai gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei (GAPDH) (1). Acest lucru permite măsurarea cantitativă a inducției genei luciferază prin detectarea luminiscenței separat de lumina bine stabilită care produce substraturi de luciferază ca indicator al activității IL-8 și GAPDH la celule în urma expunerii la substanțe chimice sensibilizante.

9. Sistemul de testare cu două culori cuprinde o luciferază care emite culoarea portocalie (SLO; λmax = 580 nm) (12) pentru expresia genică a promotorului IL-8 și o luciferază care emite culoarea roșie (SLR; λmax = 630 nm) (13) pentru expresia genică a promotorului martorului intern, GAPDH. Cele două luciferaze care emit culori diferite la reacția cu firefly d-luciferin și luminiscența lor se măsoară simultan în cadrul unei reacții într-o singură etapă prin detașarea emisiilor de amestecul de testare cu ajutorul unui filtru optic (14) (apendicele 3.2).

10. Celulele THP-G8 sunt tratate timp de 16 ore cu substanța chimică de testat, după care se măsoară activitatea luciferazei SLO (SLOA-LA), care reflectă activitatea promotorului IL8 și activitatea luciferazei SLR (SLR-LA), care reflectă activitatea promotorului GAPDH. Pentru a facilita înțelegerea abrevierilor, SLO-LA și SLR-LA sunt desemnate ca fiind IL8LA și, respectiv, GAPLA. Tabelul 1 prezintă o descriere a termenilor asociați activității luciferazei în cadrul testului IL-8 Luc. Valorile măsurate sunt utilizate pentru a calcula valoarea IL8LA normalizată (nIL8LA), care este raportul dintre IL8LA și GAPLA; inducția nIL8LA (Ind-IL8LA), care este raportul dintre mediile aritmetice ale valorilor măsurate de patru ori ale nIL8LA ale celulelor THP-G8 tratate cu o substanță chimică de testat și ale valorilor nIL8LA ale celulelor THP-G8 netratate; și inhibiția GAPLA (InhGAPLA), care este raportul dintre mediile aritmetice ale valorilor măsurate de patru ori ale GAPLA ale celulelor THP-G8 tratate cu o substanță chimică de testat și ale valorilor GAPLA ale celulelor THP-G8 netratate, utilizat ca indicator pentru citotoxicitate.

Tabelul 1

Descrierea termenilor asociați activității luciferazei în testul IL-8 Luc

Abrevieri	Definiție
GAPLA	Activitatea luciferazei SLR care reflectă activitatea promotorului GAPDH
IL8LA	Activitatea luciferazei SLO care reflectă activitatea promotorului IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice/nIL8LA a celulelor netratate
Inh-GAPLA	GAPLA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice/GAPLA a celulelor netratate
CV05	Concentrația cea mai scăzută a substanței chimice la care Inh-GAPLA devine < 0,05.

11. Există standarde de performanță (PS) (15) pentru a facilita validarea testelor *in vitro* IL-8 ale luciferazei modificate, care sunt similare cu testul IL-8 Luc, și a permite modificarea promptă a Ghidului 442E al OCDE privind testele pentru includerea acestora. Sistemul de acceptare reciprocă a datelor (MAD) al OCDE va fi garantat doar pentru testele validate în conformitate cu PS, în cazul în care aceste teste au fost revizuite și incluse în Ghidul 442E al OCDE privind testele (16).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

12. Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice pentru metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice, utilizând cele 10 substanțe de verificare enumerate în apendicele 3.3, în conformitate cu bunele practici privind metodele *in vitro* (17). În plus, utilizatorii testelor ar trebui să mențină o bază de date istorice generate în urma verificărilor de reactivitate (a se vedea punctul 15) și cu martori pozitivi și tratați cu solvent/vehicul (a se vedea punctele 21-24) și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul propriu este asigurată în timp.

PROCEDURA

13. Există procedura standard de operare (PSO) în cazul testului IL-8 Luc, care ar trebui utilizată la efectuarea testului (18). Laboratoarele care doresc să efectueze testul pot obține linia celulară recombinantă THP-G8 de

la laboratorul GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia, la semnarea unui acord de transfer de material (ATM) în conformitate cu condițiile modelului OCDE. În paragrafele următoare sunt descrise componentele și procedurile principale ale testului.

Pregătirea celulelor

14. Linia celulară THP-G8 de la GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia ar trebui să fie utilizată pentru efectuarea testului IL-8 Luc (a se vedea punctele 8 și 13). La primire, celulele sunt multiplicate (2-4 pasaje) și păstrate înghețate ca stoc omogen. Celulele din acest stoc pot fi multiplicate până la maximum 12 treceri sau maximum 6 săptămâni. Mediul utilizat pentru multiplicare este mediul de cultură RPMI-1640 care conține 10 % ser fetal bovin (FBS), soluție antibiotică/antimicotică (100 U/ml de penicilină G, 100µg/ml de streptomicină și 0,25µg/ml de amfotericină B în 0,85 % soluție salină) (de exemplu, GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml Puromycin (de exemplu, CAS:58-58-2) și 300 µg/ml G418 (de exemplu, CAS:108321-42-2).

15. Înainte de a fi utilizate pentru testare, celulele ar trebui să fie calificate prin efectuarea unei verificări de reactivitate. Această verificare ar trebui efectuată la 1-2 săptămâni sau după 24 de pasaje de la decongelare, cu ajutorul martorului pozitiv, bromura 4-nitrobenzil (4NBB), (CAS:100-11-8, cu puritate ≥ 99 %) și al martorului negativ, acidul lactic (AL) (CAS:50-21-5, cu o puritate ≥ 85 %). 4-NBB ar trebui să producă un răspuns pozitiv la Ind-IL8LA (≥ 1,4), iar AL ar trebui să producă un răspuns negativ la Ind-IL8LA (< 1,4). Sunt utilizate pentru test numai celulele pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes. Verificarea ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 22-24.

16. În scopul testării, celulele THP-G8 sunt însămânțate la o densitate de 5×10^5 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură timp de 48-96 de ore. În ziua testului, celule recoltate din balonul de cultură sunt spălate cu RPMI-1640 conținând 10 % FBS fără antibiotice, și apoi resuspendate în RPMI-1640 conținând 10 % FBS fără antibiotice la 1×10^6 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (de exemplu, Costar Cat#3603) de 50 µl (5×10^4 celule/godeu).

Pregătirea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

17. Substanța chimică de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru testul IL-8 Luc, substanțele chimice de testat se dizolvă în X-VIVO™ 15, un mediu fără ser disponibil în comerț (Lonza, 04-418Q), până la concentrația finală de 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se adaugă la 20 mg de substanță chimică de testat (indiferent de solubilitatea substanței chimice) într-o eprubetă de microcentrifugare și se aduce la un volum de 1 ml, apoi se rotește viguros și se agită pe un rotor la o viteză maximă de 8 rpm timp de 30 de minute la o temperatură ambiantă de aproximativ 20 ,°C. Apoi, dacă substanțele chimice solide sunt încă solide, eprubeta este supusă procesului sonic până când substanța chimică este dizolvată complet sau dispersată în mod stabil. Pentru substanțele chimice de testat solubile din X-VIVO™ 15, soluția este diluată cu un factor de 5 cu X-VIVO™ 15 și utilizată ca soluție mamă X-VIVO™ 15 a substanței chimice de testat (4 mg/ml). În cazul substanțelor chimice de testat care nu sunt solubile în X-VIVO™ 15, amestecul este rotit din nou timp de cel puțin 30 de minute, apoi centrifugat la 15000 rpm (≈ 20000*g*) timp de 5 minute; supernatantul rezultat este utilizat ca soluție mamă X-VIVO™ 15 a substanței chimice de testat. Utilizarea altor solvenți, cum ar fi DMSO, apă, sau mediu de cultură, ar trebui să fie justificată științific. Procedura detaliată pentru dizolvarea substanțelor chimice este prezentată în apendicele 3.5. Soluțiile X-VIVO™ 15 descrise la punctele 18-23 sunt amestecate 1:1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (a se vedea punctul 16).

18. Primul test are drept scop determinarea concentrației citotoxice și examinarea potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Folosind X-VIVO™ 15, diluțiile în serie ale soluțiilor mamă X-VIVO™ 15 ale substanțelor chimice de testat sunt efectuate la factorul doi de diluție (a se vedea apendicele 3.5) folosind un bloc de analiză cu 96 de godeuri (de exemplu: Costar Cat#EW-01729-03). În continuare, se adaugă 50 µl de soluție diluată în fiecare godeu la 50 µl de suspensie celulară pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Astfel, pentru substanțele chimice de testat care sunt solubile în XVIVO™ 15, concentrațiile finale ale substanțelor chimice de testat variază între 0,002 și 2 mg/ml (apendicele 3.5). Pentru substanțele chimice de testat care nu sunt solubile în XVIVO™ 15 la 20 mg/ml, se determină numai factorii de diluare care se încadrează între 2 și 2^{10}, deși concentrațiile finale reale ale substanțelor chimice de testat rămân incerte și depind de concentrația saturată a substanțelor chimice de testat din soluția mamă XVIVO™ 15.

19. În cadrul testelor ulterioare (și anume, a doua, a treia și a patra replică), soluția mamă X-VIVO™ 15 este produsă la o concentrație de patru ori mai mare decât concentrația de viabilitate celulară 05 (CV05; cea mai scăzută concentrație la care Inh-GAPLA devine < 0,05) în primul experiment. Dacă Inh-GAPLA nu scade sub 0,05 la concentrația cea mai mare în cadrul primului test, soluția mamă X-VIVO™ 15 este preparată la cea mai ridicată concentrație a primului test. Concentrația CV05 se calculează împărțind concentrația soluției mamă din primul test la factorul de diluare pentru CV05 (X) [factorul de diluție CV05 (X); factorul de diluție necesar pentru diluarea soluției mamă la CV05) (a se vedea apendicele 3.5). În cazul substanțelor de testat care nu sunt solubile în X-VIVO la 20 mg/ml, CV05 este determinată prin concentrația soluției mamă × 1/X. Pentru testele 24, este preparată a doua soluție mamă ca 4 × CV05 (apendicele 3.5).

20. Diluțiile în serie ale soluțiilor mamă de gradul doi X-VIVO™ 15 sunt realizate cu un factor de diluare de 1,5 utilizând un bloc de analiză cu 96 de godeuri. În continuare, se adaugă 50 µl de soluție diluată în fiecare godeu la 50 µl de suspensie celulară în godeurile unei plăci de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Fiecare concentrație a fiecărei substanțe chimice de testat ar trebui să fie testată în patru godeuri. Eșantioanele sunt apoi amestecate pe un agitator cu placă și incubate timp de 16 ore la 37 °C și în soluție de 5 % CO_2, după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de mai jos.

21. Martorul tratat cu solvent este amestecul de 50 µl/godeu de X-VIVO™ 15 și de 50 µl/godeu de suspensie celulară în RPMI-1640 conținând 10 % FBS.

22. Martorul pozitiv recomandat este 4-NBB. Într-o eprubetă de microcentrifugare se prepară 20 mg de 4-NBB, la care se adaugă X-VIVO™ 15 până la 1 ml. Eprubeta se rotește viguros și se agită pe un rotor la o viteză maximă de 8 rpm timp de 30 de minute. După centrifugare la 20000 g timp de 5 minute, supernatantul este diluat cu un factor de 4 în XVIVO™ 15 și o cantitate de 500 µl de supernatant diluat se transferă într-un godeu din blocul de analiză cu 96 de godeuri. Supernatantul diluat este diluat în continuare în XVIVO™ 15 la factori de 2 și 4 și se adaugă 50 µl de soluție la 50 µl de suspensie celulară THP-G8 în godeurile unei plăci cu 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (apendicele 3.6). Fiecare concentrație a martorului pozitiv ar trebui să fie testată în patru godeuri. Placa se agită pentru un agitator cu placă și se incubează într-un incubator cu CO_2 timp de 16 ore (37 °C, 5 % CO_2), după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de la punctul 29.

23. Martorul negativ recomandat este AL. Se prepară 20 mg de AL într-o eprubetă de microcentrifugare de 1,5 ml, la care se adaugă X-VIVO™ 15 până la 1 ml (20 mg/ml). Se diluează 20 mg/ml de soluție AL cu un factor de 5 în X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl din această soluție AL de 4 mg/ml AL se transferă într-un godeu dintr-un bloc de analiză cu 96 de godeuri. Această soluție este diluată cu un factor de 2 în X-VIVO™ 15 și apoi diluată din nou cu un factor de 2 pentru a produce soluții de 2 mg/ml și 1 mg/ml. 50 µl din aceste trei soluții și martorul tratat cu vehicul (X-VIVO™ 15) se adaugă la 50 µl de suspensie celulară THP-G8 în godeurile unei plăci de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Fiecare concentrație a martorului negativ este testată în patru godeuri. Placa se agită pentru un agitator cu placă și se incubează într-un incubator cu CO_2 timp de 16 ore (37 °C, 5 % CO_2), după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de la punctul 29.

24. Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi sau negativi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor.

25. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat, de exemplu, prin acoperirea etanșă a plăcilor înainte de incubația cu substanțele chimice de testat.

26. Substanțele chimice de testat și martorul tratat cu solvent necesită efectuarea a 2-4 teste pentru obținerea unei estimări pozitive sau negative (a se vedea tabelul 2). Fiecare test independent este efectuat într-o altă zi cu soluții mamă X-VIVO™ 15 proaspete ale substanțelor chimice de testat și celule recoltate în mod independent. Celulele pot proveni din cadrul aceleiași treceri.

Măsurători de activitate ale luciferazei

27. Luminiscența este măsurată cu ajutorul unui luminometru cu o microplacă de 96 de godeuri dotat cu filtre optice, de exemplu, Phelios (ATTO, Tokyo, Japonia), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germania) și seria ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometrul trebuie calibrat pentru fiecare test pentru a se asigura reproductibilitatea (19). Pentru această calibrare sunt disponibile luciferaze recombinante de culoarea portocalie și roșie.

28. Se transferă 100 µl de reactiv preîncălzit Tripluc® Luciferase (Tripluc) prevăzut pentru test în fiecare godeu al plăcii care conține suspensia celulară tratată cu sau fără substanță chimică. Placa se agită timp de 10 minute la o temperatură ambiantă de aproximativ 20 °C. Placa se plasează în luminometru pentru măsurarea activității luciferazei. Bioluminiscența se măsoară timp de 3 secunde fiecare în absența (F0) și prezența (F1) filtrului optic. Ar trebui să se furnizeze o justificare pentru utilizarea de valori alternative, de exemplu, în funcție de modelul de luminometru utilizat.

29. Parametrii pentru fiecare concentrație sunt calculați de la valorile măsurate, de exemplu, IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, media ±SD a IL8LA, media ±SD a GAPLA, media ±SD a nIL8LA, media ±SD a Ind-IL8LA, media ±SD a Inh-GAPLA și intervalul de încredere de 95 % al Ind-IL8LA. Definițiile parametrilor utilizați în prezentul punct sunt prevăzute în apendicele 3.1 și 3.4.

30. Înainte de măsurare, diferențierea culorilor în cadrul testelor de raportare a mai multor culori este realizată, în general, cu ajutorul detectoarelor (luminometrul și cititorul plăcii) prevăzute cu filtre optice, precum filtrele de tip „sharp-cut" (cu trecere lungă sau cu trecere scurtă) sau filtrele „trece banda". Coeficienții de transmitere ai filtrelor pentru fiecare culoare a semnalului bioluminiscenței ar trebui calibrați înainte de testare, conform apendicelui 3.2.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

31. Criteriile pentru o decizie pozitivă/negativă impun ca în cadrul fiecărui test:

— o estimare a unui test IL-8 Luc să fie apreciată ca fiind pozitivă dacă o substanță chimică de testat are o valoare Ind-IL8LA ≥ 1,4 și limita inferioară a intervalului de încredere de 95 % al Ind-IL8LA ≥ 1,0

— o estimare a unui test IL-8 Luc să fie apreciată ca fiind negativă dacă o substanță chimică de testat are o valoare Ind-IL8LA < 1,4 și limita inferioară a intervalului de încredere de 95 % al Ind-IL8LA < 1,0

Model predictiv

32. Substanțele chimice de testat care generează două rezultate pozitive la testele 1, 2, 3 sau 4 sunt identificate ca fiind pozitive, iar cele care generează trei rezultate negative la testele 1, 2, 3 sau 4 sunt identificate și presupuse ca fiind negative (tabelul 2). Între presupusele substanțe chimice negative, substanțele chimice care sunt dizolvate la cantitatea de 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 sunt estimate ca fiind negative, iar substanțele chimice care nu sunt dizolvate la 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 nu ar trebui să fie luate în considerare (figura 1).

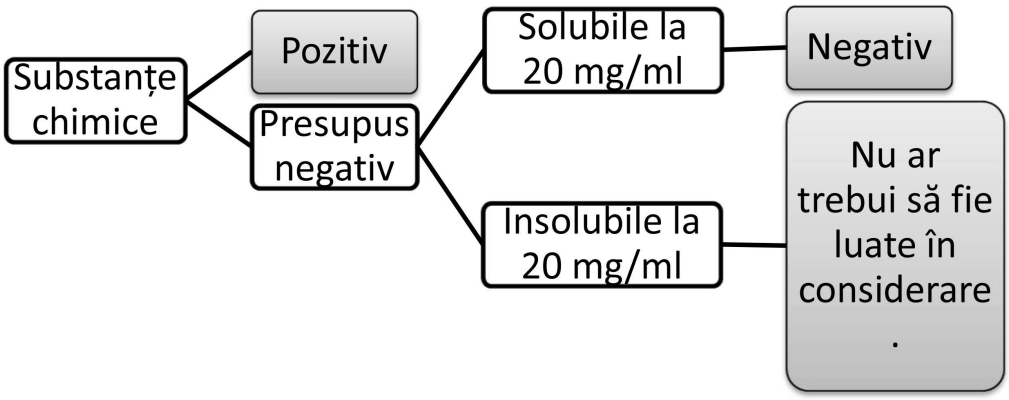
Tabelul 2

Criterii de identificare a rezultatelor pozitive și a celor presupuse drept negative

testul 1	testul 2	testul 3	testul 4	Estimare finală
Pozitiv	Pozitiv	–	–	Pozitiv
	Negativ	Pozitiv	–	Pozitiv
		Negativ	Pozitiv	Pozitiv
			Negativ	Presupus negativ
Negativ	Pozitiv	Pozitiv	–	Pozitiv
		Negativ	Pozitiv	Pozitiv
			Negativ	Presupus negativ
	Negativ	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
			Negativ	Presupus negativ
		Negativ	–	Presupus negativ

Figura 1

Model predictiv pentru estimarea finală



Criterii de acceptare

33. Atunci când se utilizează testul IL-8, ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare:

— Ind-IL8LA trebuie să fie peste 5,0 cel puțin într-o concentrație a martorului pozitiv, 4NBB, în cadrul fiecărui test.

— Ind-IL8LA ar trebui să fie sub 1,4 în orice concentrație a martorului negativ, acidul lactic, în cadrul fiecărui test.

— Datele provenind din plăcile pentru care valoarea GAPLA din godeurile cu martor cu celule și Tripluc, dar fără substanțe chimice, este mai mică decât valoarea echivalentă a de cinci ori valoarea godeului conținând doar mediul de testare (50 µl/godeu de RPMI-1640 conținând 10 % FBS și 50 µl/godeu X-VIVO™ 15) ar trebui să fie respinse.

— Datele provenind din plăcile pentru care valoarea Inh-GAPLA a tuturor concentrațiilor substanțelor chimice de testat sau martor este mai mică de 0,05 ar trebui să fie respinse. În acest caz, primul test ar trebui repetat astfel încât cea mai mare concentrație finală a testului repetat să fie cea mai scăzută concentrație finală a testului anterior.

Raportul testului

34. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de testat

Substanță monocomponentă:

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Solubilitatea în X-VIVO™ 15. În cazul substanțelor chimice insolubile în X-VIVO™ 15, dacă este respectată precipitarea sau flotația după centrifugare;

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat dacă nu a fost utilizat X VIVO™ 15.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec:

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— Aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Solubilitatea în X-VIVO^{TM} 15. În cazul substanțelor chimice insolubile în X-VIVO^{TM} 15, dacă este respectată precipitarea sau flotația după centrifugare;

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat dacă nu a fost utilizat X VIVO^{TM} 15.

Martori

Martor pozitiv:

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există și dacă este cazul;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare, dacă este cazul.

Martor negativ:

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) CAS și/sau alți identificatori;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori negativi decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— descrierea testului utilizat;

— linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la a fost obținută aceasta);

— numărul lotului și originea FBS, denumirea furnizorului, numărul lotului de pe placa de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră și numărul lotului reactivului Tripluc;

— numărul de trecere și densitatea celulară utilizate pentru testare;

— metoda utilizată pentru numărarea celulelor pentru însămânțare înainte de testare și măsurile luate pentru a asigura distribuția omogenă a numărului de celule;

— luminometrul utilizat (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele aparatului, substratul de luciferază utilizat, precum și demonstrarea măsurătorilor corespunzătoare ale luminiscenței pe baza testului de control descris la apendicele 3.2;

— procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea testului (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp.

Procedura de testare

— numărul de replici și teste efectuate;

— concentrațiile substanței chimice de testat, procedura de aplicare și timpul de expunere utilizate (în cazul în care acestea diferă de cele recomandate);

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— măsurătorile IL8LA și GAPLA;

— calculele pentru nIL8LA, Ind-IL8LA și Inh-GAPLA;

— intervalul de încredere de 95 % al Ind-IL8LA;

— un grafic care descrie curbele de răspuns în funcție de doză pentru inducția activității luciferazei și viabilitate;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul testului IL-8 Luc;

— Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K și Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H și 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 și Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N și Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A și 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 și Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OCDE (2016). Testul nr. 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 și Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ și 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 și Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OCDE (2017). Urmează a se publica - 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. OCDE, Paris, Franța

(16) OCDE (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. OCDE, Paris, Franța.

(17) OCDE (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. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Publicație disponibilă la adresa: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR și Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OCDE (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. OCDE, Paris, Franța.

(21) Organizația Națiunilor Unite (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A șasea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Material disponibil la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Apendicele 3.1

DEFINIțII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (16).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): o serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (20).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV05: Viabilitatea celulară 05, și anume concentrația minimă la care substanțele chimice prezintă o valoare Inh-GAPLA mai mică de 0,05.

FInSLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la Ind-IL8LA. Pentru definiție, a se vedea Ind-IL8LA.

GAPLA: Activitatea luciferazei Stable Luciferase Red (SLR) (λ max = 630 nm), reglementată de promotorul GAPDH, care demonstrează viabilitatea celulară și numărul de celule viabile.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (Strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

II-SLR-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la Inh-GAPLA. Pentru definiție, a se vedea Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukin-8): O citokină derivată din celulele endoteliale, fibroblaste, cheratinocite, macrofage și monocite care cauzează chemotaxia neutrofilelor și a și a limfocitelor T.

IL8LA: Activitate luciferazei Stable Luciferase Orange (SLO) (λmax = 580 nm), reglementată de promotorul IL-8.

Ind-IL8LA: Inducția în multipli a nIL8LA. Se obține prin împărțirea valorii nIL8LA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice la valoarea celulelor THP-G8 nestimulate și reprezintă inducția activității promotorului IL-8 prin intermediul substanțelor chimice.

Inh-GAPLA: Inhibarea GAPLA. Se obține prin împărțirea valorii GAPLA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice la valoarea celulelor THP-G8 netratate și reprezintă citotoxicitatea substanțelor chimice.

Prag minim de inducție (PMI): concentrația cea mai scăzută la care o substanță chimică îndeplinește criteriile pozitive

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care există mai multe componente principale într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

nIL8LA: Activitatea luciferazei SLO care reflectă activitatea promotorului IL-8 (IL8LA), normalizată prin activitatea luciferazei SLR care reflectă activitatea promotorului GAPDH (GAPLA). Aceasta reprezintă o activitate a promotorului IL-8 după analizarea viabilității celulare sau a numărului de celule.

nSLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la nIL8LA. Pentru definiție, a se vedea nIL8LA.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Prehaptene: Substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice.

Prohaptene: Substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (16).

Fiabilitate: Măsuri ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (16).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (16).

SLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la IL8LA. Pentru definiție, a se vedea IL8LA.

SLR-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la GAPLA. Pentru definiție, a se vedea GAPLA.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (16).

Substanță: Un element chimic și compușii acestuia în stare naturală sau obținut prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia.

Surfactant: Numit și agent tensioactiv, aceasta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate să reducă tensiunea la suprafață a unui lichid și, astfel, să îi permită acesteia spumarea sau penetrarea solidelor; este cunoscut, de asemenea, ca agent de umectare. (TG437)

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestei metode.

THP-G8: O linie celulară raportoare IL-8 utilizată în cadrul testului IL-8 Luc. Linia celulară THP-1 similară macrofagului uman a fost transfectată în genele pentru luciferază SLO și SLR sub controlul promotorilor IL-8 și, respectiv, GAPDH.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care se referă la elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (21).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Metodă de testare valabilă: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit.

Apendicele 3.2

PRINCIPIUL MĂSURĂRII ACTIVITĂȚII LUCIFERAZEI ȘI AL DETERMINĂRII COEFICIENȚILOR DE TRANSMISIE AI FILTRULUI OPTIC PENTRU SLO ȘI SLR

Se poate utiliza MultiReporter Assay System - Tripluc - cu un luminometru de tip microplacă prevăzut cu un sistem de detectare a mai multor culori, care poate fi montat la un filtru optic [de exemplu, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Filtrul optic utilizat pentru măsurare este un filtru de 600-620 nm cu trecere lungă sau scurtă, sau un filtru de 600-700 nm de tip band pass.

Măsurarea luciferazelor în două culori cu un filtru optic.

Acesta este un exemplu folosind filtrul Phelios AB-2350 (ATTO). Acest luminometru este prevăzut cu un filtru de 600 nm cu trecere lungă (R60 HOYA Co., de 600 nm LP, filtrul nr. 1) pentru scindarea luminiscenței SLO (λmax = 580 nm) și SLR (λmax = 630 nm).

Pentru a determina coeficienții de transmitere ai filtrului LP de 600 nm, folosind enzime purificate pentru luciferază SLO și SLR, măsurați mai întâi i) intensitatea bioluminiscenței SLO și SLR fără filtru (F0) și ii) intensitatea bioluminiscenței SLO și SLR care a trecut prin filtrul LP de 600 nm (filtrul 1) și iii) calculați coeficienții de transmitere ai filtrului LP de 600 nm pentru SLO și SLR care sunt menționați în continuare.

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

Atunci când intensitatea SLO și SLR în eșantion este definită ca O și, respectiv, R, i) intensitatea luminii fără filtru (complet optic) F0 și ii) intensitatea luminii care transmite prin filtrul LP de 600 nm (filtrul 1) F1 sunt descrise mai jos.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Aceste formule ar putea fi reformulate, după cum urmează:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Apoi, folosind factorii de transmitanță calculați (κO_{R60} și κR_{R60}) și având valorile F0 și F1 măsurate, puteți calcula valoarea O și R, după cum urmează:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiale și metode pentru determinarea factorului de transmitanță

(1) Reactivi

Enzime simple purificate luciferaze:

Enzima SLO purificată liofilizată

Enzima SLR purificată liofilizată

(care, pentru activitatea de validare, au fost obținute de la laboratorul LMP Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia cu linia celulară THP-G8)

Reactiv pentru testare:

Reactivul pentru testare Tripluc® Luciferase (spre exemplu, de la TOYOBO Cat#MRA-301)

Mediu: pentru testul luciferazei (30 ml, stocat la 2-8 °C)

Concentr.	reactivului	Concentrație finală în mediu	Cantitate necesară
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

(2) Prepararea soluției enzimatice

Se dizolvă o enzimă luciferază purificată lipofilizată în eprubetă, adăugând 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl sau Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), se completează cu glicerol în proporție de 10 % (g/v), se împarte soluția enzimei în alicote de 10 µl în eprubete de unică folosință de 1,5 ml și se depozitează într-un congelator la -80 °C. Soluția enzimatică înghețată poate fi utilizată timp de maxim șase luni. La utilizare, se adaugă 1 ml de mediu pentru testul luciferazei (RPMI-1640 cu 10 % FBS) în fiecare eprubetă care conține soluțiile enzimatice (soluție enzimatică diluată) și se păstrează pe gheață pentru a preveni dezactivarea.

(3) Măsurarea bioluminiscenței

Reactivul pentru testare Tripluc® Luciferase (Tripluc) se decongelează și se păstrează la temperatura camerei, fie într-o baie de apă, fie la temperatura ambiantă. Se activează luminometrul cu 30 de minute înainte de începerea măsurătorii pentru a permite stabilizarea fotomultiplicatorului. Se transferă 100 µl de soluție enzimatică diluată pe o placă cu 96 de godeuri de culoare neagră (cu fund plat) (eșantion de referință SLO pentru #B1, #B2 și #B3 și eșantionul de referință SLR pentru #D1, #D2, #D3). Se transferă apoi 100 µl de Tripluc preîncălzit în fiecare godeu al plăcii care conține soluția enzimatică diluată, folosind o pipetă. Se agită placa timp de 10 minute la temperatura camerei (aproximativ 25 °C) folosind un agitator pentru placă. Dacă apar bule în soluțiile din godeuri acestea sunt eliminate. Se așază placa în luminometru pentru a măsura activitatea luciferazei. Bioluminiscența se măsoară timp de 3 secunde fiecare în absența (F0) și prezența (F1) filtrului optic.

Coeficientul de transmisie al filtrului optic a fost calculat după cum urmează:

Coeficientul de transmisie [SLO (κO_{R60})] = (#B1 al F1+ #B2 al F1+ #B3 al F1) / (#B1 al F0+ #B2 al F0+ #B3 al F0)

Coeficientul de transmisie [SLR (κR_{R60})] = (#D1 al F1+ #D2 al F1+ #D3 al F1) / (#D1 al F0+ #D2 al F0+ #D3 al F0)

Factorii de transmitanță calculați se utilizează pentru toate măsurătorile efectuate folosind același luminometru.

Controlul calității echipamentului

Ar trebui să fie utilizate procedurile descrise în protocolul IL-8 Luc (18).

Apendicele 3.3

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea estimării în urma testului IL-8 Luc pentru cele nouă substanțe recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin opt dintre cele nouă substanțe de verificare (selectate pentru a reprezenta intervalul de răspunsuri pentru pericolele de sensibilizare cutanată). Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu testul IL-8 Luc. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru testul IL-8 Luc (6) (1).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru demonstrarea performanțelor tehnice cu testul IL-8 Luc

Substanțe de verificare	Nr. CAS	Stare	Solubilitate în X-VIVO15 la 20 mg/ml	Estimarea *in vivo* (1)	Estimarea IL-8 Luc (2)	Interval de referință (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	**IL-8 Luc MIT** (5)
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solid	Insolubil	Sensibilizant (Extrem)	Pozitiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehidă	50-00-0	Lichid	Solubil	Sensibilizant (Puternic)	Pozitiv	9-30	4-9
2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Insolubil	Sensibilizant (Moderat)	Pozitiv	250-290	60-250
Etilendiamină	107-15-3	Lichid	Solubil	Sensibilizant (Moderat)	Pozitiv	500-700	0,1-0,4
Etilen glicol dimetacrilat	97-90-5	Lichid	Insolubil	Sensibilizant (Slab)	Pozitiv	>2000	0,04-0,1
4-alilanisol (Estragol)	140-67-0	Lichid	Insolubil	Sensibilizant (Slab)	Pozitiv	>2000	0,01-0,07
Streptomicină sulfat	3810-74-0	Solid	Solubil	Non-sensibilizant	Negativ	>2000	>2000
Glicerină	56-81-5	Lichid	Solubil	Non-sensibilizant	Negativ	>2000	>2000
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Solubil	Non-sensibilizant	Negativ	>2000	>2000

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service
(1) Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (19).
(2) Pe baza valorilor anterioare observate (1) (6).
(3) Valorile CV_{05} și IL-8 Luc MIT au fost calculate folosind solubilitatea în apă dată de EPI Suite™.
(4) CV_{05}: concentrația minimă la care substanțele chimice prezintă o valoare Inh-GAPLA mai mică de 0,05.
(5) MIT: concentrațiile cele mai scăzute la care o substanță chimică îndeplinește criteriile pozitive.

Apendicele 3.4

INDICI ȘI CRITERII DE APRECIERE

nIL8LA (nSLO-LA)

Repetarea j-th (j = 1-4) a concentrației i-th (i = 0-11) se măsoară pentru IL8LA (SLO-LA) și, respectiv, GAPLA (SLR-LA). Valoarea IL8LA normalizată, denumită nIL8LA (nSLO-LA) și definită ca:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Aceasta este unitatea de măsură de bază în cadrul acestui test.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Creșterea în multipli a mediei nIL8LA (nSLO-LA) pentru repetiția la concentrația i-th, în comparație cu aceasta la concentrația 0, Ind-IL8LA, reprezintă principala măsură a acestui test. Acest coeficient este scris prin următoarea formulă:

$$Ind - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Laboratorul principal a propus ca o valoare de 1,4 să corespundă unui rezultat pozitiv pentru substanța chimică testată. Această valoare este bazată pe examinarea datelor istorice ale laboratorului principal. Echipa de gestionare a datelor a utilizat apoi această valoare în toate etapele studiului de validare. Rezultatul principal, Ind-IL8LA, constituie raportul dintre două medii aritmetice, astfel cum se arată în ecuație.

Interval de încredere de 95 % (CI 95 %)

Intervalul de încredere de 95 % (CI 95 %), care este bazat pe coeficient, poate fi estimat pentru a indica precizia măsurării acestui rezultat principal. Limita inferioară a CI de 95 % ≥ 1 indică faptul că valoarea nIL8LA cu o concentrație i-th este semnificativ mai mare decât cea cu martor tratat cu solvent. Există mai multe modalități de a construi CI de 95 %. În acest studiu am utilizat metoda cunoscută drept teorema lui Fieller. Această teoremă privind intervalul de încredere de 95 % este obținută din următoarea formulă:

$$[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}],$$

Unde .

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$is 97.5 percentile din distribuția t centrală cu ν grade de libertate, unde

$$\nu = (\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/\{(\frac{sd_0^2}{n_0})^2/(n_0 - 1) + (\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/(n_{yi} - 1)\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Valoarea Inh-GAPLA reprezintă un coeficient al mediei GAPLA (SLR-LA) pentru repetarea concentrației i-th în comparație cu cea cu martor tratat cu solvent, iar aceasta este scrisă prin

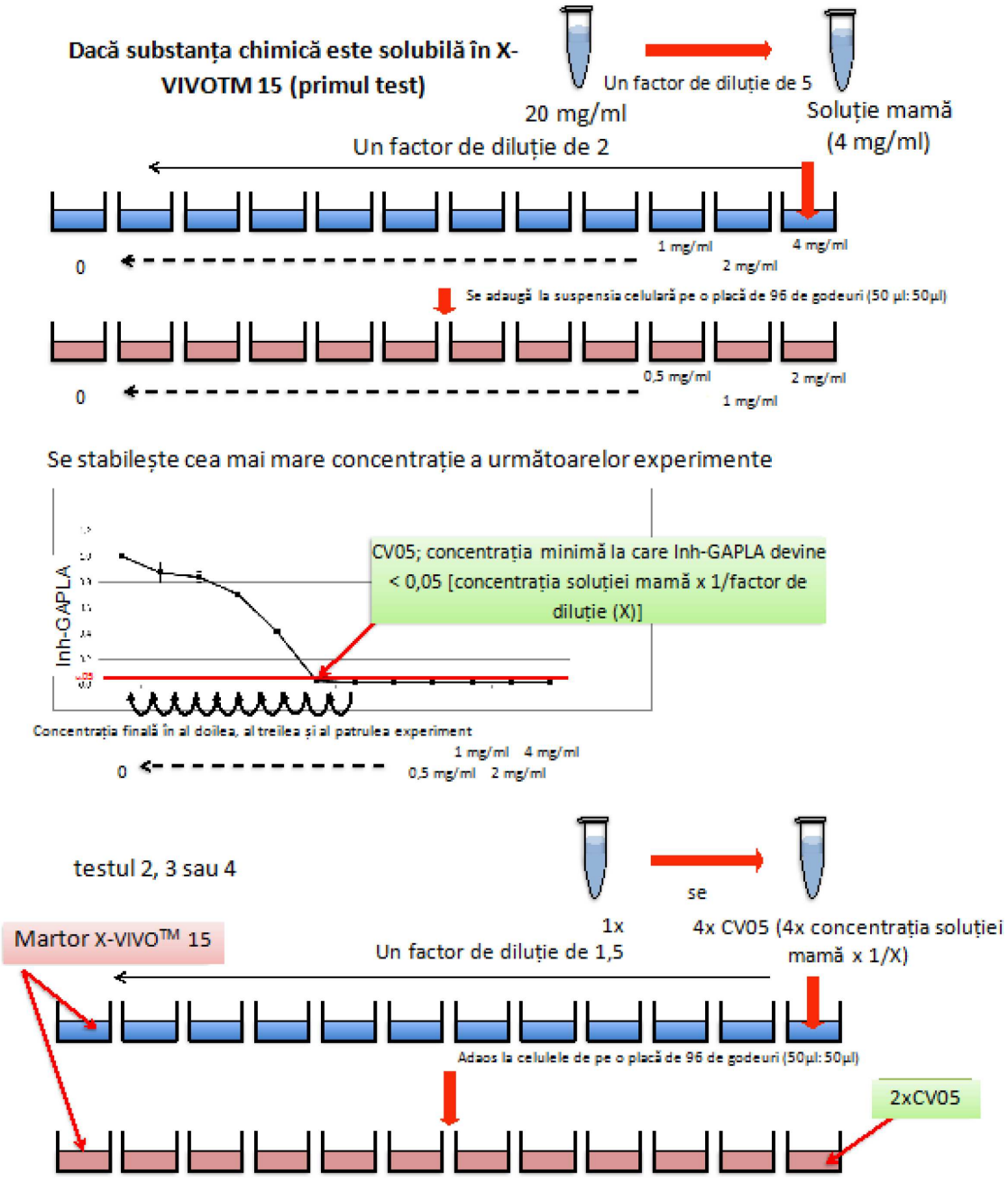
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Întrucât valoarea GAPLA este numitorul nIL8LA, o valoare extrem de mică determină o variație mare a valorii nIL8LA. Prin urmare, valorile Ind-IL8LA având o valoare extrem de mică a Inh-GAPLA (sub 0,05) ar putea fi considerate a reprezenta un nivel scăzut de precizie.

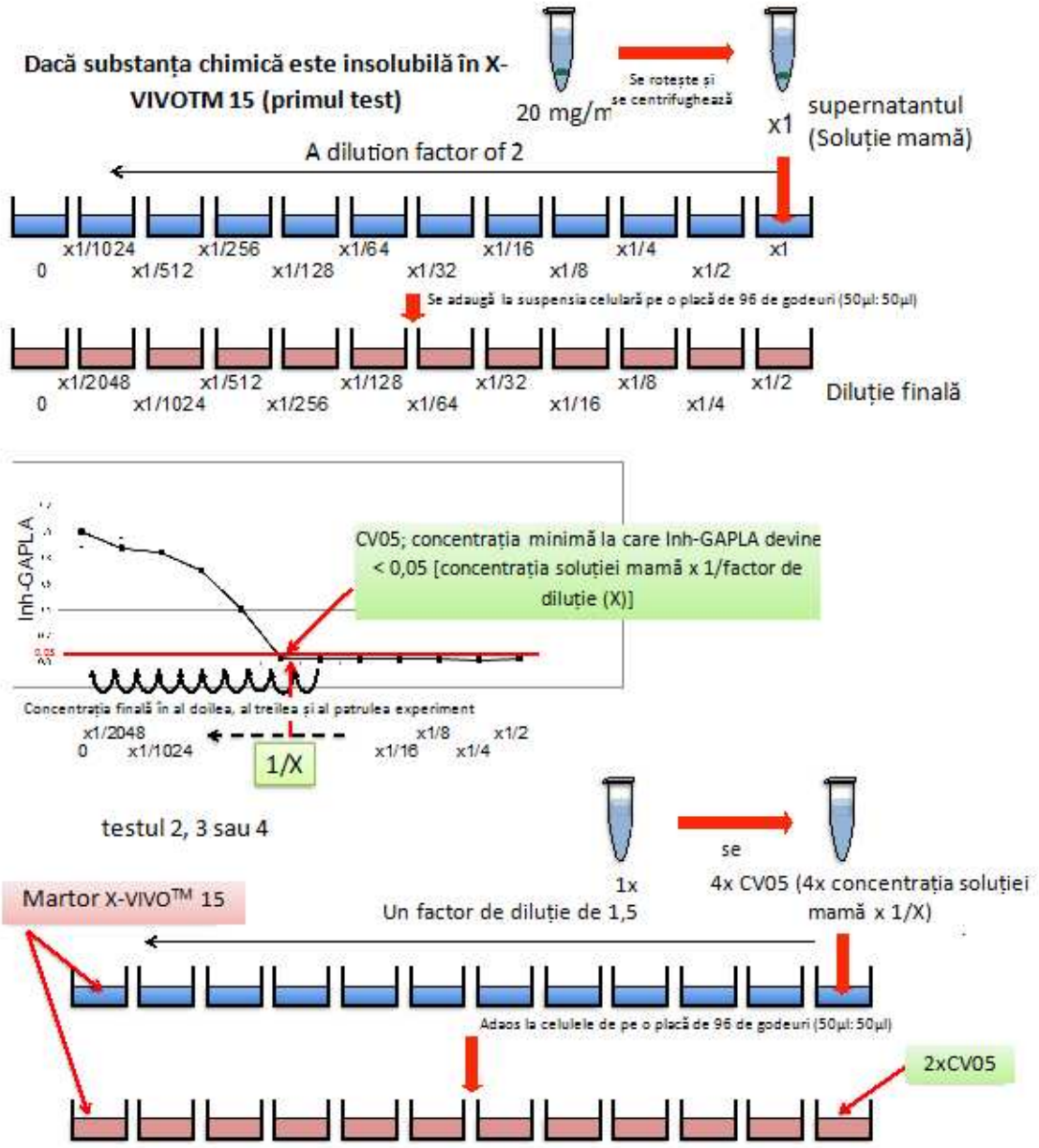
Apendicele 3.5

SCHEMA METODELOR DE DIZOLVARE A SUBSTANȚELOR CHIMICE PENTRU TESTUL IL-8 LUC.

(a) Pentru substanțele chimice dizolvate în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml

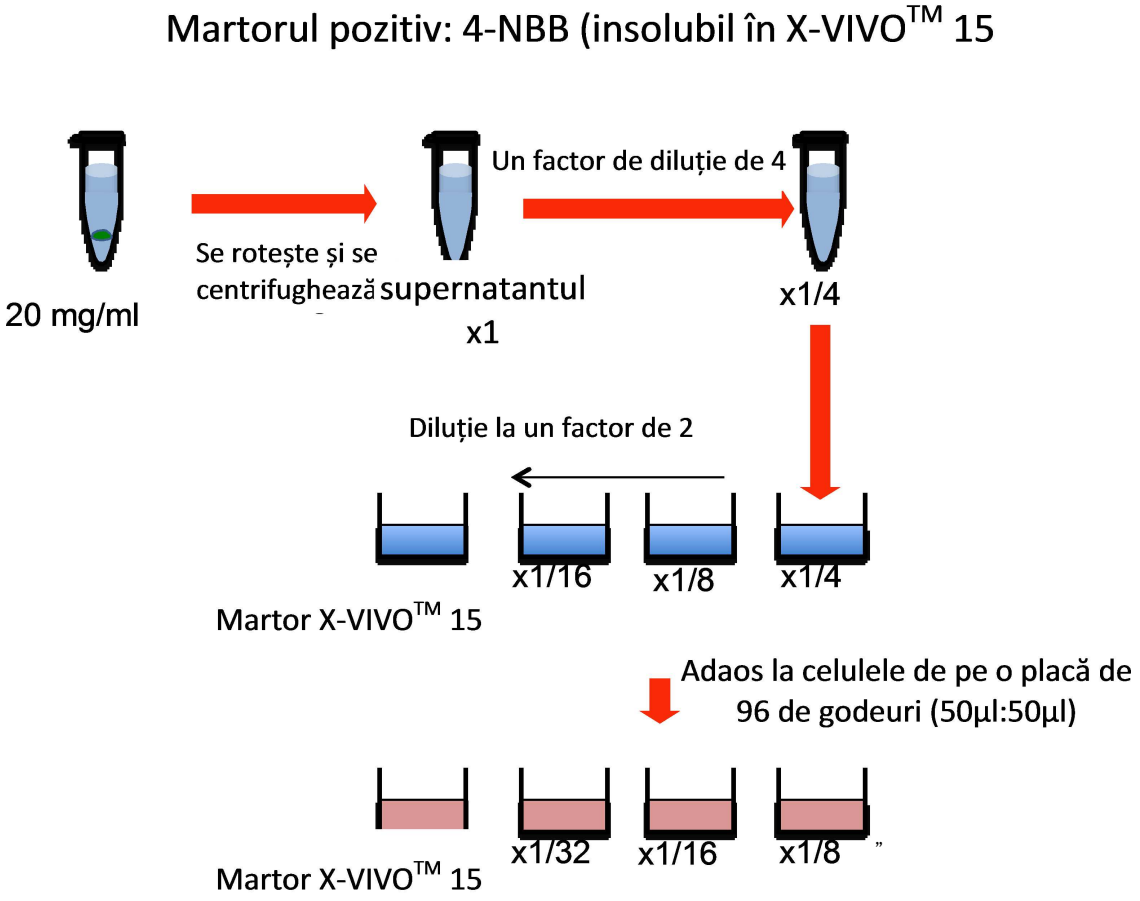


(b) Pentru substanțele chimice insolubile în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml



Apendicele 3.6

SCHEMA METODEI DE DIZOLVARE A 4-NBB PENTRU MARTORUL POZITIV AL TESTULUI IL-8 LUC.



(9) În partea C, se adaugă următoarele capitole:

„C.52 **STUDIU EXTINS ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA UNEI GENERAȚII PENTRU SPECIA MEDAKA (MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST -MEOGRT)**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 240 (2015). Studiul extins asupra reproducerii pe durata unei generații pentru specia medaka (MEOGRT) descrie o metodă de testare cuprinzătoare bazată pe expunerea de pești, de-a lungul mai multor generații, pentru a furniza date relevante pentru evaluarea riscurilor ecologice și a riscurilor legate de substanțele chimice, inclusiv substanțe chimice suspectate de a provoca tulburări ale sistemului endocrin (EDC). Expunerea în testul MEOGRT continuă până la ecloziune (timp de două săptămâni după fertilizare, sdf) în cea de a doua generație (F2). Ar fi necesare investigații suplimentare pentru a justifica utilitatea extinderii generației F2 dincolo de momentul ecloziunii; în acest moment, nu există suficiente informații pentru a asigura condițiile sau criteriile relevante care să garanteze extinderea generației F2. Însă această metodă de testare poate fi actualizată pe măsură ce sunt luate în considerare informații și date noi. De exemplu, orientările privind extinderea generației F2 prin reproducere pot fi utile în anumite circumstanțe (de exemplu substanțele chimice cu potențial ridicat de bioconcentrare sau cu indicații privind efecte transgeneraționale la alți taxoni). Această metodă de testare poate fi utilizată pentru a evalua efectele cronice potențiale ale substanțelor chimice, inclusiv ale substanțelor chimice care pot provoca tulburări ale sistemului endocrin, asupra peștilor. Metoda pune accent, în principal, pe efectele potențiale relevante asupra populației (și anume, efecte adverse asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) pentru calcularea unei concentrații fără efect observat (CFEO) sau a unei concentrații efective (CEx), deși ar trebui remarcat faptul că abordările CEx sunt rareori adecvate pentru studii ample de acest tip, unde este posibil să nu fie practică o creștere a numărului de concentrații de testare pentru a permite determinarea CEx dorite, ceea ce poate cauza, de asemenea, probleme semnificative de bunăstare a animalelor din cauza numărului mare de animale utilizate. Pentru substanțele chimice care nu necesită o evaluare de-a lungul „mai multor generații" sau substanțele chimice care nu sunt substanțe chimice care pot provoca tulburări ale sistemului endocrin, ar putea fi mai adecvate alte metode de testare (1). Specia japoneză medaka este specia potrivită pentru a fi utilizată în cadrul acestei metode de testare, având în vedere ciclul de viață scurt al acesteia și posibilitatea de a-i determina sexul genetic (2), aceasta fiind considerată a fi o componentă esențială în cadrul acestei metode de testare. Metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă sunt aplicabile numai pentru specia japoneză medaka. Alte specii de pești mici (de exemplu, peștele-zebră) pot fi adaptate la un protocol de testare similar.

2. Această metodă de testare măsoară mai multe puncte finale biologice. Se acordă o importanță deosebită efectelor negative potențiale asupra parametrilor relevanți pentru populație, inclusiv supraviețuirea, dezvoltarea brută, creșterea și reproducerea. În al doilea rând, pentru a furniza informații mecaniciste și pentru a asigura o legătură între rezultatele altor tipuri de studii în teren și în laborator, în cazul în care există dovezi *a posteriori* pentru o substanță chimică care declanșează o activitate potențial provocatoare de tulburări ale sistemului endocrin (*de exemplu*, o activitate androgenică sau estrogenică în cadrul altor teste și analize), se obțin alte informații utile prin măsurarea valorii mRNA a *vitelogeninei* (*vtg)* (sau a proteinei vitelogenina, VTG), a caracteristicilor sexuale secundare fenotipice (SSC) aferente sexului genetic, precum și evaluarea histopatologiei. Ar trebui remarcat faptul că, în cazul în care o substanță chimică de testat sau metaboliții săi nu sunt suspectați de a fi EDC, este posibil să nu fie necesară măsurarea acestor puncte finale secundare și ar putea fi adecvate mai puține studii cu utilizare intensivă a resurselor și animalelor (1). Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

3. Din cauza numărului limitat de substanțe chimice testate și al laboratoarelor implicate în procesul de validare a acestui test destul de complex, se prevede că, atunci când un număr suficient de studii sunt disponibile pentru a confirma impactul acestui nou model de studiu, metoda de testare va fi analizată și, dacă este necesar, va fi revizuită în contextul experienței dobândite. Datele pot fi utilizate la nivelul 5 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (3). Metoda de testare începe prin expunerea peștilor adulți (generația F0) la substanța chimică de testat în faza de reproducere. Expunerea continuă în etapa de dezvoltare și reproducere la generația F1 și de eclozare la generația F2; astfel, testul permite evaluarea atât a parcursului endocrin structural, cât și a celui activațional. O abordare bazată pe forța probantă a datelor poate fi aplicată atunci când se interpretează punctele finale aferente sistemului endocrin.

4. Testul ar trebui să includă un număr adecvat de persoane pentru a asigura o putere suficientă de evaluare a punctelor finale relevante ale reproducerii (a se vedea apendicele 3), asigurându-se în același timp faptul că numărul de animale utilizate constituie minimul necesar din motive de bunăstare a animalelor. Având în vedere numărul mare de animale utilizate pentru testare, este important să se analizeze cu atenție necesitatea efectuării testului în raport cu datele existente care ar putea conține deja informații relevante privind multe dintre punctele finale din MEOGRT. În acest sens, se poate obține asistență în contextul Cadrului OCDE privind testele de toxicitate la pești (1).

5. Metoda de testare a fost concepută în principal pentru a distinge efectele unei singure substanțe. Însă, dacă se impune efectuarea unui test asupra unui amestec, ar trebui luat în considerare dacă acesta va oferi rezultate acceptabile pentru scopul de reglementare prevăzut.

6. Înainte de începerea testului, este important să existe informații cu privire la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat, în special pentru a permite adoptarea de soluții chimice stabile. De asemenea, este necesar să existe o metodă analitică suficient de sensibilă pentru verificarea concentrațiilor substanțelor chimice de testat.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Testul începe prin expunerea masculilor și femelelor mature din punct de vedere sexual (cel puțin 12 sdf) în perechi de reproducere, timp de 3 săptămâni, iar în această perioadă substanța chimică de testat este distribuită în organismul generației parentale (F0) conform comportamentului său toxicocinetic. Cât mai aproape posibil de prima zi a celei de a patra săptămâni, se colectează ouă pentru a începe generația F1. În perioada de creștere a generației F1 (în total 15 săptămâni), se analizează capacitatea de eclozare și supraviețuirea. În plus, peștii sunt incluși în eșantion la 9-10 sdf pentru punctele finale de dezvoltare și se analizează perioada de depunere a icrelor timp de trei săptămâni, de la 12 la 14 sdf. O generație F2 începe după a treia săptămână de la evaluarea reproducerii, aceasta fiind crescută până la încheierea procesului de ecloziune.

CRITERIILE DE VALIDITATE A TESTULUI

8. Se aplică următoarele criterii de valabilitate a testului:

— concentrația oxigenului dizolvat ar trebui să fie, pe parcursul testării, ≥ 60 % din valoarea saturației aerului;

— Temperatura medie a apei pe întreaga durată a studiului ar trebui să fie cuprinsă între 24 °C și 26 °C. Abaterile scurte de la medie în acvarii individuale nu ar trebui să fie mai mari de 2 °C;

— Fecunditatea medie a martorilor în fiecare dintre generații (F0 și F1) ar trebui să fie mai mare de 20 de ouă per pereche pe zi. Fertilitatea tuturor ouălor produse în timpul analizei ar trebui să fie mai mare de 80 %. În plus, 16 dintre cele 24 de perechi de reproducere martor recomandate (> 65 %) ar trebui să producă mai mult de 20 de ouă pe pereche pe zi;

— capacitatea de eclozare la martori ar trebui să fie ≥ 80 % (medie) (pentru fiecare dintre generațiile F1 și F2);

— rata de supraviețuire după eclozare, până la 3 sdf și după 3 sdf, până în etapa finală pentru generația F1 (și anume, 15 sdf) ar trebui să fie ≥ 80 % (medie) și, respectiv, ≥ 90 % (medie), la martori (F1);

— trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate.

În ceea ce privește temperatura apei, deși nu este un criteriu de validitate, duplicatele în cadrul unui tratament nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic, iar grupurile de tratament din cadrul testului nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic (pe baza măsurătorilor de temperatură zilnice și excluzând abaterile de scurtă durată).

9. Deși se poate observa o scădere a reproducerii la grupurile cu expunere mai mare, ar trebui să existe reproducere suficientă în cel puțin al treilea cel mai mare grup și în toate grupurile mai mici de F0 pentru a umple incubatoarele de eclozare. În plus, ar trebui să existe o rată adecvată de supraviețuire a embrionilor în al treilea cel mai mare grup de expunere și în grupurile mai mici de expunere din F1 pentru a permite evaluarea punctelor finale la eșantionarea subadulților (a se vedea punctele 36 și 38 și apendicele 9). În plus, ar trebui să existe cel puțin un nivel minim de supraviețuire după eclozare (~ 20 %) în cel de al doilea cel mai mare grup de expunere din F1. Acestea nu sunt criterii de validitate, ca atare, ci recomandări pentru a permite calcularea valorilor CFEO sigure.

10. Dacă se observă o abatere de la criteriile de validitate a testului, consecințele ar trebui să fie luate în considerare în raport cu fiabilitatea rezultatelor testului, iar aceste abateri și considerații ar trebui să fie incluse în raportul testului.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

11. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:

(a) aparat de măsurare a oxigenului și pH-metru;

(b) echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;

(c) aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu monitorizare continuă;

(d) rezervoare din material chimic inert și de capacitate adaptată la valorile recomandate de încărcare și densitate a populației (a se vedea apendicele 3);

(e) balanță cu precizie adecvată (mai exact, precizie de ± 0,5 mg).

Apă

12. Orice tip de apă în care specia de testat supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată în mod corespunzător poate fi utilizată ca apă în scopul testării. Apa ar trebui să prezinte o calitate constantă pe durata testului. Pentru a obține certitudinea că apa de diluție nu influențează în mod necorespunzător rezultatele testelor (de exemplu, prin complexare cu substanța chimică de testat) sau nu afectează negativ comportamentul peștilor reproducători, ar trebui prelevate periodic probe pentru analiză. În cazul în care se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, ar trebui să se măsoare, de exemplu la șase luni, conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), pesticide, carbon organic total și materii solide în suspensie. Unele caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 2. pH-ul apei ar trebui să fie cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui anumit test, acesta ar trebui să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități.

Sistemul de expunere

13. Nu se specifică modelul și materialele utilizate pentru sistemul de expunere. Pentru construirea sistemului de testare ar trebui să se utilizeze sticlă, oțel inoxidabil sau alt material inert din punct de vedere chimic care nu a fost contaminat în cadrul testelor anterioare. În scopurile acestui test, un sistem de expunere adecvat poate fi compus dintrun sistem cu flux continuu (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Soluții de testat

14. Soluția mamă a substanței chimice de testat ar trebui să fie introdusă în sistemul de expunere printr-o pompă corespunzătoare. Debitul soluției mamă ar trebui să fie calibrat în conformitate cu confirmarea analitică a soluțiilor de testat înainte de începerea expunerii și verificat din punct de vedere volumetric în mod regulat, pe durata testului. Soluția de testat din fiecare cameră este reînnoită în mod corespunzător (de exemplu, minimum cinci reînnoiri de volum/zi până la 16 reînnoire/zi sau un debit de maxim 20 ml/min flux), în funcție de stabilitatea substanței chimice de testat și de calitatea apei.

15. Soluțiile de testat din concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții mamă. Soluțiile mamă ar trebui să se prepare, de preferință, pur și simplu prin amestecarea sau agitarea substanței chimice de testat în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, agitare și/sau ultrasonificare). Pentru obținerea unei soluții mamă cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane/sisteme de saturare sau metode de dozare pasivă (14). Ar trebui să se depună toate eforturile pentru evitarea solvenților sau a purtătorilor deoarece: (1) anumiți solvenți pot avea ca rezultat toxicitatea și/sau răspunsuri nedorite sau neașteptate, (2) testarea substanțelor chimice peste solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent prin utilizarea solvenților) poate duce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective, (3) utilizarea solvenților în teste pe termen mai lung poate conduce la un grad semnificativ de „biofilmare" asociat cu activitatea microbiană, ceea ce ar putea avea un impact asupra condițiilor de mediu și a capacității de a menține concentrațiile de expunere și (4) în absența unor date istorice care să demonstreze că solventul nu influențează rezultatul studiului, utilizarea solvenților necesită un tratament al martorului tratat cu solvent care are implicații asupra bunăstării animalelor, întrucât sunt necesare animale suplimentare pentru efectuarea testului. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, ar putea fi utilizat un solvent, în ultimă instanță, și ar trebui consultat documentul de orientare nr. 23 al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (15) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice de testat și de disponibilitatea datelor istorice privind utilizarea solventului. În cazul în care se utilizează solvenți purtători, ar trebui să se evalueze martori solvenți adecvați, în plus față de martorii non-solvenți (negativi) (doar apa de diluție). În cazul în care utilizarea unui solvent este inevitabilă și se produce activitatea microbiană (bio-filmare), se recomandă înregistrarea/raportarea bio-filmării pe rezervor (cel puțin săptămânal) pe durata testului. În mod ideal, concentrația solventului ar trebui să fie menținută constantă în martorul solvent și în toate tratamentele pentru testare. În cazul în care concentrația solventului nu este menținută constantă, în martorul solvent ar trebui utilizată cea mai mare concentrație în cadrul tratamentului pentru testare. În cazurile în care se utilizează solvent purtător, concentrațiile maxime ale solvenților nu ar trebui să depășească 100 µl/l sau 100 mg/l (15) și se recomandă să se mențină concentrația solventului la un nivel cât mai scăzut posibil (*de exemplu*, < 20 µl/l) pentru a se evita efectul potențial al solventului asupra punctelor finale măsurate (16).

Animalele de testare

Selectarea și păstrarea peștelui

16. Specia testată este medaka japoneză *Oryzias latipes*, datorită ciclului său de viață scurt și posibilității de determinare a sexului genetic. Deși alte specii de pești mici pot fi adaptate la un protocol de testare similar, metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă de testare sunt aplicabile numai pentru medaka japoneză (a se vedea punctul 1). Medaka este indusă cu ușurință pentru a se înmulți în captivitate; există metode publicate pentru cultura sa (17) (18) (19), precum și date din cadrul testelor referitoare la mortalitatea pe termen scurt, la primele stadii de viață și întregul ciclu de viață (5) (6) (8) (9) (20). Toți peștii sunt expuși la lumină timp de 16 ore și 8 ore la întuneric. Peștii vor fi hrăniți cu creveți în saramură vii, specia *Artemia* spp., larve nauplius care pot fi suplimentate cu hrană sub formă de fulgi din comerț, dacă este necesar. Hrana sub formă de fulgi din comerț ar trebui analizată în mod regulat pentru identificarea contaminanților.

17. Atâta timp cât se respectă practici de creștere adecvate, nu este necesar niciun protocol specific de cultură. De exemplu, peștii medaka pot fi crescuți în bazine de 2 l cu 240 pești larvari pentru fiecare bazin până la 4 sdf, apoi aceștia pot fi crescuți în bazine de 2 l cu 10 pești per bazin până la 8 sdf, după care sunt transferați în perechi de reproducție în bazine de 2 l.

Aclimatarea și selecția peștilor

18. Peștii pentru testare ar trebui să fie selectați dintr-un singur stoc de laborator care a fost aclimatat timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de iluminare similare celor utilizate în cadrul testului (Notă: Această perioadă de aclimatare nu este o perioadă de expunere prealabilă *in situ*). Se recomandă să se obțină pești pentru testare dintr-o cultură internă, deoarece transportul peștilor adulți este stresant și poate afecta reproducerea fiabilă. Peștii ar trebui hrăniți cu creveți în saramură vii, larve nauplius, de două ori pe zi în perioada de deținere și în faza de expunere, hrana fiind suplimentată de un tip de hrană sub formă de fulgi disponibilă în comerț, dacă este necesar. Pentru a iniția acest test și a asigura o replicare adecvată, se consideră că sunt necesare minim 42 de perechi de reproducție (54 de perechi de reproducție în cazul în care este necesar un martor solvent din cauza lipsei unor date istorice care să susțină utilizarea exclusivă a martorului non-solvent). În plus, fiecare pereche de reproducție din generația F0 ar trebui să fie verificată pentru a fi XX-XY (și anume, o relație complementară normală de cromozomi sexuali la fiecare sex) pentru a evita o posibilă includere a masculilor spontani XX (a se vedea punctul 39).

19. În faza de aclimatare, ar trebui să se înregistreze mortalitatea la peștii de cultură și să se aplice următoarele criterii după o perioadă de instalare de 48 de ore:

— Mortalitatea mai mare de 10 % la populația de cultură în perioada de șapte zile dinaintea transferului în sistemul de testare: se respinge întregul lot;

— Mortalitatea între 5 % și 10 % la populația de cultură în perioada de șapte zile dinaintea transferului în sistemul de testare: se asigură aclimatarea pentru șapte zile în plus față de perioada de aclimatare de două săptămâni; dacă mortalitatea este peste 5 % în a doua perioadă de șapte zile, se respinge întregul lot;

— Mortalitatea sub 5 % la populația de cultură în perioada de șapte zile premergătoare transferului în sistemul de testare: se acceptă lotul.

20. Peștii nu ar trebui să beneficieze de tratament pentru boli în perioada de două săptămâni de aclimatare dinaintea testului și în perioada de expunere, iar tratarea bolilor ar trebui să fie complet evitată, dacă este posibil. Peștii cu semne clinice de boală nu ar trebui utilizați în cadrul studiului. Ar trebui să fie păstrată o evidență a observațiilor și a oricăror tratamente profilactice și terapeutice în perioada de cultură premergătoare testului.

21. Faza de expunere ar trebui să fie inițiată cu pești adulți având sexul genetic stabilit, care sunt dismorfici sexual, din rezerva laboratorului de animale mature din punct de vedere reproductiv și crescute la o temperatură de 25 ± 2 °C. Peștii ar trebui identificați ca reproducători dovediți (și anume, să fi produs progenituri viabile) în săptămâna premergătoare expunerii. Pentru întregul grup de pești utilizat în cadrul testului, intervalul greutăților individuale pe sexe la începutul testului ar trebui menținut în limitele de ± 20 % din media aritmetică a greutății la același sex. Un subeșantion de pești ar trebui cântărit înainte de test pentru a estima greutatea medie. Peștele selecționat ar trebui să fie de cel puțin 12 sdf, având o greutate de ≥ 300 mg în cazul femelelor și de ≥ 250 mg în cazul masculilor.

TIPUL TESTULUI

Concentrații de testare

22. Se recomandă utilizarea a cinci concentrații de substanțe chimice, plus martor(i). Toate sursele de informații ar trebui să fie luate în considerare atunci când se selectează intervalul concentrațiilor de testare, inclusiv relațiile cantitative structură-activitate (QSAR), datele extrapolate din teste analoage, rezultatele testelor pe pești, cum ar fi testele privind toxicitatea acută (capitolul C.1 din prezenta anexă), testul de reproducere a peștilor pe termen scurt (capitolul C.48 din prezenta anexă) și alte metode de testare, de exemplu, capitolele C.15, C.37, C.41, C.47 sau C.49 din prezenta anexă (21) (22) (23) (24) (25) (26), dacă există, sau, dacă este necesar, dintr-un test de stabilire a intervalului care ar putea include o fază de reproducere. Dacă este necesar, testul de stabilire a intervalului poate fi efectuat în condiții (calitatea apei, sistemul de testare, aportul de animale) similare cu cele utilizate pentru testul definitiv. În cazul în care este necesară utilizarea unui solvent și nu sunt disponibile date istorice, testul de stabilire a intervalului poate fi utilizat pentru identificarea caracterului adecvat al solventului. Concentrația cea mai mare de testare nu ar trebui să depășească solubilitatea în apă, 10 mg/l sau 1/10 din 96h-LC50 (27). Concentrația cea mai scăzută ar trebui să fie un factor de 10 până la 100 de ori mai mic decât cea mai mare concentrație. Utilizarea a cinci concentrații în cadrul acestui test permite nu numai măsurarea relațiilor doză-răspuns, ci și determinarea concentrației celei mai scăzute pentru care este observat un efect (LOEC) și CFEO, care sunt necesare pentru evaluarea riscurilor în cadrul anumitor programe sau jurisdicții de reglementare. În general, factorul de separare dintre concentrații nominale ale substanței chimice de testat între niveluri de tratament adiacente este ≤ 3,2.

Duplicate în cadrul grupurilor de tratament și al martorilor

23. Ar trebui să fie utilizate minim șase camere de testare duplicate pentru fiecare concentrație de testare (a se vedea apendicele 7). În faza de reproducere (cu excepția generației F0), structura de replicare este dublată pentru evaluarea fecundității și fiecare duplicat are doar o singură pereche de reproducție (a se vedea punctul 42).

24. Pe lângă concentrațiile de testat, ar trebui să fie supuse testării un martor apă de diluție și, dacă este necesar, un martor solvent. Ar trebui să se utilizeze un număr dublat de camere duplicate pentru martori pentru a asigura o putere statistică adecvată (și anume, pentru martori ar trebui să fie utilizate cel puțin douăsprezece duplicate). În faza de reproducere, numărul duplicatelor din martori sunt dublate (și anume, minim 24 de duplicate și fiecare duplicat are o singură pereche de reproducție). În urma reproducerii, duplicatele martori ar trebui să conțină cel mult 20 de embrioni (pește).

PROCEDURA

Începerea testului

25. Peștele adult activ din punct de vedere reproductiv, care este utilizat pentru începerea generației F0 în cadrul testului, este selectat pe baza a două criterii: vârsta (de obicei peste 12 sdf, dar se recomandă să nu se depășească 16 sdf) și greutatea (ar trebui să fie de ≥ 300 mg în cazul femelelor și de ≥ 250 mg în cazul masculilor).

26. Perechile femele-masculi care corespund specificațiilor de mai sus sunt mutate ca perechi individuale în fiecare duplicat din bazin, și anume douăsprezece duplicate în martori și șase duplicate în tratamente chimice la începutul testului. Acestor bazine li se distribuie în mod aleatoriu un tratament (de exemplu, T1-T5 și martor) și un duplicat (de exemplu, A-L la martori și A-F la tratament), iar apoi sunt introduse în sistemul de expunere cu debitul adecvat pentru fiecare bazin.

Condiții de expunere

27. Apendicele 3 cuprinde o prezentare completă a parametrilor și condițiilor de testare. Respectarea acestor specificații ar trebui să aibă drept rezultat existența unor valori ale punctelor finale la peștii martor similare cu cele enumerate în apendicele 4.

28. În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura ar trebui să fie măsurate în cel puțin un vas de testare al fiecărui grup de tratament și martor. Ca și cerințe minime, aceste măsurători, cu excepția temperaturii, ar trebui efectuate o dată pe săptămână în perioada de expunere. Temperatura medie a apei pe întreaga durată a studiului ar trebui să fie cuprinsă între 24 °C și 26 °C pe parcursul testării. Temperatura ar trebui să fie măsurată în fiecare zi în perioada de expunere. pH-ul apei ar trebui să fie cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui anumit test, acesta ar trebui să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități. Duplicatele în cadrul unui tratament nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic, iar grupurile de tratament din cadrul testului nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic (pe baza măsurătorilor de temperatură zilnice și excluzând abaterile de scurtă durată).

Durata expunerii

29. Testul expune pești reproducători sexual din generația F0 timp de trei săptămâni. În săptămâna 4, aproximativ în ziua de testare 24, se stabilește F1, iar perechile de reproducție F0 sunt eutanasiate, fiind înregistrate greutatea și lungimea (a se vedea punctul 34). Aceasta este urmată de expunerea generației F1 timp de alte 14 săptămâni (în total 15 săptămâni pentru generația F1) și a generației F2 timp de două săptămâni până la eclozare. Durata totală a testului este de 19 săptămâni (și anume, până la eclozarea F2). Calendarele pentru testare sunt prezentate în tabelul 2 și explicate în detaliu în apendicele 9.

Regimul de hrănire

30. Peștii pot fi hrăniți cu creveți în saramură *Artemia* spp. (larve nauplii de 24 de ore) *ad libitum*, fiind asigurat un supliment de hrană sub formă de fulgi din comerț, dacă este necesar. Hrana sub formă de fulgi din comerț ar trebui analizată în mod regulat pentru detectarea contaminanților precum pesticidele organoclorurate, hidrocarburile aromatice policiclice (HAP), bifenilii policloruraţi (PCB). Ar trebui să se evite produsele alimentare cu un nivel ridicat de substanțe active endocrin (și anume fitoestrogeni) care ar putea compromite răspunsul testului. Hrana neconsumată și materiile fecale ar trebui înlăturate din vasele de testare, după caz, de exemplu prin curățarea cu atenție a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon. Părțile laterale și partea inferioară a fiecărui bazin ar trebui, de asemenea, să fie curățate o dată sau de două ori pe săptămână (de exemplu, prin răzuire cu o spatulă). Un exemplu de program de hrănire se găsește în apendicele 5. Rata de hrănire depinde de numărul de pești per duplicat. Prin urmare, se reduce rata de hrănire dacă există cazuri de mortalitate într-un duplicat.

Determinare analitică și măsurători

31. Înainte de începerea perioadei de expunere, ar trebui asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Ar trebui stabilite toate metodele analitice necesare, inclusiv cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în cadrul sistemului de testare. În timpul testării, concentrațiile substanței chimice de testare se determină la intervale adecvate, de preferință cel puțin o dată pe săptămână, într-un duplicat, pentru fiecare grup de tratament, cu rotire între duplicate din cadrul aceluiași grup de tratament în fiecare săptămână.

32. În timpul testării, debitele diluantului și ale soluției mamă ar trebui verificate periodic în mod corespunzător (de exemplu, cel puțin de trei ori pe săptămână). Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Însă, în cazul în care concentrația substanței chimice de testat în soluție a fost menținută la un nivel satisfăcător în intervalul ± 20 % din media valorilor măsurate pe durata testului, atunci rezultatele pot fi bazate fie pe valorile nominale, fie pe valorile măsurate. În cazul substanțelor chimice care se acumulează în pești în mod semnificativ, concentrațiile de testare pot scădea pe măsură ce peștii cresc. În astfel de cazuri, se recomandă ca rata de reînnoire a soluției de testat din fiecare cameră să fie adaptată pentru a menține concentrațiile de testare cât mai constant posibil.

Observații și puncte finale măsurate

33. Punctele finale măsurate includ fecunditatea, fertilitatea, eclozarea, creșterea și supraviețuirea pentru evaluarea unor posibile efecte asupra populației. De asemenea, ar trebui să se emită zilnic observații cu privire la comportament, iar orice comportament neobișnuit ar trebui să fie notat. Alte puncte finale mecanistice includ nivelurile mRNA hepatice ale *vtg* sau nivelurile de proteine VTG determinate prin imunodozare (28), markeri fenotipici sexuali, cum ar fi papilele înotătoarelor anale caracteristice masculilor, evaluarea histologică a sexului gonadal și evaluarea histopatologică a rinichilor, ficatului și gonadei (a se vedea lista punctelor finale din tabelul 1). Toate aceste puncte finale specifice sunt evaluate în contextul determinării sexului genetic al individului, pe baza prezenței sau absenței sexului masculin la specia medaka, ce determină valoarea *dmy* a genei (a se vedea punctul 41). În plus, este evaluat timpul necesar pentru reproducere. În plus, pot fi derivate raporturi sexuale fenotipice simple pe baza informațiilor obținute din numărarea papilelor înotătoarelor anale pentru ca fiecare pește medaka să fie identificat ca fiind fie mascul, fie femelă fenotipică. Nu ar fi de așteptat ca prin această metodă de testare să se detecteze abaterile modeste din rata de sex preconizată, deoarece numărul relativ mic de pești per duplicat nu va asigura o suficientă putere statistică. De asemenea, în cursul evaluării histopatologice, gonada este evaluată și sunt efectuate analize mult mai pertinente pentru evaluarea fenotipului gonadei în contextul sexului genetic.

34. Scopul principal al acestei metode de testare este de a evalua efectele potențiale relevante asupra populației ale unei substanțe chimice de testat. Punctele finale mecaniciste (VTG, SSC și anumite efecte histopatologice ale gonadelor) pot, de asemenea, să contribuie la determinarea măsurii în care orice efect este mediat prin intermediul activității endocrine. Însă, aceste puncte finale mecanistice pot fi, de asemenea, influențate de probleme sistemice sau alte tipuri de toxicitate. În consecință, histopatologia ficatului și a rinichilor poate fi, de asemenea, evaluată în detaliu, pentru a contribui la o mai bună înțelegere a oricăror răspunsuri de la nivelul punctelor finale mecaniciste. Însă, chiar dacă nu sunt efectuate aceste evaluări detaliate, anomaliile brute observate incidental în evaluarea histopatologică ar trebui totuși observate și raportate.

Eutanasierea peștilor

35. La finalul expunerii generațiilor F0 și F1 și atunci când se constituie sub-eșantioane de pești subadulți, peștii ar trebui să fie eutanasiați cu cantități adecvate de soluție anestezică [de exemplu, metan sulfonat de tricaină, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l] cu o soluție tampon de 300 mg/l $NaHCO_3$ (bicarbonat de sodiu, CAS.144-55-8) pentru a reduce iritația membranei mucoase. În cazul în care peștii manifestă semne de suferință considerabilă (se poate prezice în mod sigur suferința foarte gravă și decesul) și considerați se consideră că aceștia sunt muribunzi, animalele ar trebui anesteziate și eutanasiate și tratate drept mortalitate în scopul analizei datelor. Atunci când un pește este eutanasiat din cauza morbidității, acest aspect ar trebui observat și raportat. În funcție de momentul în care peștele este eutanasiat în timpul studiului, se poate proceda la reținerea peștelui pentru analiza histopatologică (fixarea peștelui pentru o posibilă histopatologie).

Manipularea ouălor și a larvelor de pește

Colectarea ouălor de la perechile de reproducție pentru a propaga următoarea generație

36. Colectarea ouălor se face în prima zi (sau în primele două zile, dacă este necesar) a săptămânii de testare 4 pentru a trece de la F0 la F1 și a săptămânii de testare 18 pentru a trece de la F1 la F2. Săptămâna de testare 18 corespunde peștilor adulți din generația F1, 15 sdf (săptămâni după fertilizare). Este important ca toate icrele să fie eliminate din fiecare bazin cu o zi înainte de începerea colectării acestora pentru a asigura faptul că toate icrele colectate de la o pereche de reproducție provin de la o singură depunere de icre. În urma depunerii icrelor, femelele medaka își poartă uneori icrele aproape de anus până când acestea pot fi depozitate pe un substrat. În absența unui substrat în bazin, icrele se găsesc fie atașate de o femelă, fie pe partea inferioară a bazinului. În funcție de locul în care se află, icrele sunt fie îndepărtate cu grijă de femelă, fie sifonate de la partea inferioară în săptămâna de testare 4 a generației F0 și în săptămâna de testare 18 a generației F1. Toate icrele colectate în cadrul unui tratament sunt adunate la un loc înainte de a fi distribuite la camerele de incubare.

37. Filamentele din ouă, care țin ouăle depuse laolaltă, ar trebui îndepărtate. Icrele fertilizate (maxim 20) sunt colectate de la fiecare pereche de reproducție (1 pereche per duplicat), sunt adunate la un loc prin tratament și distribuite în mod sistematic în camere de incubare corespunzătoare (apendicele 6, 7). Cu ajutorul unui microscop de disecție de bună calitate, se pot vedea semnele fertilizării/dezvoltare precoce, cum ar fi ridicarea membranei de fertilizare (corion), diviziunea celulară continuă sau formarea blastulei. Camerele de incubare pot fi introduse în acvarii de tip „incubator" montate separat pentru fiecare tratament (caz în care trebuie să se măsoare parametrii de calitate a apei și concentrațiile substanței chimice de testat în acestea) sau în acvariul cu duplicate în care vor fi păstrate larvele eclozate (*de exemplu*, embrionul eclozat) vor fi limitate. În cazul în care este necesară o a doua zi de colectare (ziua de testare 23), toate icrele din ambele zile ar trebui să fie grupate și apoi redistribuite în mod sistematic în fiecare dintre duplicatele pentru tratament.

Creșterea icrelor până la eclozare

38. Icrele fertilizate sunt agitate în mod continuu, *de exemplu*, în incubatorul de icre prin intermediul bulelor de aer sau prin balansarea verticală a incubatorului de icre. Mortalitatea icrelor fertilizate (embrionilor) este verificată și înregistrată zilnic. Icrele moarte sunt scoase din incubatoare (apendicele 9). În a șaptea zi după fertilizare (zdf), agitarea este oprită sau redusă astfel încât icrele fertilizate să se depună pe partea inferioară a incubatorului. Astfel se promovează eclozarea, de regulă în următoarea sau următoarele două zile. Pentru fiecare tratament și martor, sunt numărate larvele (larve tinere; embrioni eclozați) (baza de duplicate). Ouăle fertilizate care nu au eclozat până în perioada echivalentă cu dublul zilei mediane a incubației din martor (de regulă, 16 sau 18 zdf) se consideră neviabile și sunt eliminate.

39. În fiecare bazin duplicat se transferă douăsprezece larve. Larvele din camerele de incubație sunt grupate și distribuite în mod sistematic în bazine duplicate (apendicele 7). Acest lucru se poate realiza prin selectarea aleatorie a unei larve din rezerva de tratament și prin adăugarea secvențială a unei larve, printr-o extragere nediferențiată, într-un acvariu duplicat. Fiecare din bazine ar trebui să conțină un număr egal (n = 12) de larve eclozate (maximum 20 de larve fiecare). Dacă nu există suficiente larve pentru a umple toate duplicatele pentru tratament, se recomandă să se asigure un număr cât mai mare posibil de duplicate cu 12 larve. Larvele pot fi manipulate în condiții de siguranță cu pipete din sticlă cu diametru mare. Larvele suplimentare sunt eutanasiate cu anestezici. Pe parcursul celor câteva săptămâni anterioare formării perechilor de reproducție, ar trebui să se înregistreze ziua în care se observă primul eveniment de reproducere în fiecare duplicat.

Formarea perechilor de reproducție

Tăierea înotătoarelor și determinarea sexului genotipic

40. Determinarea sexului genotipic prin tăierea unor părți din înotătoare se realizează la 9-10 sdf (și anume, săptămâna de testare 12-13 pentru generația F1). Toți peștii dintr-un bazin sunt anesteziați (folosind metode aprobate, de exemplu, IACUC) și se prelevă o mică probă de țesut din extremitatea dorsală sau ventrală a înotătoarei caudale a fiecărui pește pentru a determina sexul genotipic al exemplarului (29). Peștii dintr-un duplicat pot fi adăpostiți în cuști mici, dacă este posibil unul în fiecare cușcă, în bazinul duplicat. În mod alternativ, doi pești pot fi ținuți în fiecare cușcă dacă se pot diferenția unul de celălalt. Una dintre metode este de să se taie în mod diferențiat înotătoarea caudală (*de exemplu*, extremitatea dorsală față de cea ventrală) atunci când se prelevă proba de țesut.

41. Sexul genotipic al speciei medaka este determinat de o genă identificată și încadrată într-un șir (*dmy*) care este situată pe cromozomul Y. Prezența *dmy* indică un exemplar XY, indiferent de fenotip, iar absența *dmy* indică un exemplar XX, indiferent de fenotip (30); (31). Acidul dezoxiribonucleic (ADN) din fiecare tăiere a înotătoarei este extrasă, iar prezența sau absența *dmy* poate fi determinată prin metode de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (a se vedea apendicele 9 din capitolul C.41 din prezenta anexă sau apendicele 3 și 4 de la punctul 29).

Stabilirea perechilor de reproducție

42. Informațiile privind sexul genotipic sunt utilizate pentru a stabili perechile de reproducție XX-XY, indiferent de fenotipul extern care poate fi modificat prin expunerea la o substanță chimică de testat. În ziua următoare celei în care se determină sexul genotipic al fiecărui pește, se aleg în mod aleatoriu doi pești XX și doi pești XY provenind din fiecare duplicat și se stabilesc două perechi de reproducție XX-XY. În cazul în care un duplicat nu are doi pești XX sau doi pești XY, ar trebui să se obțină pești adecvați din alte duplicate în cadrul tratamentului. Prioritatea este de a obține numărul recomandat de perechi de reproducție duplicate (12) pentru fiecare tratament și pentru martori (24). Peștii cu anomalii evidente (probleme ce țin de vezica urinară, deformări ale coloanei vertebrale, variații de mărime extreme etc.) ar fi excluși de la stabilirea perechilor de reproducție. În faza de reproducere pentru F1, fiecare bazin duplicat ar trebui să conțină numai o pereche de reproducție.

Eșantionarea subadulților și evaluarea punctelor finale

Eșantionarea peștilor din perechea de non-reproducție

43. După constituirea perechilor de reproducție, peștii neselectați pentru reproducere ulterioară sunt eutanasiați pentru măsurarea punctelor finale ale subadulților în săptămâna de testare 12-13 (F1). Este extrem de important ca peștii să fie manipulați în așa fel încât sexul genotipic determinat pentru selecția perechilor de reproducție să poată fi încă depistat la un exemplar. Toate datele colectate sunt analizate în contextul sexului genotipic al peștelui specific. Fiecare pește este utilizat pentru o varietate de măsurători ale punctelor finale, inclusiv: determinarea ratelor de supraviețuire în cazul peștilor tineri/subadulți (săptămânile de testare 7-12/13 (F1),

a creșterii în lungime (se poate măsura lungimea standard dacă înotătoarea caudală a fost scurtată ca urmare a prelevării de probe pentru analiza sexului genetic. Lungimea totală poate fi măsurată în cazul în care numai o porțiune a înotătoarei caudale, cea dorsală sau ventrală, este eșantionată pentru *dmy*, precum și masa corporală (și anume, masa umedă, uscare prin tamponare), valoarea mRNA a *vtg* (sau VTG) și papilele anale ale înotătoarelor (a se vedea tabelele 1 și 2). Este de precizat că greutatea și lungimea perechilor de reproducție sunt necesare, de asemenea, pentru calcularea creșterii medii în cadrul unui grup supus tratamentului.

Eșantionarea țesutului și măsurarea vitelogeninei

44. Ficatul este disecat și ar trebui să fie păstrat la ≤ −70 °C până la măsurarea mRNA a *vtg* (sau VTG). Coada peștelui, inclusiv înotătoarea anală, este păstrată într-o soluție fixativă adecvată (de exemplu, Davidson's) sau fotografiată astfel încât papilele înotătoarei anale să fie luate în calcul la o dată ulterioară. [Dacă se dorește, pot fi prelevate alte țesuturi (și anume, gonada) și păstrate în acest moment.] Concentrația VTG din ficat ar trebui să fie cuantificată printr-o tehnică ELISA omologată (a se vedea procedurile recomandate pentru medaka în apendicele 6 din capitolul C.48 din prezenta anexă). În mod alternativ, metodele pentru cuantificarea valorii mRNA a vtg, și anume, extragerea mRNA a genei *vtg I* dintr-o probă de ficat și cuantificarea numărului copiilor genei *vtg I* (per ng de mRNA total) prin reacția PCR cantitativă, au fost stabilite de Agenția SUA pentru protecția mediului (29). În locul determinării numărului de copii ale genei *vtg* în grupurile martor și de tratament, o metodă mai accesibilă din punctul de vedere al resurselor și mai puțin dificilă din punct de vedere tehnic va stabili modificarea relativă (multiplicarea) a expresiei *vtg I* în grupurile martor și de tratament.

Caracteristici sexuale secundare

45. În condiții normale, numai peștii medaka masculi care sunt maturi din punct de vedere sexual sunt prevăzuți cu papile care se dezvoltă pe plăcile unite ale anumitor raze ale înotătoarei anale ca o caracteristică sexuală secundară, oferind un posibil marker biologic pentru efectele perturbatoare ale sistemului endocrin. Metoda de contabilizare a papilelor înotătoarei anale (numărul de plăci unite cu papile) este prezentată în apendicele 8. De asemenea, numărul papilelor înotătoarei anale per exemplar este utilizat pentru a clasifica respectivul exemplar ca și mascul sau femelă fenotipic(ă) la nivel extern în vederea calculării unui raport al sexului simplu per duplicat. Un pește medaka cu orice număr mai mare de 0 este definit ca fiind mascul; un pește medaka cu zero papile ale înotătoarei anale este definit ca fiind femelă.

Evaluarea fecundității și a fertilității

46. Fecunditatea și fertilitatea sunt evaluate în săptămânile de testare 1-3 la generația F0 și în săptămânile de testare 15-17 la generația F1. Ouăle sunt colectate zilnic pentru fiecare pereche de reproducție timp de 21 de zile consecutiv. Ouăle sunt ușor eliminate de la femelele prinse în plasă și/sau sifonate de la partea inferioară a acvariului în fiecare dimineață. Fecunditatea și fertilitatea sunt înregistrate zilnic pentru fiecare pereche de reproducție duplicat. Fecunditatea este definită ca fiind numărul de ouă depuse, iar fertilitatea este definită din punct de vedere funcțional ca fiind numărul de ouă fertilizate și viabile în momentul numărării. Numărătoarea ar trebui efectuată cât mai curând posibil după colectarea ouălor.

47. Fecunditatea duplicată este înregistrată zilnic ca fiind numărul de ouă per pereche de reproducție care se analizează prin procedurile statistice recomandate folosind mediile duplicate. Fertilitatea duplicată reprezintă suma numărului de ouă fertile produse de o pereche de reproducție împărțită la suma numărului de ouă produse de perechea respectivă. Din punct de vedere statistic, fertilitatea este analizată ca procent per duplicat. Capacitatea de eclozare duplicată este numărul de larve împărțit la numărul de embrioni încărcați (de regulă, 20). Din punct de vedere statistic, capacitatea de eclozare este analizată ca procent per duplicat.

Eșantionarea adulților și evaluarea punctelor finale

Eșantionarea peștilor din perechea de reproducție

48. După săptămâna de testare 17 (și anume, după lansarea cu succes a generației F2), adulții F1 sunt eutanasiați și se evaluează diverse puncte finale (a se vedea tabelele 1 și 2). Înotătoarea anală este procesată imagistic pentru evaluarea papilelor înotătoarei anale (a se vedea apendicele 8) și/sau coada, imediat din spatele anusului, este îndepărtată și fixată pentru numărarea ulterioară a papilelor. O porțiune a înotătoarei caudale poate fi eșantionată și arhivată în acest moment pentru verificarea sexului genetic (*dmy*), dacă se dorește. Dacă este necesar, se poate preleva o probă de țesut pentru a repeta analiza *dmy* pentru verificarea sexului genetic al anumitor pești. Se deschide cavitatea corpului pentru a permite perfuzarea cu soluții fixative adecvate (de exemplu, Davidson's) înainte de submersarea întregului corp în soluția fixativă. Însă, în cazul în care se parcurge o etapă adecvată de permeabilizare înainte de fixare, nu este necesar să se deschidă cavitatea corpului.

Histopatologie

49. Fiecare pește este evaluat histologic pentru patologie în țesutul gonadal (30); (29). Astfel cum este menționat la punctul 33, alte puncte finale mecanistice evaluate în cadrul acestui test (și anume, VTG, SSC și anumite efecte histopatologice ale gonadelor) pot fi influențate de toxicități sistemice sau de altă natură. În consecință, histopatologia ficatului și a rinichilor poate fi, de asemenea, evaluată în detaliu, pentru a contribui la o mai bună înțelegere a oricăror răspunsuri de la nivelul punctelor finale mecaniciste. Însă, chiar dacă nu sunt efectuate aceste evaluări detaliate, anomaliile brute observate incidental în evaluarea histopatologică ar trebui totuși observate și raportate. Ar putea fi avută în vedere „citirea de sus în jos" de la cel mai mare grup de tratament (comparativ cu martorul) la un tratament fără efect, însă se recomandă consultarea ghidului privind histopatologia (29). De regulă, toate probele sunt prelucrate/secționate, după care sunt citite de patolog. În cazul în care se utilizează o abordare de „citire de sus în jos", se observă că procedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) aplică principiul bazat pe așteptarea conform căreia, pe măsură ce cresc nivelurile dozei, va crește, de asemenea, impactul biologic (patologia). Prin urmare, se va pierde putere dacă se ia în considerare doar o singură doză, cea mai mare, fără dozele intermediare. În cazul în care nu este necesară o analiză statistică pentru a determina dacă doza mare nu produce efecte, atunci această abordare poate fi acceptabilă. Fenotipul gonadei este, de asemenea, derivat din această evaluare

Alte observații

50. MEOGRT furnizează date care pot fi utilizate (de exemplu, în cadrul unei abordări bazate pe forța probantă a datelor) pentru a evalua simultan cel puțin două tipuri generale de parcursuri ale răspunsurilor adverse (AOP) care culminează cu deficiența de reproducere: (a) parcursuri mediate de sistemul endocrin, implicând perturbarea axului hipotalamo-hipofizo-gonadal (HPG) endocrin; și (b) parcursurile care determină reduceri în ceea ce privește supraviețuirea, creșterea (lungime și greutate) și reproducerea prin toxicitate nemediată de sistemul endocrin. Punctele finale măsurate, de regulă, în testele de toxicitate cronică, cum ar fi testul privind întregul ciclu de viață și testul privind etapele de viață timpurii sunt, de asemenea, incluse în acest test și pot fi utilizate pentru a evalua pericolele prezentate atât de modurile de acțiune toxică nemediată de sistemul endocrin, cât și de parcursurile de toxicitate mediată de sistemul endocrin. În timpul testului, ar trebui să se emită zilnic observații cu privire la comportament, iar orice comportament neobișnuit ar trebui să fie notat. În plus, orice mortalitate ar trebui să fie înregistrată și ar trebui să fie calculată supraviețuirea până la sacrificarea peștilor (săptămâna 6/7), supraviețuirea după sacrificarea la eșantionul de subadulți (în 9-10 sdf) și supraviețuirea de la momentul realizării de perechi până la prelevarea de probe de la pești adulți.

Tabelul 1

Prezentarea punctelor finale ale MEOGRT (*)

Etapa de viață	Punct final	Generație
Embrion (2 sdf)	Eclozare (% și timp până la eclozare)	F1, F2
Exemplare tinere (4 sdf)	Supraviețuire	F1
Subadult (9 sau 10 sdf)	Supraviețuire	F1
	Creștere (lungime și greutate)	
	Vitelogenină (mRNA sau proteină)	
	Caracteristici sexuale secundare (papilă înotătoare anală)	
	Procent sex extern	
	Timp până la prima depunere	
Adult (12-14 sdf)	Reproducere (fecunditate și fertilitate)	F0, F1
Adult (15 sdf)	Supraviețuire	F1
	Creștere (lungime și greutate)	
	Caracteristici sexuale secundare (papilă înotătoare anală)	
	Histopatologie (gonadă, ficat, rinichi)	

(*) Aceste puncte finale trebuie să fie analizate din punct de vedere statistic

CALENDAR

51. Un calendar pentru MEOGRT ilustrat în tabelul 2 arată testul. MEOGRT cuprinde 4 săptămâni de expunere la adulții din F0 și 15 săptămâni de expunere la generația F1, precum și perioada de expunere pentru cea de a doua generație (F2), până la ecloziune (2 sdf). Activitatea desfășurată pe parcursul MEOGRT este sintetizată în apendicele 9.

Tabelul 2

Calendarele pentru expunere și punctele finale de măsurare pentru MEOGRT

Calendarul MEOGRT pentru expunere și puncte finale

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Săptămâna de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Etapa de viață cheie					**Embrion**					**Larve**					**Exemplare tinere**			**Subadult**	**Adult**
Puncte finale																			
Fecunditate	F_0														F_1				
Fertilitate	F_0														F_1				
Eclozare					F_1														F_2
Supraviețuire						F_1						F_1						F_1	
Creștere				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenină												F_1							
Sex secundar												F_1						F_1	
Histopatologie																		F_1	
Săptămâna de testare	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Modelul experimental cuprinde 7 grupuri de duplicate
  - 5 pentru tratamente cu substanțe chimice de testat
  - 2 pentru tratamente cu martor (4, în cazul în care se utilizează solvent)
- Model în cadrul grupului
  - 12 duplicate pentru reproducere, patologie pentru adulți și SSC (săpt. 10-18)
  - 6 duplicate pentru eclozare, supraviețuire, vtg; și - SSC și creștere subadulți (săpt. 1-9)

SSC: caracteristici sexuale secundare; Săpt.: săptămâni;

Vtg: vitelogenină

DATE ȘI RAPORTARE

Analiza statistică

52. Întrucât sexul genotipic este determinat la toți peștii pentru testare, datele ar trebui să fie analizate separat pentru fiecare sex genotipic (și anume, masculi XY și femele XX). În cazul în care acest lucru nu este posibil, puterea statistică a oricărei analize va fi redusă considerabil. Analizele statistice ale datelor ar trebui, de preferință, să urmeze procedurile descrise în documentul OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" (32) (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind ecotoxicitatea: un ghid pentru aplicare) (32). Apendicele 10 oferă orientări suplimentare pentru analiza statistică.

53. Modelul testului și selecția testelor statistice ar trebui să permită existența unei puteri adecvate pentru detectarea schimbărilor de importanță biologică în punctele finale în cazul în care CFEO va fi raportată (32). Este posibil ca raportarea unor concentrații de efect și a unor parametri relevanți să depindă de un cadru de reglementare. Ar trebui să se identifice variația procentuală la fiecare punct final care este important de detectat sau estimat. Modelul testului trebuie adaptat pentru a permite acest lucru. Este posibil să nu se aplice aceeași variație procentuală la toate punctele finale și să nu poată fi conceput un experiment fezabil care să îndeplinească aceste criterii pentru toate punctele finale. Prin urmare, este important ca atenția să fie îndreptată asupra punctelor finale pentru experimentul respectiv în vederea unei proiectări adecvate a experimentului. În apendicele 10 este disponibilă o diagramă statistică și orientări pentru a ajuta la tratarea datelor și la alegerea celui mai adecvat test sau model statistic pentru a fi utilizat. Pot fi utilizate alte abordări statistice, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.

54. Va fi necesar ca variațiile să fie analizate în cadrul fiecărui set de probe duplicat folosind analiza varianței sau procedurile tabelelor de contingență, precum și metode adecvate și suficiente de analiză statistică pe baza acestei analize. Pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și cele pentru martori, se recomandă procedura de tip „step-down" (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra) pentru răspunsuri continue. În cazul în care datele nu sunt consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă, ar trebui să se utilizeze testul Dunnett sau Dunn (după o transformare adecvată a datelor, dacă este necesar).

55. Pentru fecunditate, ouăle sunt numărate zilnic, dar pot fi analizate ca număr total de ouă sau ca măsură repetată. Apendicele 10 prezintă detaliile privind modul în care este analizat acest punct final. Pentru datele privind histopatologia, care sunt sub formă de punctaje de gravitate, a fost elaborat un nou test statistic, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RISCABS) (33).

56. Ar trebui să fie raportate orice puncte finale observate în tratamentele chimice care sunt semnificativ diferite de martorii corespunzători.

Considerații privind analiza datelor

Utilizarea nivelurilor de tratament compromise

57. O serie de factori sunt luați în considerare atunci când se stabilește dacă un duplicat sau întregul tratament demonstrează toxicitate evidentă, iar acesta ar trebui să fie exclus de la analiză. Toxicitatea evidentă este definită ca > 4 cazuri de mortalitate în orice duplicat între 3 și 9 sdf, care nu poate fi explicată prin eroare tehnică. Alte semne ale toxicității evidente includ hemoragia, comportamentele anormale, modalitățile anormale de înot, anorexia și orice alte semne clinice de boală. În ceea ce privește semnele subletale de toxicitate, ar putea fi necesare evaluări calitative care ar trebui întotdeauna efectuate în raport cu un grup de martori dintr-un vas cu apă de diluție (exclusiv apă curată). În cazul în care se observă toxicitatea evidentă la tratamentul (tratamentele) de la cel mai înalt nivel, se recomandă ca tratamentele respective să fie cenzurate de la analiză.

Martori solvent

58. Utilizarea unui solvent ar trebui avută în vedere doar ca ultimă soluție, după epuizarea tuturor celorlalte opțiuni de livrare a substanței chimice. În cazul utilizării unui solvent, ar trebui să se utilizeze concomitent o apă de diluție. La încheierea testului, ar trebui efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului. Aceasta se realizează printr-o comparație statistică între grupul de martori solvent și grupul de martori apă de diluție. Cele mai relevante puncte finale care trebuie luate în considerare în această analiză sunt factorii determinanți ai creșterii (greutate), deoarece aceștia pot fi afectați prin toxicități generalizate. În cazul în care se detectează diferențe semnificative din punct de vedere statistic la aceste puncte finale între grupul cu martor tratat cu apă de diluție și grupul cu martor tratat cu solvent, ar trebui să se recurgă la cea mai bună apreciere profesională pentru a determina dacă validitatea testului este compromisă. În cazul în care cei doi martori diferă, tratamentele expuse la substanța chimică ar trebui comparate cu martorul tratat cu solvent, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă o comparație cu martorul tratat cu apă de diluție. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două grupuri cu martori, se recomandă ca tratamentele expuse la substanța chimică de testat să fie comparate cu cele ale grupului (grupul cu martor tratat cu solvent și grupul cu martor tratat cu apă de diluție), cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă numai comparația cu grupul cu martor tratat cu apă de diluție sau cu grupul cu martor tratat cu solvent.

Raportul testului

59. Raportul testului ar trebui să includă următoarele:

Substanța chimică de testat: proprietăți de natură fizică și, dacă este relevant, proprietăți fizico-chimice;

— Date de identificare a substanței chimice.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Specii de testare:

— numele științific, sușa, dacă există, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate, precum și manipularea ulterioară.

Condiții de testare:

— Perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— Modelul de testare (de exemplu, dimensiunea camerei, volumul materialului și al apei, numărul camerelor de testare și al duplicatelor, numărul larvelor pe duplicat);

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (ar trebui să se specifice agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— metoda de dozare a substanței chimice de testat (*de exemplu*, pompe, sisteme de diluare);

— eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorile măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testat în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă a fost măsurat), carbonul organic total (dacă a fost măsurat), solide în suspensie (dacă au fost măsurate), salinitatea mediului de testare (dacă a fost măsurată) și alte măsurători făcute;

— concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard ale acestora;

— calitatea apei din vasele de testare, pH, temperatură (zilnic) și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații detaliate legate de hrană [de exemplu, tipul de alimente, sursa, cantitatea administrată și frecvența].

Rezultate:

— dovezi privind faptul că martorii au îndeplinit criteriile generale de validare;

— datele pentru martor (plus martorul tratat cu solvent atunci când este utilizat) și grupurile de tratament, după cum urmează, eclozarea (capacitatea de eclozare și timpul până la eclozare) pentru F1 și F2, rata de supraviețuire după eclozare pentru F1, creșterea (lungimea și greutatea corporală) pentru F1, sexul genotipic și diferențierea sexuală (de exemplu, caracteristicile sexuale secundare pe baza papilelor înotătoarelor anale și a histologiei anale și gonadale) pentru F1, sexul fenotipic pentru F1, caracteristicile sexuale secundare (papilele înotătoarelor anale) pentru valoarea mRNA a *vtg* (sau proteina VTG) pentru F1, evaluarea histopatologică (gonada, ficatul și rinichii) pentru F1 și reproducerea (fecunditate și fertilitate) pentru F0 , F1; (a se vedea tabelele 1 și 2).

— abordarea analizei statistice (analiza regresiei sau analiza variației) și tratarea datelor (teste statistice și modele utilizate);

— concentrația fără efect observat (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat;

— concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pentru fiecare răspuns evaluat (la p = 0,05); CE_x pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (de exemplu 90 % sau 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați ai modelului și erorile standard ale acestora.

— Orice abatere de această metoda de testare și abateri de la criteriile de acceptare, precum și considerații privind eventualele consecințe asupra rezultatului testului.

60. Pentru rezultatele măsurărilor punctelor finale, ar trebui să fie prezentate valorile medii și deviațiile lor standard (în funcție de duplicat și concentrație, dacă este posibil).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 171), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K și Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OCDE (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457-464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T și 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 și Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H și 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 și 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 și 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 și 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 și 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 și 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) Agenția SUA pentru protecția mediului (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Publicație disponibilă la adresa: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P și 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) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 23), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ și Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE și Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ și Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K și Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K și 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) Capitolul C.15 din prezenta anexă, Pește, test de toxicitate pe termen scurt privind stadiul embrionar și de pești tineri.

(22) Capitolul C.37 din prezenta anexă, Analiza de 21 de zile pentru pești: screening cu durată scurtă pentru detectarea activității estrogenice și androgenice și a inhibării aromatazei.

(23) Capitolul C.41 din prezenta anexă, Testul de dezvoltare sexuală a peștilor.

(24) Capitolul C.48 din prezenta anexă, Analiza reproducerii pe termen scurt la pești.

(25) Capitolul C.47 din prezenta anexă, Pești, Testul de toxicitate în stadii de viață timpurii.

(26) Capitolul C.49 din prezenta anexă, Testul de toxicitate acută la embrionii de pești (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L și Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M și Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 227). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M și 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 și Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN și Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

Apendicele 1

DEFINIțII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

ELISA: test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic

Fecunditate = numărul ouălor;

Fertilitate = numărul ouălor viabile/fecunditate;

Lungimea cozii (LC): se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și capătul radiilor de mijloc ale înotătoarei caudale și este utilizată la pești la care este dificil de precizat unde se termină coloana vertebrală (www.fishbase.org)

Capacitatea de eclozare = larve/numărul de embrioni încărcați într-un incubator

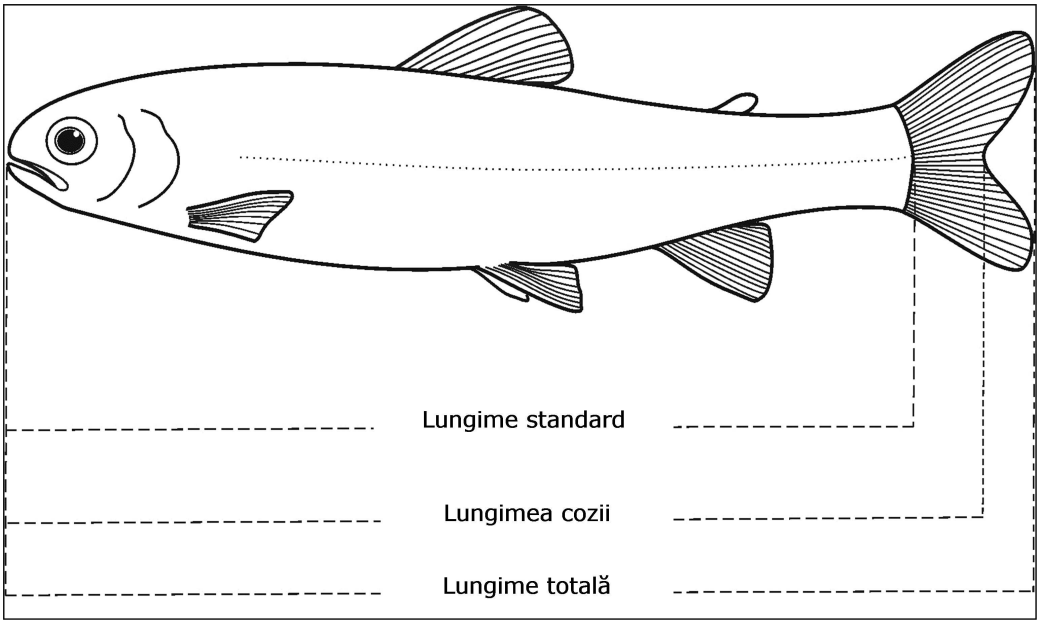
IACUC: Comitetul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor

Lungimea standard (SL) se referă la lungimea unui pește măsurat de la vârful botului până la extremitatea posterioară a ultimei vertebre sau la extremitatea posterioară a liniei laterale a pedunculului. Cu alte cuvinte, această măsurătoare exclude lungimea înotătoarei caudale. (www.fishbase.org)

Lungimea totală (LT) se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și vârful lobului mai lung a înotătoarei caudale, măsurată de regulă cu lobii comprimați de-a lungul liniei laterale. Acesta este o măsurătoare în linie dreaptă, nu una măsurată urmând curbura corpului (www.fishbase.org)

Figura 1

Descrierea diferitelor lungimi folosite



CEx: (concentrație efectivă pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină o valoare x % a unui efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere dat în comparație cu un martor. De exemplu, o valoare EC50 este concentrația estimată să producă un efect asupra unui punct final de testare la 50 % dintr-o populație expusă într-un timp de expunere stabilit.

Testul în regim dinamic este un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare în perioada de expunere.

Axa HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

IUPAC: Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată.

Rata de încărcare: greutatea umedă a peștelui per volum de apă.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a unei substanțe chimice de testat la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul. Însă toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC ar trebui să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când aceste două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, ar trebui furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, CFEO). Apendicele 5 și 6 oferă orientări în acest sens.

Concentrația letală medie (LC50): este concentrația unei substanțe chimice de testat care este considerată letală la 50 % din organismele testate pe durata testului.

Concentrația fără efect observat (CFEO) este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu martorul, nu are niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-un timp de expunere stabilit.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Densitatea populației: numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

VTG: vitelogenina este o fosfolipoglicoproteină precursoare a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

SDF: săptămâni după fertilizare

Apendicele 2

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

Substanță	Concentrație-limită
Particule în suspensie	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	50 ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

Apendicele 3

CONDIȚII DE TESTARE PENTRU MEOGRT

1. Specii recomandate	Medaka japoneză (*Oryzias latipes*)
2. Tipul de testare	Continuu în regim dinamic
3. Temperatura apei	Temperatura nominală de testare este de 25 °C. Temperatura medie pe durata testului în fiecare bazin este de 24-26 °C.
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg și ~150 lumeni/m^2) (~150 lux).
5. Fotoperioadă	16 h de lumină, 8 h de întuneric
6. Rata de încărcare	F0: 2 adulți/duplicat; F1: inițiată cu maxim 20 de ouă (embrioni) /duplicat, redusă la 12 embrioni /duplicat la eclozare, apoi 2 adulți (pereche de reproducție XX-XY) la 9-10 sdf pentru faza de reproducere
7. Volum minim utilizabil în camera de testare	1,8 l (de exemplu, dimensiunea camerei de testare: 18 x 9 x 15 cm)
8. Schimburile de volum ale soluțiilor de testare	Minim 5 reînnoiri de volum/zi până la maxim 16 reînnoiri de volum/zi (sau un debit de 20 ml/min)
9. Vârsta organismelor de testare la inițiere	F0: > 12 sdf, însă se recomandă să nu se depășească 16 sdf
10. Numărul de organisme per duplicat	F0: 2 pești (pereche mascul și femelă); F1: Maxim 20 pești (ouă)/duplicat (produși din perechi de reproducție F0 și F1).
11. Număr de tratamente	5 tratamente chimice de testare plus martorii (martorul) adecvat (adecvați)
12. Numărul de duplicate per tratament	Minimum 6 duplicate pe tratament pentru o substanță chimică de testat și minim 12 duplicate pentru martor și pentru martorul tratat cu solvent, dacă se utilizează (numărul de duplicate este dublu în faza de reproducere în F1)
13. Numărul de organisme per test	Cel puțin 84 de pești în F0 și 504 în F1. (în cazul în care se utilizează un martor tratat cu solvent, atunci se utilizează 108 pești în F0 și 648 de pești în F1). Unitatea numărată este cea rezultată după eclozarea embrionilor.
14. Regimul de hrănire	Peștii sunt hrăniți cu creveți de saramură, *Artemia* spp., (nauplii de 24 de ore) *ad libitum*, hrana fiind suplimentată de un tip de hrană sub formă de fulgi disponibilă în comerț, dacă este necesar (un exemplu de program de hrănire prin care să se asigure o creștere și o dezvoltare adecvate pentru a sprijini o reproducere sigură se găsește în apendicele 5).
15. Aerarea	Nu există, cu excepția cazului în care oxigenul dizolvat se apropie de < 60 % din valoarea de saturație în aer
16. Apa de diluție	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată.

17. Perioadă de expunere	În primul rând, 19 săptămâni (incubație de la F0 la F2)
18. Puncte finale biologice (primare)	Capacitate de eclozare (F1 și F2); rata de supraviețuire [F1, de la eclozare la 4 sdf (sfârșitul etapei larvare/începutul etapei de pești tineri), de la 4 la 9 (sau 10) sdf (de la începutul etapei de pești tineri la etapa de subadulți) și de la 9 la 15 sdf (de la etapa de subadulți la încheierea etapei de adulți)]; creștere (F1, lungime și greutate la 9 și 15 sdf); caracteristici sexuale secundare (F1, papilele înotătoarelor anale la 9 și 15 sdf); vitelogenină (F1, valoarea mRNA a *vtg* sau proteina VTG la 15 sdf); sexul fenotipic (F1, prin histologia gonadelor, la 15 sdf); reproducere (F0 și F1, fecunditate și fertilitatea timp de 21 de zile); timp până la depunere (F1); și histopatologia (F1, gonadă, ficat și rinichi la 15 sdf)
19. Criterii de validitate a testului	Oxigen dizolvat de ≥ 60 % din valoarea saturației aerului; temperatura medie a apei de 24-26°C pe parcursul testului; reproducerea cu succes a unui procent de ≥ 65 % dintre femelele din soluțiile (soluția) martor; fecunditatea medie zilnică ≥ 20 de ouă la martor(i); capacitatea de eclozare ≥ 80 % (în medie) la martori (la fiecare dintre generațiile F1 și F2); supraviețuirea după eclozare până la 3 sdf ≥ 80 % (în medie) și de la 3 sdf până la încheiere pentru generația ≥ 90 % (în medie) la martori (F1), concentrațiile substanței chimice de testat în soluție ar trebui menținute în mod satisfăcător în intervalul ± 20 % din valorile medii măsurate.

Apendicele 4

ORIENTĂRI PRIVIND VALORILE TIPICE ALE MARTORILOR

Ar trebui remarcat faptul că aceste valori ale martorilor se bazează pe un număr limitat de studii de validare și pot face obiectul unor modificări în lumina experienței viitoare.

Creștere

Sunt efectuate măsurători de greutate și de lungime pentru toți peștii eșantionați la 9 (sau 10) și la 15 săptămâni după fertilizare (sdf). Acest protocol va genera valori preconizate de greutate umedă, la 9 sdf, de 85-145 mg la masculi și 95-150 mg la femele. Valorile preconizate de greutate, la 15 sdf, sunt de 250-330 mg la masculi și de 280-350 mg la femele. Deși pot exista abateri semnificative de la aceste intervale pentru fiecare pește, valorile medii ale greutăți care se află în mod semnificativ în afara acestor intervale, în special cele mai scăzute, ar sugera probleme legate de hrănire, controlul temperaturii, calitatea apei, boli sau orice combinație a acestor factori.

Eclozare

Reușita eclozării la martori este, de regulă, de aproximativ 90 %, însă valorile scăzute precum 80 % nu sunt rare. Reușita eclozării sub 75 % poate indica agitarea insuficientă a ouălor în curs de dezvoltare sau atenția necorespunzătoare la manipularea ouălor, cum ar fi lipsa eliminării în timp util a ouălor moarte, ceea ce conduce la o infestare fungică.

Supraviețuire

Ratele de supraviețuire până la 3 sdf de la eclozare și după 3 sdf sunt, de regulă, de 90 % sau mai mult în cazul martorilor, dar ratele de supraviețuire reduse în primele stadii de viață, de 80 % în cazul martorilor, nu sunt alarmante. Ratele de supraviețuire în cazul martorilor care nu depășesc 80 % ar fi motive de îngrijorare și pot indica o curățare insuficientă a acvariilor, ceea ce determină pierderi de pești larvari prin îmbolnăvire sau sufocare din cauza nivelurilor scăzute de oxigen dizolvat. Mortalitatea poate să apară, de asemenea, ca urmare a unei vătămări în timpul curățării bazinului și prin pierderea de pești larvari în sistemul de evacuare al bazinului.

Gena vitelogenină

Deși nivelurile absolute ale genei *vitelogenine* (*vtg*) care sunt exprimate ca și copii/ng din totalul mRNA, pot varia semnificativ între laboratoare din cauza procedurilor sau a aparatelor utilizate, procentul *vtg* ar trebui să fie de aproximativ 200 de ori mai mare la femelele din soluția martor față de masculii din soluția martor. Nu este neobișnuit ca acest procent să fie între 1 000 și 2 000; însă procentele mai mici de 200 sunt suspecte și pot indica probleme legate de contaminarea probelor sau probleme legate de procedura și/sau reactivii utilizați.

Caracteristici sexuale secundare

Pentru masculi, intervalul normal al caracteristicilor sexuale secundare, definit ca fiind numărul total de segmente în radiile papilelor înotătoarelor anale, este de 40-80 de segmente la 9-10 sdf. Până la 15 sdf, intervalul pentru masculii din soluția martor ar trebui să fie în jur de 80-120 și 0 pentru femelele din soluția martor. Din motive neexplicate, în cazuri rare, unii masculi nu dezvoltă papile până la împlinirea a 9 sdf dar, întrucât toți masculii din soluția martor dezvoltă papile până la împlinirea a 15 sdf, acest lucru se întâmplă, cel mai probabil, din cauza dezvoltării întârziate. Prezența papilelor la femelele din soluția martor indică prezența masculilor XX în populație.

Masculii XX

Incidența normală pe fond a masculilor XX în cultură pare a fi de aproximativ 4 % sau mai puțin la 25 °C, aceasta crescând odată cu creșterea temperaturii. Ar trebui să se ia măsuri pentru a se reduce la minim proporția de masculi XX în populație. Întrucât incidența masculilor XX pare să aibă o componentă genetică și, prin urmare, este ereditară, monitorizarea stocul de cultură și asigurarea că masculii XX nu sunt utilizați pentru a propaga stocul de cultură reprezintă un mijloc eficient de a reduce incidența masculilor XX în populație.

Activitatea de depunere a ouălor

Activitatea de depunere a ouălor în duplicatele martor ar trebui monitorizată zilnic înainte de evaluarea fecundității. Perechile din soluția martor pot fi evaluate din punct de vedere calitativ vizual pentru a obține dovezi privind activitatea de depunere a icrelor. Până la împlinirea a 12-14 sdf, majoritatea perechilor din soluția martor ar trebui să depună icre. Numărul redus de perechi de depunere a icrelor până la împlinirea acestei perioade indică existența unor posibile probleme legate de sănătatea, maturitatea sau bunăstarea peștilor.

Fecunditate

Peștii metaka sănătoși și bine hrăniți depun icre zilnic până la împlinirea perioadei de 12-14 sdf, producând între 15 și 50 de icre pe zi. În ceea ce privește producția de icre, 16 din cele 24 perechi de reproducere din soluția martor recomandate (> 65 %) ar trebui să producă mai mult de 20 de icre per pereche pe zi, putând ajunge până la aproximativ 40 de icre pe zi. O cantitate mai mică decât aceasta poate indica perechi de reproducție imature, malnutrite sau nesănătoase.

Fertilitate

Procentul de icre fertile pentru perechile de reproducere din soluția martor este, de regulă, situat în intervalul de 90 %, fiind frecvente valorile medii și cele superioare până la 90 %. Ratele de fertilitate mai mici de 80 % pentru icrele din soluția martor sunt suspecte și pot indica fie indivizi nesănătoși, fie condiții de cultură mai puțin ideale.

Apendicele 5

UN EXEMPLU DE PROGRAM DE HRĂNIRE

Un exemplu de program de hrănire pentru a asigura o creștere și dezvoltare adecvată în vederea susținerii unei reproduceri fiabile este prezentat în tabelul 1. Abaterile de la acest program de hrănire pot fi acceptabile, dar se recomandă ca acestea să fie testate pentru a se verifica dacă se respectă condiția de creștere și reproducere acceptabilă. Pentru a respecta programul de hrănire sugerat, înainte de începerea testului trebuie să se determine greutatea uscată a creveților în saramură pe volum de dejecții ale creveților respectivi. Acest lucru se poate realiza prin cântărirea unui volum definit de dejecții de creveți în saramură care au fost uscate timp de 24 de ore la 60 °C pe un recipient cântărit în prealabil. Pentru a ține seama de greutatea sărurilor din dejecții, un volum identic de aceeași soluție salină utilizată în dejecții ar trebui să fie, de asemenea, uscat, cântărit și scăzut din greutatea dejecțiilor în saramură uscate. În mod alternativ, crevețiii în saramură pot fi filtrați și clătiți cu apă distilată înainte de uscare, eliminând astfel necesitatea de a măsura greutatea unui „corp de sare”. Aceste informații sunt utilizate pentru a transforma informațiile din tabel din greutate uscată de creveți în saramură în volum de dejecții ale creveților în saramură utilizate individual ca hrană pentru pești. În plus, se recomandă ca părțile alicote din dejecțiile creveților în saramură să fie cântărite săptămânal pentru a se verifica greutatea uscată corectă a creveților în saramură utilizați ca hrană.

Tabelul 1

Exemplu de program de hrănire

Timp (după eclozare)	Creveți în saramură (greutate uscată în mg/pește/zi)
Ziua 1	0,5
Ziua 2	0,5
Ziua 3	0,6
Ziua 4	0,7
Ziua 5	0,8
Ziua 6	1,0
Ziua 7	1,3
Ziua 8	1,7
Ziua 9	2,2
Ziua 10	2,8
Ziua 11	3,5
Ziua 12	4,2
Ziua 13	4,5

Timp (după eclozare)	Creveți în saramură (greutate uscată în mg/pește/zi)
Ziua 14	4,8
Ziua 15	5,2
Zilele 16-21	5,6
Săptămâna 4	7,7
Săptămâna 5	9,0
Săptămâna 6	11,0
Săptămâna 7	13,5
Săptămâna 8-sacrificare	22,5

Apendicele 6

Exemple de Cameră de Incubație a Icrelor

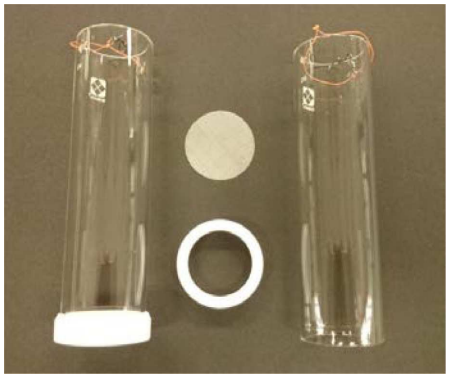
Exemplul A





Acest incubator este format dintr-o eprubetă de centrifugă din sticlă secționată transversal, care este conectată printr-un manșon din oțel inoxidabil și fixată cu capacul cu filet al centrifugei. O eprubetă mică din sticlă sau din oțel inoxidabil este proiectată prin capac și este poziționată în apropierea părții inferioare rotunjite, formând ușor bule de aer pentru a suspenda icrele și pentru a reduce transmiterea între icre a infecțiilor saprofite fungice, facilitând totodată schimbul de substanțe chimice între incubator și rezervorul de păstrare.

Exemplul B





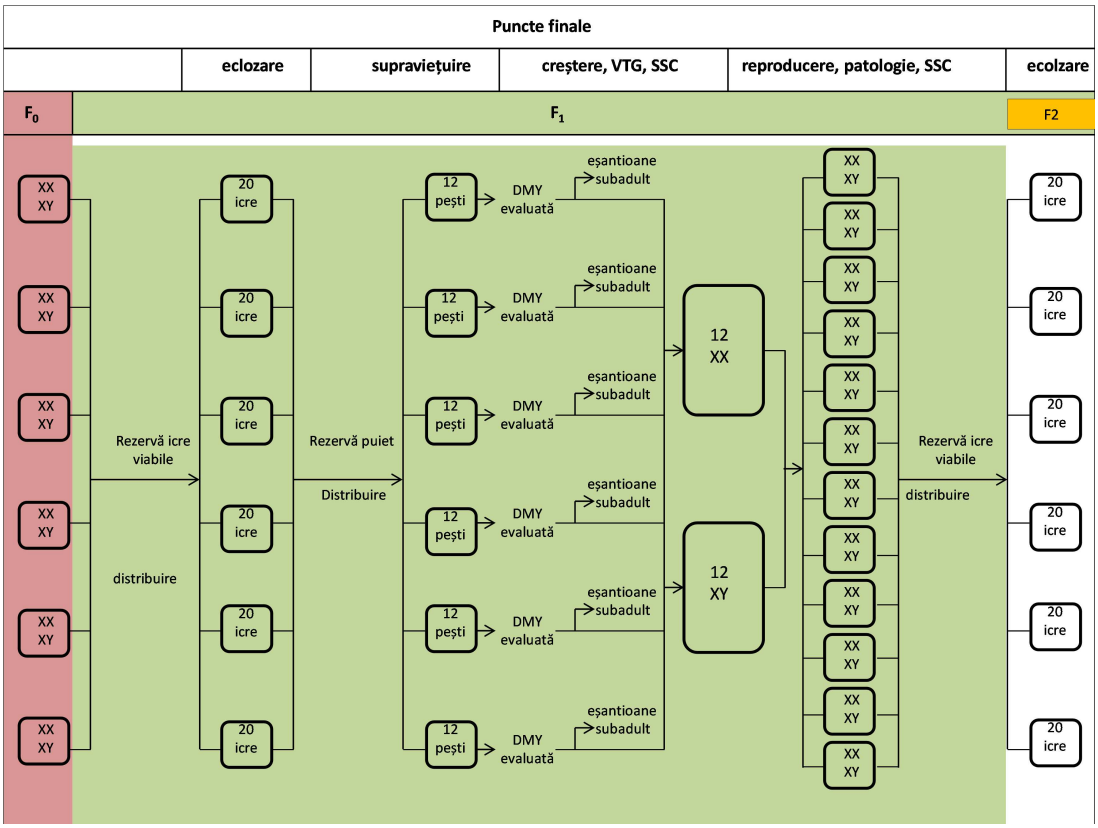
Acest incubator este format dintr-un corp cilindric din sticlă (cu diametru de 5 cm și înălțime de 10 cm) și dintr-o plasă metalică din oțel inoxidabil (0,25 φ și ochiul de plasă de 32) care este prinsă de partea inferioară a corpului cu un inel PTFE. Incubatoarele sunt suspendate de la bara de ridicare la bazine și se agită vertical (o amplitudine de aproximativ 5 cm) într-un ciclu corespunzător (aproximativ o dată la 4 secunde) pentru icrele de medaka.

Apendicele 7

SCHEMA GRUPĂRII ȘI POPULĂRII DUPLICATELOR PE PARCURSUL METODEI DE TESTARE MEOGRT

Figura 1

Gruparea și repopularea duplicatelor pe parcursul metodei MEOGRT. Cifra reprezintă un tratament sau ½ dintr-o soluție martor. Datorită grupării, identitatea duplicatelor nu este continuă pe parcursul testului. Este de precizat faptul că termenul „icre” se referă la icre viabile, fertilizate (echivalente cu embrioni).



Tratamente și duplicare.

Metoda de testare recomandă cinci tratamente cu substanțe chimice de testat utilizând material tehnic de calitate și un martor negativ. Numărul duplicatelor per tratament nu rămâne constant pe parcursul testului MEOGRT, iar numărul duplicatelor în tratamentul cu soluție martor este dublu față de orice tratament cu o substanță chimică de testat. La generația F0, fiecare tratament cu substanțe chimice de testat are șase duplicate, iar tratamentul cu martor negativ are 12 duplicate. Recomandăm în mod insistent să nu se folosească solvenți, iar în caz contrar, în raportul MEOGRT ar trebui să se prezinte o justificare atât pentru utilizarea unui solvent, cât și pentru alegerea solventului. De asemenea, dacă se utilizează un solvent, sunt necesare două tipuri de martori: a) un martor tratat cu solvent și b) un martor negativ. Aceste două grupuri de martori ar trebui să cuprindă fiecare o rezervă completă de duplicate în toate punctele perioadei de desfășurare a testului MEOGRT. Pe parcursul dezvoltării organismelor supuse testării din generația F1 (și F2, până la eclozare), această structură de duplicate rămâne aceeași. Însă, în stadiul de adult, atunci când se constituie perechile de reproducere în F1, numărul perechilor duplicat de reproducere pentru fiecare tratament se dublează în mod optim; prin urmare, există maxim 12 perechi de duplicate în cadrul fiecărui tratament cu substanțe chimice de testat și 24 de perechi de duplicate în grupul de martori (și alte 24 de perechi de duplicate în martorul tratat cu solvent, dacă este necesar). Momentul ecloziunii la embrionii depuși de perechile din F1 se determină pe aceeași structură de duplicate ca și în cazul embrionilor depuși de perechile din F0, ceea ce înseamnă inițial șase duplicate pentru fiecare tratament cu substanță chimică și 12 duplicate în grupul (grupurile) cu martori.

Apendicele 8

NUMĂRAREA PAPILELOR ÎNOTĂTOAREI ANALE

Materiale și reactivi principali

— Microscop de disecție (cu cameră video atașată opțional)

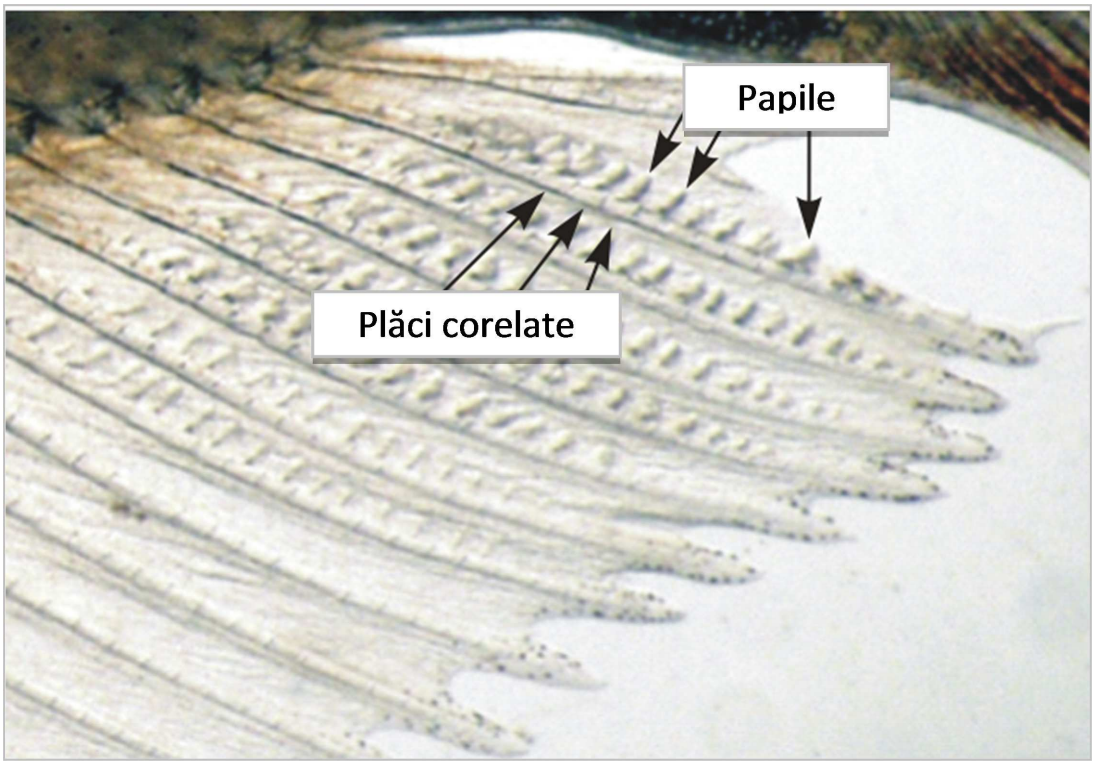
— Fixator [de exemplu, Davidson's (Bouin's nu este recomandat)], dacă numărătoarea nu este efectuată din imagine

Proceduri

După necropsie, înotătoarea anală ar trebui să fie procesată imagistic pentru a permite numărarea convenabilă a papilele înotătoarelor anale. Chiar dacă procesarea imagistică este metoda recomandată, înotătoarea anală poate fi fixată cu fixator Davidson's sau cu un alt fixator adecvat timp de aproximativ 1 minut. Este important ca înotătoarea anală să fie menținută la nivel plan în timpul fixării pentru a permite numărarea mai ușoară a papilelor. Carcasa cu înotătoarea anală poate fi păstrată în fixatorul Davidson's sau în alt fixator adecvat până la analiză. Se numără plăcile comune (a se vedea **figura 1**) cu papile care ies în afară din marginea posterioară a plăcii comune.

Figura 1

(Papila înotătoarei anale)



Apendicele 9

CALENDARUL DETALIAT AL MEOGRT

Săptămânile de testare 1-3 (F0)

Peștii reproducători din generația F0, care au îndeplinit criteriile de selecție (a se vedea punctele 16-20) sunt expuși timp de trei săptămâni pentru a permite gameților și țesuturilor gonadale în curs de dezvoltare să fie expuse la substanța chimică de testat. Fiecare bazin duplicat găzduiește o singură pereche de pești de reproducere (pereche de reproducere cu femelă XX-mascul XY). Ouăle depuse sunt colectate, numărate și evaluate pentru fertilitate timp de 21 de zile consecutiv, începând cu ziua de testare 1.

Săptămâna de testare 4 (F0 și F1)

Este preferabil ca icrele (embrionii) fecundate (fecundați) și viabile (viabili) să fie colectate într-o singură zi; însă, în cazul în care nu există suficienți embrioni, embrionii pot fi colectați pe parcursul a două zile. Dacă au fost colectați timp de două zile, toți embrionii din cadrul tratamentelor care au fost colectați în prima zi sunt grupați cu cei colectați în a doua zi. Apoi toți embrionii grupați pentru fiecare tratament sunt distribuiți în mod aleatoriu în fiecare dintre incubatoarele duplicate la 20 de embrioni per incubator. Mortalitatea icrelor fertilizate (embrionilor) este verificată și înregistrată zilnic. Icrele moarte sunt scoase din incubatoare (moartea la icrele fertilizate poate fi reprezentată, în special în stadiile incipiente, printr-o pierdere semnificativă a transluciditățiși schimbarea coloraței din cauza coagulării și/sau a precipitării proteinelor, rezultând un aspect alb-opac; OCDE 2010).

Notă: În cazul în care un singur tratament necesită o a doua zi de colectare, toate tratamentele (inclusiv martorii) trebuie să urmeze această procedură. În cazul în care, după cea de a doua zi de colectare, există un număr insuficient de embrioni în cadrul unui tratament pentru a încărca 20 de embrioni per incubator, se reduce numărul de embrioni încărcați în cadrul respectivului tratamentului specific la 15 embrioni per incubator. Dacă nu există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator, se reduce numărul de incubatoare duplicate până când există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator. În plus, în generația F0 ar putea fi adăugate mai multe perechi de reproducere pentru fiecare tratament și martori pentru a produce mai multe icre astfel încât să se ajungă la numărul recomandat de 20 de icre per duplicat.

În ziua de testare 24, perechile de reproducere din F0 sunt eutanasiate și se înregistrează greutatea și lungimea. Dacă este necesar, perechile de reproducere din F0 pot fi păstrate pentru o perioadă suplimentară de 1-2 zile pentru reînceperea F1.

Săptămânile de testare 5-6 (F1)

Cu una până la două zile înainte de data anticipată a începerii eclozării, se oprește sau se reduce agitarea icrelor aflate în faza de incubație pentru a accelera eclozarea. Pe măsură ce embrionii eclozează în fiecare zi, larvele sunt grupate prin intermediul tratamentului și distribuite în mod sistematic în fiecare bazin cu duplicate larvare în cadrul unui anumit tratament, care conține maxim 12 larve. Acest lucru se realizează prin selectarea aleatorie a larvelor și plasarea unei singure larve în duplicate succesive, în urma unei extrageri nediscriminatorii, trecând în ordine prin duplicatele de tratament specifice până când toate duplicatele din cadrul tratamentului au 12 icre. În cazul în care nu există suficiente larve pentru a umple toate duplicatele, se asigură faptul că există cât mai multe duplicate cu 12 larve pentru a începe faza F1.

Icrele fertilizate care nu au eclozat până în perioada echivalentă cu dublul zilei mediane a incubației din martor se consideră neviabile și sunt eliminate. Se înregistrează numărul larvelor și se calculează reușita eclozării (capacitatea de eclozare) la fiecare duplicat.

Săptămânile de testare 7-11 (F1)

Se verifică și se înregistrează zilnic supraviețuirea peștilor larvari în toate duplicatele. În ziua de testare 43, se înregistrează numărul de pești supraviețuitori din fiecare duplicat, precum și numărul inițial de larve introduse în duplicat (nominal douăsprezece). Acest lucru permite calcularea ratei de supraviețuire de la eclozare la etapa de subadult.

Săptămâna de testare 12 (F1)

În ziua de testare 78-85, este prelevată o probă mică din înotătoarea caudală a fiecărui pește pentru a determina sexul genotipic al individului (și anume, tăierea înotătoarelor) pentru toți peștii. Aceste informații sunt utilizate pentru a stabili perechi de reproducere.

În termen de trei zile de la determinarea sexului genotipic al fiecărui pește, se stabilesc în mod aleatoriu 12 perechi de reproducere pentru fiecare tratament și 24 de perechi pentru fiecare martor. Se selectează în mod aleatoriu și apoi se grupează după sex doi pești XX și XY din fiecare duplicat, iar apoi dintre aceștia se selectează în mod aleatoriu pești pentru a stabili o pereche de reproducere (de exemplu, perechea XX-XY). Se stabilesc minim 12 replici per tratament chimic și minim 24 de duplicate pentru martor cu o pereche de reproducere pentru fiecare duplicat. În cazul în care un duplicat nu are doi pești XX sau doi pești XY disponibili pentru grupare, atunci ar trebui să se obțină pești cu genotipul de gen adecvat din alte duplicate în cadrul tratamentului.

Restul de pești (maximum 8 pești per duplicat) sunt eutanasiați și supuși prelevării de probe pentru diferite puncte finale ale subadulților. Datele *dmy* (XX sau XY) pentru toate probele de subadulți sunt reținute pentru a se asigura că toate datele privind punctele finale pot fi asociate cu sexul genetic al fiecărui pește.

Săptămânile de testare 13-14 (F1)

Expunerea continuă pe măsură ce perechile de reproducere subadulte devin adulți. În ziua de testare 98 (și anume, ziua dinaintea începerii colectării icrelor), icrele sunt eliminate atât din acvarii, cât și din femele.

Săptămânile de testare 15-17 (F1)

Icrele eclozate sunt colectate zilnic timp de 21 de zile consecutiv în fiecare duplicat și evaluate pentru fecunditate și fertilitate.

Săptămâna de testare 18 (repetarea săptămânii de testare 4) (F1 și F2)

În ziua de testare 120, se colectează icre din fiecare bazin duplicat dimineața. Icrele colectate sunt evaluate, iar icrele fertilizate (cu filamentele eliminate) de la fiecare pereche de reproducere sunt grupate pe tratamente și distribuite sistematic în camerele de incubare a icrelor, fiind introduse 20 de icre fertilizate în fiecare incubator. Incubatoarele pot fi introduse în „bazine incubatoare" separate constituite pentru fiecare tratament sau în bazinul duplicat care, în momentul eclozării, va conține larvele eclozate. Este preferabil ca embrionii să fie colectați într-o singură zi; însă, dacă nu există suficienți embrioni, embrionii pot fi colectați pe parcursul a două zile. Dacă au fost colectați timp de două zile, toți embrionii din cadrul tratamentelor care au fost colectați în prima zi sunt grupați cu cei colectați în a doua zi. Apoi toți embrionii grupați pentru fiecare tratament sunt distribuiți în mod aleatoriu în fiecare dintre incubatoarele duplicate la 20 de embrioni per incubator. Notă: În cazul în care un singur tratament necesită o a doua zi de colectare, toate tratamentele (inclusiv martorii) trebuie să urmeze această procedură. În cazul în care, după cea de a doua zi de colectare, există un număr insuficient de embrioni în cadrul unui tratament pentru a încărca 20 de embrioni per incubator, se reduce numărul de embrioni încărcați în cadrul respectivului tratamentului specific la 15 embrioni per incubator. Dacă nu există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator, se reduce numărul de incubatoare duplicate până când există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator.

În ziua de testare 121 (sau ziua de testare 122, pentru a se asigura un bun început pentru F2), perechile de reproducere F1 sunt eutanasiate și analizate pentru punctele finale la adulți. Dacă este necesar, perechile de reproducere din F1 pot fi păstrate pentru o perioadă suplimentară de 1-2 zile pentru reînceperea F2.

Săptămânile de testare 19-20 (F2)

Cu una până la două zile înainte de data anticipată a începerii eclozării, se oprește sau se reduce agitarea icrelor aflate în faza de incubație pentru a accelera eclozarea. În cazul în care testul se încheie prin finalizarea procesului de eclozare la generația F2, larvele sunt numărate și eliminate în fiecare zi. Embrionii care nu au eclozat după un timp de incubație prelungit, definit ca fiind de perioada echivalentă dublului zilei medii de eclozare în martor, sunt considerate neviabile).

Apendicele 10

ANALIZA STATISTICĂ

Tipurile de date biologice generate în cadrul MEOGRT nu sunt unice și, cu excepția datelor privind patologia, au fost elaborate multe metodologii statistice adecvate pentru analiza corespunzătoare a datelor similare în funcție de caracteristicile datelor, inclusiv normalitatea, omogenitatea variației, dacă proiectul studiului se pretează la testarea ipotezei sau la analiza regresiei, la testele parametrice comparativ cu cele neparametrice etc. Ca și principiu general, analizele statistice sugerate respectă recomandările OCDE pentru datele privind ecotoxicitatea (OCDE 2006), iar în figura 2 se poate observa o diagramă decizională pentru analiza datelor MEOGRT.

Se presupune că, de cele mai multe ori, seturile de date vor afișa răspunsuri monotone. În plus, ar trebui să fie luată în considerare problema utilizării unui test statistic unidirecțional, față de un test statistic bidirecțional. Cu excepția cazului în care există un raționament biologic care ar indica faptul că testul unidirecțional este inadecvat, se recomandă utilizarea testelor unidirecționale. Chiar dacă următoarea secțiune recomandă anumite teste statistice, dacă sunt elaborate metode statistice mai adecvate și/sau mai puternice pentru a fi aplicate în cazul datelor specifice generate în MEOGRT, aceste teste statistice ar fi utilizate pentru a valorifica aceste avantaje.

Datele MEOGRT ar trebui analizate separat pentru fiecare sex genotipic. Există două strategii de analiză a datelor de la peștii cu sex inversat (fie masculi XX, fie femele XY). 1) Se cenzurează toate datele de la peștii cu sexul inversat pe parcursul întregului test, cu excepția prevalenței sexului inversat din fiecare duplicat. 2) Datele de la toți peștii cu sexul inversat sunt lăsate în setul de date și analizate pe baza genotipului.

Date privind histopatologia

Datele privind histopatologia sunt raportate ca punctaje de severitate care sunt evaluate cu ajutorul unei proceduri statistice nou dezvoltate, și anume Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). Ajustarea *Rao-Scott* reține informații privind replicarea testului; procedura *by Slices* integrează așteptarea biologică conform căreia punctajele de severitate tind să crească odată cu creșterea concentrațiilor de tratament. Pentru fiecare diagnostic, datele de ieșire RSCABS specifică tratamentele cu o prevalență mai mare a patologiei decât martorii și gradul de severitate aferent.

Date privind fecunditatea

Analizele pentru datele privind fecunditatea constau într-un test de tip „step-down” Jonckheere-Terpstra sau Williams pentru determinarea efectelor tratamentului, cu condiția ca datele să fie consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă. Cu un test de tip „step-down”, toate comparațiile se realizează la nivelul de semnificație de 0,05 și fără ajustare pentru numărul comparațiilor realizate. Datele sunt prevăzute a fi consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă, dar acest lucru poate fi verificat fie prin inspecția vizuală a datelor, fie prin construirea de contraste liniare și pătratice ale mijloacelor de tratare, după o transformare a datelor prin clasificare. Cu excepția cazului în care contrastul pătratic este semnificativ și contrastul liniar nu este semnificativ, se efectuează testul tendinței. În caz contrar, se utilizează testul Dunnett pentru determinarea efectelor tratării dacă datele sunt distribuite în mod normal cu variații omogene. În cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite, se utilizează testul Dunn cu o ajustare Bonferonni-Holm. Toate testele indicate sunt efectuate independent de orice test global F- sau Kruskal-Wallis. Mai multe detalii sunt furnizate în OCDE 2006.

Pot fi utilizate metode alternative, cum ar fi un model liniar generalizat cu erori Poisson pentru numărarea icrelor (fără transformare), dacă acestea sunt justificate din punct de vedere statistic (Cameron și Trividi, 2013). Se recomandă un aviz statistic dacă se utilizează o metodă alternativă.

Numărarea zilnică a icrelor în cadrul unei generații unice

Modelul ANOVA este dat de Y = timp*timp + tratament + *tratament + timp*tratament + *timp*tratament, cu efecte aleatorii ale duplicatului (generare*tratament) și timp*duplicat (tratament), permițând existența unor componente inegale ale variației pentru ambele tipuri de la o generație la alta. Aici, timpul se referă la frecvența numărării ouălor (de exemplu, zi sau săptămână). Aceasta este o analiză a măsurilor repetate, stabilindu-se corelații între observații cu privire la aceleași duplicate, care reprezintă natura măsurilor repetate a datelor.

Efectele principale ale tratamentului sunt testate folosind testul Dunnett (sau Dunnett-Hsu), care se ajustează în funcție de numărul de comparații. Se impun ajustări pentru efectul principal al generației sau timpului, deoarece, cu acești doi factori, nu există niciun nivel de „control” și fiecare pereche de niveluri reprezintă o comparație a interesului posibil. Pentru aceste două efecte principale, dacă testul F pentru efectul principal este semnificativ la nivelul de 0,05, atunci se pot testa comparații pe perechi între niveluri ale factorului respectiv la nivelul de 0,05 fără ajustări suplimentare.

Modelul include interacțiuni cu două și trei factori, astfel încât, de exemplu, un efect principal, de pildă pentru timp, să nu poată fi semnificativ chiar dacă timpul are un impact semnificativ asupra rezultatelor. Astfel, în cazul în care o interacțiune cu doi sau trei factori care implică timp este semnificativă la nivelul de 0,05, atunci se pot accepta comparațiile nivelurilor de timp la nivelul de semnificație de 0,05, fără o ajustare ulterioară.

Următoarele sunt testele F pentru semnificația tratamentului în intervalul de timp, așa-numitele fragmente din tabelul ANOVA. În cazul în care, fragmentul pentru tratament din F1 și timpul 12 este semnificativ la nivelul de 0,05, atunci comparațiile pe perechi pentru tratament din cadrul F1 și timpul 12 pot fi acceptate fără ajustări ulterioare. Afirmații similare sunt valabile în cazul testelor pentru timp în F1 și tratament, precum și pentru generație într-un interval de timp și tratament.

În cele din urmă, pentru comparații care nu se încadrează în niciuna dintre categoriile de mai sus, comparațiile ar trebui realizate folosind ajustarea Bonferroni-Holm la valorile p. Informații suplimentare privind analizele unor astfel de modele se găsesc în Hocking (1985) și în Hochberg și Tamhane (1987).

În mod alternativ, datele brute sunt înregistrate și prezentate în raportul privind studiul ca și fecunditate (număr de icre) per duplicat pentru fiecare zi. Ar trebui să se calculeze media duplicată a datelor brute, după care să se aplice transformarea la rădăcină pătrată. Ar trebui să se calculeze ANOVA unidirecțională pe mediile duplicate transformate, apoi contrastele. De asemenea, poate fi util să se inspecteze vizual datele despre fecunditate pentru fiecare tratament și/sau duplicat cu ajutorul unei diagrame cu puncte care afișează date în timp. Acest lucru va permite o evaluare informală a efectelor potențiale în timp.

Toate celelalte date biologice

Analizele statistice se bazează pe ipoteza subiacentă că, printr-o selecție corectă a dozei, datele vor fi monotonice. Astfel, se presupune că datele sunt monotonice și sunt evaluate în mod formal pentru monotonicitate prin utilizarea unor contraste liniare și pătratice. În cazul în care datele sunt monotonice, se recomandă un test Jonckheere-Terpstra asupra tendinței mediilor duplicate (astfel cum a fost recomandat în OCDE 2006). În cazul în care contrastul pătratic este semnificativ și contrastul liniar nu este semnificativ, datele sunt considerate a fi non-monotonice.

În cazul în care datele sunt non-monotonice, în special din cauza răspunsului redus al celui mai puternic sau al primelor două cele mai puternice tratamente, ar trebui să se aibă în vedere cenzurarea setului de date astfel încât analiza să se facă fără aceste tratamente. Această decizie va trebui luată pe baza raționamentului profesional și a tuturor datelor disponibile, în special a celor care indică toxicitate evidentă la respectivele niveluri de tratament.

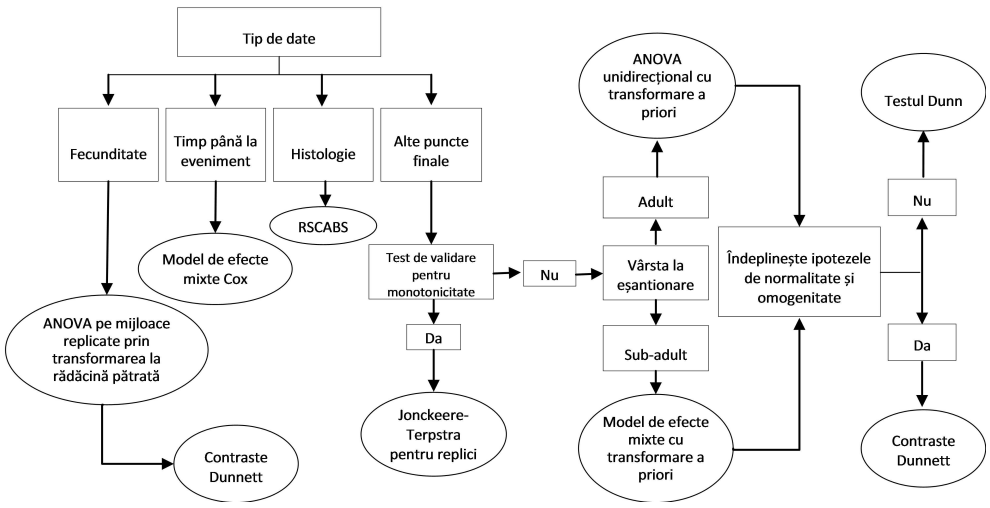
În cazul greutății și al lungimii, nu se recomandă transformări, deși acestea ar putea fi uneori necesare. Însă se recomandă o transformare la nivelul log în cazul datelor privind vitelogenina; pentru datele SSC se recomandă o transformare la nivelul rădăcinii pătrate (papila înotătoarei anale); se recomandă o transformare a valorii arcsin-rădăcină pătrată pentru datele privind proporția eclozării, procentul de supraviețuire, raportul de gen și procentul icrelor fertile. Timpul pentru eclozare și timpul pentru prima depunere ar trebui să fie considerați drept interval până la datele evenimentelor, iar embrionii individuali neeclozați în perioada stabilită sau duplicatele care nu eclozează niciodată sunt tratate drept date cenzurate de drept. Timpul până la eclozare ar trebui să fie calculat din ziua mediană a eclozării la fiecare duplicat. Aceste puncte finale ar trebui să fie analizate cu ajutorul unui model de pericol proporțional Cox cu efecte mixte.

Datele biologice provenite de la probele de adulți prezintă o singură măsurătoare per duplicat, și anume, există un pește XX și un pește XY per acvariu duplicat. Prin urmare, se recomandă efectuarea unui test ANOVA unidirecțional pe mediile duplicate. În cazul în care sunt îndeplinite ipotezele ANOVA (normalitatea și omogenitatea variației, astfel cum au fost evaluate pe valorile reziduale ale ANOVA prin testul Shapiro-Wilks și, respectiv, Levene), ar trebui să se utilizeze contrastele Dunnett pentru determinarea tratamentelor diferite de martor. Pe de altă parte, dacă ipotezele ANOVA nu sunt îndeplinite, atunci ar trebui să se efectueze un test Dunn pentru a stabili tratamentele care au fost diferite de martor. Se recomandă o procedură similară pentru datele care sunt prezentate sub formă de procente (fertilitate, eclozare și supraviețuire).

Datele biologice obținute din probele subadulte prezintă între 1 și 8 măsurători per duplicat, și anume, pot exista numere variabile de indivizi care contribuie la media duplicatului pentru fiecare sex genotipic. Prin urmare, se recomandă utilizarea unui model ANOVA cu efecte mixte și apoi a contrastelor Dunnett în cazul în care au fost adeverite ipotezele de normalitate și de omogenitate a variației (pe valorile reziduale ale efectelor mixte ANOVA). Dacă acestea nu s-au adeverit, ar trebui să fie efectuat un test Dunn pentru a stabili tratamentele care au fost diferite de martor.

Figura 2

Diagramă pentru procedurile statistice recomandate pentru analiza datelor MEOGRT.



Referințe bibliografice

(1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC și Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y și Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 TESTUL PRIVIND CREȘTEREA ȘI DEZVOLTAREA LARVELOR DE AMFIBIENI (LAGDA)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 241 (2015). Necesitatea de a dezvolta și de a valida un test care poate să identifice și să caracterizeze consecințele adverse ale expunerii la substanțe chimice toxice la amfibieni apare ca urmare a preocupărilor privind faptul că nivelurile substanțelor chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât la oameni, cât și la animale. Orientarea OCDE privind testarea din Testul cu privire la creșterea și dezvoltarea larvelor de amfibieni (LAGDA) descrie un test de toxicitate la o specie de amfibieni, care analizează creșterea și dezvoltarea, de la fertilizare la începutul perioadei juvenile. Este un test (de regulă, 16 săptămâni) care evaluează dezvoltarea timpurie, metamorfoza, supraviețuirea, creșterea și maturizarea parțială a sistemului de reproducere. Aceasta permite, de asemenea, măsurarea unei serii de alte puncte finale, care permite evaluarea prin diagnosticare a substanțelor chimice suspectate de a perturba sistemul endocrin (EDC) sau a altor tipuri de substanțe toxice pentru dezvoltare și reproducere. Metoda descrisă în această metodă de testare constituie rezultatul activității de validare cu privire la broasca africană cu gheare (*Xenopus laevis*), care a fost desfășurată de Agenția SUA pentru protecția mediului (U.S. EPA), și al activității de sprijin desfășurate în Japonia (1). Deși alte specii de amfibieni pot fi adaptate la un protocol de testare pentru creștere și dezvoltare, capacitatea de a determina sexul genetic constituind o componentă importantă, metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă de testare sunt aplicabile numai în cazul *Xenopus laevis*.

2. LAGDA servește drept test de nivel superior asupra unui amfibian pentru colectarea de informații mai cuprinzătoare despre concentrație-răspuns cu privire la efectele adverse adecvate pentru a fi utilizate în identificarea și caracterizarea pericolelor, precum și în evaluarea riscurilor ecologice. Testul se încadrează la nivelul 4 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine, în cazul în care testele *in vivo* furnizează, de asemenea, date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante pentru sistemul endocrin (2). Modelul experimental general implică expunerea embrionilor *X. laevis* din etapele 8-10 din Nieuwkoop și Faber (NF) (3) la cel puțin patru concentrații diferite din substanța chimică de testat (în general, stabilite cel puțin la intervale demi-logaritmice) și martor(i) până la împlinirea a 10 săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF în martor, cu o probă secundară intermediară în etapa 62 din NF [≤ 45 după fertilizare; de regulă, în jurul a 45 de zile (zdf)]. În fiecare concentrație de testare există patru duplicate cu opt duplicate pentru martor. Punctele finale evaluate în timpul expunerii (la proba secundară intermediară și la proba finală la încheierea testului) includ respectivii indicatori ai toxicității generalizate: mortalitate, comportament anormal și determinări de creștere (lungime și greutate), precum și puncte finale concepute pentru caracterizarea unor moduri de acțiune specifice ale toxicității endocrine care vizează procesele fiziologice mediate de estrogen, androgen sau tiroidă. Metoda acordă atenție, în primul rând, efectelor potențiale relevante asupra populației (și anume, efectele adverse asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și dezvoltării reproductive) pentru calcularea unei concentrații la care nu se observă niciun efect (NOEC) sau a unei concentrații efective care provoacă o modificare × % (CEx) a punctului final măsurat. Deși ar trebui remarcat faptul că abordările CEx sunt rareori adecvate pentru astfel de studii ample, unde creșterea numărului de concentrații de testare pentru a permite determinarea CEx dorită ar putea să nu fie practică. De asemenea, ar trebui remarcat faptul că metoda nu acoperă faza de reproducere în sine. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

3. Din cauza numărului limitat de substanțe chimice testate și al laboratoarelor implicate în procesul de validare a acestui test destul de complex, în special reproductibilitatea între laboratoare nu este documentată cu date experimentale până la această dată, se prevede că, atunci când un număr suficient de studii sunt disponibile pentru a confirma impactul acestui nou model de studiu, orientarea 241 a OCDE privind testarea va fi analizată și, dacă este necesar, va fi revizuită în contextul experienței dobândite. LAGDA este un test important pentru a aborda potențiali factori care contribuie la declinul populației de amfibieni prin evaluarea efectelor expunerii la substanțele chimice în etapa larvară sensibilă, în care efectele asupra supraviețuirii și a dezvoltării, inclusiv a dezvoltării normale a organelor de reproducere, pot afecta negativ populațiile.

4. Testul este conceput pentru a detecta (un) efect(e) apical(e) ca urmare a mecanismelor endocrine și neendocrine și include puncte finale de diagnosticare care sunt parțial specifice principalelor modalități endocrine. Ar trebui remarcat faptul că până la elaborarea LAGDA nu a existat un test validat care să servească acestei funcții pentru amfibieni.

5. Înainte de începerea testului, este important să existe informații cu privire la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat, în special pentru a permite adoptarea de soluții chimice stabile. De asemenea, este necesar să existe o metodă analitică suficient de sensibilă pentru verificarea concentrațiilor substanțelor chimice de testat. Pe o durată de aproximativ 16 săptămâni, testul necesită un număr total de 480 de animale, și anume embrioni *X. laevis* (sau 640 de embrioni, în cazul în care se utilizează un martor solvent), pentru a asigura o putere suficientă a testului în vederea evaluării punctelor finale relevante precum creșterea, dezvoltarea și maturizarea sistemului de reproducere.

6. Înainte de utilizarea metodei de testare pentru testarea unui amestec în scopul reglementării, trebuie luat în considerare dacă aceasta va oferi rezultate acceptabile pentru procesul de reglementare prevăzut. În plus, această testare nu evaluează fecunditatea în mod direct, astfel încât aceasta nu poate fi aplicabilă pentru a fi utilizată într-un stadiu mai avansat decât nivelul 4 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine.

BAZA ȘTIINȚIFICĂ PENTRU METODA DE TESTARE

7. O mare parte din înțelegerea noastră actuală privind biologia amfibienilor a fost dobândită utilizând specia model de laborator *X. laevis*. Această specie poate fi cultivată în mod curent în laborator, ovulația poate fi indusă prin utilizarea gonadotropinei corionice umane (hCG), iar stocurile de animale sunt imediat disponibile la crescătorii de animale din comerț.

8. La fel ca la toate vertebratele, reproducerea la amfibieni este sub controlul axei gonadale pituitare hipotalamice (HPG) (4). Estrogenii și androgenii sunt mediatori ai acestui sistem endocrin, ghidând dezvoltarea și fiziologia țesuturilor dimorfice sexual. Există trei faze distincte în ciclul de viață al amfibienilor, când această axă este deosebit de activă: (1) o diferențiere gonadală în timpul dezvoltării larvelor, (2) dezvoltarea caracteristicilor sexuale secundare și maturizarea gonadală în faza juvenilă și (3) reproducerea funcțională a adulților. Fiecare dintre aceste trei ferestre de dezvoltare este susceptibilă de perturbare endocrină din cauza anumitor substanțe chimice precum estrogenii și androgenii, conducând în cele din urmă la o pierdere a capacității de reproducere a organismelor.

9. Gonadele încep să se dezvolte în etapa 43 din NF, atunci când se dezvoltă pentru prima dată creasta gonadală bipotențială. Diferențierea gonadelor începe în etapa 52 din NF, atunci când celulele germinale primare fie migrează spre țesutul tisular medular (masculi), fie rămân în regiunea corticală (femele) a gonadelor aflate în dezvoltare (3). Acest proces de diferențiere sexuală a gonadelor a fost raportată prima dată ca fiind susceptibil de a fi modificat chimic la *Xenopus* în anii 1950 (5) (6). Expunerea mormolocilor la estradiol în această perioadă de diferențiere a gonadelor duce la inversarea sexului la masculi care, atunci când ajung la vârsta adultă, sunt femele complet funcționale (7) (8). Inversarea funcțională a sexului femelelor în cel al masculilor este, de asemenea, posibilă și a fost raportată în urma implantării de țesut testicular la mormoloci (9). Însă, deși expunerea la un inhibitor al

aromatazei cauzează, de asemenea, inversarea funcțională a sexului la *X. tropicalis* (10), nu s-a demonstrat că aceasta apare la *X. laevis*. Din punct de vedere istoric, efectele substanțelor toxice asupra diferențierii gonadelor au fost evaluate prin examinarea histologică a gonadelor la metamorfoză, iar inversarea sexelor a putut fi determinată doar prin analizarea ratelor sexuale. Până de curând, nu a existat niciun mijloc de determinare directă a sexului genetic la *Xenopus*. Însă, o stabilire recentă a markerilor legați de sex la *X. laevis* permite determinarea sexului genetic și permite identificarea directă a animalelor cu sexul inversat (11).

10. La masculi, dezvoltarea juvenilă apare atunci când cresc nivelurile de testosteron din sânge, ceea ce corespunde dezvoltării caracteristicilor sexuale secundare, precum și dezvoltării testiculelor. La femele, estradiolul este produs de ovare, ducând la apariția vitelogeninei (VTG) în plasmă și a ovocitelor vitelogenice în ovar, precum și la dezvoltarea oviductelor (12). Oviductele reprezintă caracteristici sexuale secundare la femele, care funcționează în etapa de maturare a ovocitelor în timpul reproducerii. Ovocitele sunt acoperite cu un strat gelatinos atunci când trec prin oviduct și se colectează în ovisac, gata de fertilizare. Dezvoltarea oviductului pare a fi reglată de estrogeni întrucât dezvoltarea este corelată cu nivelurile de estradiol din sânge la *X. laevis* (13) și *X. tropicalis* (12). S-a raportat dezvoltarea oviductului la masculi în urma expunerii la compușii bifenili policlorurați (14) și 4-*terț*-octilfenol (15).

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Modelul experimental implică expunerea embrionilor *X. laevis* din etapele 8-10 din NF, pe calea apei, la cel puțin patru concentrații diferite din substanța chimică de testat și martor(i) până la împlinirea a 10 săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF în martor, cu o probă secundară intermediară în etapa 62 din NF. Deși poate fi posibilă, de asemenea, dozarea de substanțe chimice foarte hidrofobe prin intermediul hranei, există o experiență redusă în utilizarea acestei căi de expunere în acest test până în prezent. În fiecare concentrație de testare există patru duplicate cu opt duplicate pentru fiecare martor utilizat. Punctele finale evaluate în cursul expunerii le includ pe cele care indică toxicitatea generalizată [și anume, mortalitatea, comportamentul anormal și determinările privind creșterea (lungime și greutate)], precum și punctele finale prevăzute a caracteriza modurile de acțiune ale toxicității endocrine care vizează procesele fiziologice mediate de estrogen, androgen sau tiroidă (și anume, histopatologia tiroidiană, histopatologia gonadei și a canalului gonadal, dezvoltarea anormală, vitelogenina din plasmă (opțional) și raportul sexului genotipic/fenotipic).

CRITERIILE DE VALIDITATE A TESTULUI

12. Se aplică următoarele criterii de valabilitate a testului:

— concentrația oxigenului dizolvat ar trebui să fie, pe parcursul testării, ≥ 40 % din valoarea saturației aerului;

— temperatura apei ar trebui să fie în intervalul de 21 ± 1 °C, iar diferențele între duplicate și diferențele între tratamente nu ar trebui să depășească 1,0 °C;

— pH-ul soluției de testat ar trebui să fie menținută între 6,5 și 8,5, iar diferențele între duplicate și diferențele între tratamente nu ar trebui să depășească 0,5;

— ar trebui să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate;

— mortalitatea în perioada de expunere ar trebui să fie ≤ 20 % în fiecare duplicat în martori;

— viabilitate de ≥ 70 % la icrele alese pentru a începe studiul;

— timpul median până la etapa 62 din NF al martorilor ar trebui să fie de ≤ 45 de zile.

— Greutatea medie a organismelor de testat în etapa 62 din NF și la încheierea testului la martori și martori tratați cu solvent (dacă se utilizează) ar trebui să atingă 1,0 ± 0,2 și, respectiv, 11,5 ± 3 g.

13. Deși nu este un criteriu de validitate, se recomandă ca cel puțin trei niveluri de tratament cu trei duplicate necompromise să fie disponibile pentru analiză. Mortalitatea excesivă, care compromite un tratament, este definită ca > 4 mortalități (> 20 %) la 2 sau mai multe duplicate care nu pot fi explicate prin eroare tehnică. Cel puțin trei niveluri de tratament fără toxicitate evidentă ar trebui să fie disponibile pentru analiză. Semnele de toxicitate evidentă pot include, printre altele, plutirea la suprafață, stagnarea pe fundul rezervorului, înotare inversă sau neregulată, lipsa activității la apariție la suprafață și lipsa de reacție la stimuli, anomalii morfologice (de exemplu, diformități ale membrelor), leziuni hemoragice și un edem abdominal.

14. În cazul în care se observă o abatere de la criteriile de validitate a testului, consecințele ar trebui să fie luate în considerare în raport cu fiabilitatea rezultatelor testului, iar aceste abateri și considerații ar trebui să fie incluse în raportul testului.

DESCRIEREA METODELOR

Aparatură

15. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:

(a) aparatură de control al temperaturii (de exemplu, aparate de încălzire sau aparate de răcire ajustabile la 22 ° ± 1 °C);

(b) termometru;

(c) un microscop binocular pentru disecție și instrumente de disecție;

(d) cameră digitală cu o rezoluție de cel puțin 4 megapixeli și cu funcție micro (dacă este necesar);

(e) balanță analitică având o capacitate de măsurare până la 0,001 mg sau 1 μg;

(f) aparat de măsurare a oxigenului dizolvat și a pH-ului;

(g) aparat de măsurare a intensității luminii care poate măsura în lucși.

Apă

Sursă și calitate

16. Poate fi folosită orice apă de diluție care este disponibilă la nivel local (de exemplu, apa de izvor sau apa de la robinet filtrată prin filtru de cărbune) și care permite creșterea și dezvoltarea normală a *X. laevis* și ar trebui să existe dovezi privind creșterea normală în această apă. Întrucât calitatea apei locale poate varia în mod semnificativ de la o zonă la alta, ar trebui efectuată o analiză a calității apei, în special dacă nu sunt disponibile date istorice privind utilitatea respectivei ape pentru creșterea larvelor de amfibieni. În cazul în care se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, ar trebui să se măsoare, înainte de începerea testului și/sau, spre exemplu, la șase luni, conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticide, carbon organic total și materii solide în suspensie. Unele caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 2.

Concentrația de iodid din apa de testare

17. Pentru ca glanda tiroidă să sintetizeze hormoni tiroidieni pentru a susține metamorfoza normală, ar trebui să existe o cantitate suficientă de iodid pentru larve printr-o combinație de surse apoase și alimentare. În prezent, nu există orientări stabilite în mod empiric pentru concentrații de iodid minime în alimente sau în apă pentru a asigura dezvoltarea corespunzătoare. Cu toate acestea, cantitățile de iodid disponibile pot afecta reactivitatea sistemului tiroidian la agenții activi asupra tiroidei, un factor de altfel cunoscut ca influențând activitatea bazală a glandei tiroide, ceea ce trebuie luat în considerare în momentul interpretării rezultatelor histopatologiei tiroidei. Pe baza unor lucrări anterioare, efectuarea cu succes a testului este demonstrată atunci când concentrațiile de iodid (I^{-}) din apa de diluție variază între 0,5 și 10 µg/l. În mod ideal, concentrația minimă de iodid din apa de diluție pe parcursul testului ar trebui să fie de 0,5 µg/l (adăugată sub formă de clorură de sodiu sau de potasiu). Dacă apa pentru testare este reconstituită din apă deionizată, ar trebui să se adauge iod într-o concentrație minimă de 0,5µg/l. Ar trebui să se raporteze concentrațiile de iodid măsurate din apa de testare (și anume, apa de diluție) și suplimentarea apei de testare cu iod sau cu alte săruri (dacă se utilizează). Conținutul de iod poate fi măsurat, de asemenea, în aliment(e), în plus față de apa de testare.

Sistemul de expunere

18. Testul a fost dezvoltat cu ajutorul unui sistem de diluare în regim dinamic. Componentele sistemului ar trebui să aibă componente care intră în contact cu apa confecționate din sticlă, oțel inoxidabil și/sau alt material inert din punct de vedere chimic. Bazinele de expunere ar trebui să fie acvarii din sticlă sau oțel inoxidabil, iar volumul utilizabil al acestora ar trebui să fie între 4,0 și 10,0 l (adâncimea minimă a apei de 10-15 cm). Sistemul ar trebui să poată susține toate concentrațiile de expunere, un martor și un martor tratat cu solvent, dacă este necesar, cu patru duplicate per tratament și opt în martori. Debitul fiecărui bazin ar trebui să fie constant, ținându-se cont atât de menținerea condițiilor biologice, cât și de expunerea la substanța chimică. Se recomandă ca debitele să fie adecvate (de exemplu, cel puțin 5 înlocuiri pe zi) pentru a evita scăderea concentrației chimice din cauza metabolismului atât a organismelor de testare, cât și a microorganismelor acvatice prezente în acvariile, sau căile abiotice de degradare (hidroliză, fotoliză) sau disipare (volatilizare, sorbție). Bazinele de tratament ar trebui să fie distribuite în mod aleatoriu într-o poziție în cadrul sistemului de expunere pentru a reduce eventualele efecte de poziție, inclusiv variațiile ușoare ale temperaturii, intensității luminii etc.). Informații suplimentare privind instalarea sistemelor de expunere în regim dinamic pot fi obținute prin intermediul Ghidului standard ASTM pentru efectuarea testelor de toxicitate acută pe materiale de testare cu specii de pești, macronevertebrate și amfibieni (16).

Livrarea substanței chimice: pregătirea soluțiilor de testat

19. Pentru a prepara soluțiile de testat în sistemul de expunere, soluția mamă a substanței chimice de testat ar trebui să fie dozată în sistemul de expunere prin intermediul unei pompe adecvate sau al unui alt aparat. Debitul soluției mamă ar trebui să fie calibrat în conformitate cu confirmarea analitică a soluțiilor de testat înainte de începerea expunerii și verificat din punct de vedere volumetric în mod regulat, pe durata testului. Soluția de testat din fiecare cameră ar trebui reînnoită ca volum de cel puțin 5 ori pe zi.

20. Metoda utilizată pentru a introduce substanța chimică de testat în sistem poate varia în funcție de proprietățile sale fizico-chimice. Prin urmare, înainte de test, ar trebui să se obțină informații de referință cu privire la substanța chimică, ce sunt relevantă pentru determinarea capacității de testare a acesteia. Informații utile cu privire la proprietățile specifice substanței chimice de testat includ formula structurală, greutatea moleculară, puritatea, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a și K_{ow}, solubilitatea în apă (de preferință în mediul de testare) și presiunea vaporilor, precum și rezultatele unui test efectuat pentru biodegradabilitate rapidă [metoda de testare C.4 (17) sau C.29 (18)]. Solubilitatea și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă pot să se producă pierderi din cauza evaporării substanței chimice de testat. Efectuarea acestui test fără informațiile enumerate mai sus ar trebui să fie analizată cu atenție, deoarece proiectul studiului va depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat și, fără aceste date, rezultatele testelor ar putea fi dificil de interpretat sau inutile. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței chimice de testat în soluțiile de testare, cu precizia și limita de detecție cunoscute și raportate. Substanțele chimice solubile în apă pot fi dizolvate în alicote de apă de diluție la o concentrație care permite livrarea la concentrația de testare vizată în cadrul unui sistem în regim dinamic. Substanțele chimice lichide sau solide la temperatura camerei și moderat solubile în apă pot necesita saturatori lichid:lichid sau lichid:solid (de exemplu, coloană din vată de sticlă) (19). Deși poate fi posibilă, de asemenea, dozarea de substanțe chimice foarte hidrofobe prin intermediul hranei, există o experiență redusă în utilizarea respectivei căi de expunere în acest test.

21. Soluțiile de testat din concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții mamă. Soluția mamă ar trebui să se prepare, de preferință, prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testat în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, amestecarea sau ultrasonificarea). Pentru obținerea unei soluții mamă cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane/sisteme de saturare sau metode de dozare pasivă (20). Se preferă utilizarea unui sistem de testare fără co-solvenți; însă substanțe chimice de testat diferite vor avea proprietăți fizico-chimice variate care vor necesita probabil abordări diferite pentru prepararea apei de expunere la o substanță chimică. Ar trebui să se depună toate eforturile pentru evitarea solvenților sau a purtătorilor deoarece: (1) anumiți solvenți pot avea ca rezultat toxicitatea și/sau răspunsuri nedorite sau neașteptate, (2) testarea substanțelor chimice peste solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent prin utilizarea solvenților) poate duce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective, (3) utilizarea solvenților în teste pe termen mai lung poate conduce la un grad semnificativ de „biofilmare" asociat cu activitatea microbiană, ceea ce ar putea avea un impact asupra condițiilor de mediu și a capacității de a menține concentrațiile de expunere și (4) în absența unor date istorice care să demonstreze că solventul nu influențează rezultatul studiului, utilizarea solvenților necesită un tratament al martorului tratat cu solvent care are implicații semnificative asupra bunăstării animalelor, întrucât sunt necesare animale suplimentare pentru efectuarea testului. În ceea ce privește substanțele chimice care sunt dificil de testat, ar putea fi utilizat, în ultimă instanță, un solvent și ar trebui să se consulte documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (21) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice de testat și de disponibilitatea datelor istorice despre martor cu privire la solvent. În absența datelor istorice, caracterul adecvat al unui solvent ar trebui determinat înainte de efectuarea studiului definitiv. În cazul în care utilizarea unui solvent este inevitabilă și se produce activitatea microbiană (bio-filmare), se recomandă înregistrarea/raportarea bio-filmării pe rezervor (cel puțin săptămânal) pe durata testului. În mod ideal, concentrația solventului ar trebui să fie menținută constantă în martorul solvent și în toate tratamentele pentru testare. În cazul în care concentrația solventului nu este menținută constantă, în martorul solvent ar trebui utilizată cea mai mare concentrație în cadrul tratamentului pentru testare. În cazurile în care se utilizează solvent purtător, concentrațiile maxime ale solvenților nu ar trebui să depășească 100 µl/l sau 100 mg/l (21) și se recomandă să se mențină concentrația solventului la un nivel cât mai scăzut posibil (de exemplu, ≤ 20 µl/l) pentru a evita eventualele efecte ale solventului asupra punctelor finale măsurate (22).

Animalele de testare

Specia de testare

22. Specia de testare este *X. laevis*, deoarece aceasta este: (1) cultivată, de regulă, în laboratoare din întreaga lume, (2) ușor de obținut prin intermediul furnizorilor comerciali și (3) prezintă posibilitatea de a determina sexul genetic.

Îngrijirea și reproducerea exemplarelor adulte

23. Îngrijirea și reproducerea adecvată a *X. laevis* sunt descrise într-o orientare standardizată (23). Adăpostirea și îngrijirea *X. laevis* sunt descrise, de asemenea, de către Read (24). Pentru a induce reproducția, se injectează intraperitoneal între trei și cinci perechi de femele și masculi adulți cu gonadotropină corionică umană (hCG). Exemplarele femele și masculi, sunt injectate cu, de exemplu, aproximativ 800-1 000 UI și, respectiv, 500-800 UI de hCG dizolvată în soluție salină de 0,6-0,9 % (sau în soluția lui Ringer pentru broaște, o soluție salină izotonică pentru utilizare la amfibieni). Volumul de injecție ar trebui să fie de aproximativ 10 µl/g greutate corporală (~ 1 000 µl). Ulterior, cuplurile reproducătoare induse sunt ținute în bazine de mari dimensiuni, ferite de perturbări și în condiții statice pentru promovarea amplexusului. Fundul fiecărui bazin de reproducere ar trebui să fie prevăzut cu un fund fals din

plasă din oțel inoxidabil (de exemplu, cu orificii de 1,25 cm), care să permită căderea icrelor pe fundul bazinului. Broaștele injectate cu hCG după-amiaza târziu vor depune, de regulă, cea mai mare parte a icrelor până la jumătatea dimineții zilei următoare. După ce se eliberează și se fertilizează o cantitate suficientă de icre, adulții ar trebui să fie îndepărtați din bazinele de reproducere. Icrele sunt apoi colectate și straturile gelatinoase sunt eliminate prin tratare cu L-cisteină (23). Ar trebui să se prepare o soluție de 2 % L-cisteină, iar pH-ul ar trebui să fie ajustat la 8,1 cu NaOH de 1 M. Această soluție de 21 °C se adaugă într-un vas Erlenmeyer de 500 ml care conține icrele de la o singură depunere și se rotește ușor timp de unu sau două minute, iar apoi se clătește bine de 6-8 ori cu apă de cultură la 21 °C. Icrele sunt apoi transferate într-un vas de cristalizare și se stabilește viabilitatea de > 70 %, cu anomalii minime la nivelul embrionilor care prezintă diviziunea celulară.

TIPUL TESTULUI

Concentrații de testare

24. Se recomandă utilizarea a minimum patru concentrații chimice și martori adecvați (inclusiv martori cu solvent, dacă este necesar). În general, se recomandă o separare a concentrației (factor de spațiere) de cel mult 3,2.

25. În scopul acestui test, rezultatele studiilor existente asupra amfibienilor ar trebui utilizate, în măsura în care este posibil, la determinarea celei mai mari concentrații de testare, astfel încât să se evite concentrațiile în mod evident toxice. Informațiile, spre exemplu, din relații cantitative structură-activitate, citirile încrucișate și datele provenite de la studiile existente pe amfibieni, cum ar fi testul metamorfozei la amfibieni, metoda de testare C.38 (25) și testul teratogenezei la embrionii de broască - *Xenopus* (23) și/sau testele efectuate asupra peștilor, cum ar fi metodele de testare C.48 , C.41 și C.49 (26) (27) (28), pot contribui la stabilirea acestei concentrații. Înainte de a derula testul LADDA, se poate realiza un experiment pentru stabilirea intervalului. Se recomandă ca expunerea pentru stabilirea intervalului să fie inițiată în termen de 24 de ore de la fertilizare și să fie continuată timp de 7-14 zile (sau mai mult, dacă este necesar), iar concentrațiile de testare să fie stabilite astfel încât intervalele dintre concentrațiile de testare să nu fie mai mari decât un factor de 10. Rezultatele obținute în urma experimentului de stabilire a intervalului ar trebui să servească la stabilirea celei mai mari concentrații de testare în cadrul LAGDA. Este de precizat că, în cazul în care trebuie să fie utilizat un solvent, ar putea fi stabilit caracterul adecvat al a solventului (și anume, dacă acesta poate avea un impact asupra rezultatului studiului) în cadrul studiului de stabilire a intervalului.

Duplicate în cadrul grupurilor de tratament și al martorilor

26. Ar trebui să se utilizeze cel puțin patru bazine duplicate pentru fiecare concentrație de testare și cel puțin opt duplicate pentru martori (și, martor cu solvent, dacă este necesar) (de exemplu, numărul de duplicate din martor și orice martor cu solvent ar trebui să fie de două ori mai mare decât numărul de duplicate din fiecare grup supus tratamentului, pentru a se asigura o putere statistică adecvată). Fiecare duplicat ar trebui să conțină cel mult 20 de animale. Numărul minim de animale prelucrate ar fi 15 (5 pentru subeșantioanele din etapa 62 din NF și 10 exemplare juvenile). Însă, se adaugă animale suplimentare în fiecare duplicat pentru a se lua în calcul posibilitatea mortalității, menținându-se în același timp un număr critic de 15.

PROCEDURA

Prezentarea testului

27. Testul este inițiat cu embrioni nou eclozați (etapele 8-10 din NF) și poate continua până la dezvoltarea juvenilă. Animalele sunt examinate zilnic pentru identificarea mortalității și a oricăror semne de comportament anormal. În etapa 62 din NF, se colectează un subeșantion de larve (până la 5 animale per duplicat) și se examinează diferite puncte finale (tabelul 1). După ce toate animalele au ajuns în etapa 66 din NF, și anume, la încheierea metamorfozei (sau după 70 de zile de la inițierea testului, oricare dintre acestea survine mai întâi), se procedează în mod aleatoriu la sacrificare (dar fără subeșantionare) pentru a reduce numărul de animale (10 pe bazin) (a se vedea punctul 43), iar animalele rămase sunt în continuare expuse până la împlinirea a 10 săptămâni de la timpul median în etapa 62 din NF din martor. La încheierea testului (eșantionarea juvenilă), se efectuează măsurători suplimentare (tabelul 1).

Condiții de expunere

28. Apendicele 3 cuprinde o prezentare completă a parametrilor de testare. În perioada de expunere ar trebui măsurate zilnic oxigen dizolvat, temperatura și pH-ul soluțiilor de testare. Conductivitatea, alcalinitatea și duritatea se măsoară o dată pe lună. În cazul temperaturii apei din soluția de testat, diferențele între duplicate și tratamente (într-o singură zi) nu ar trebui să depășească 1,0 °C. De asemenea, în cazul pH-ului soluțiilor de testare, diferențele între duplicate și tratamente nu ar trebui să fie mai mari de 0,5.

29. Bazinele de expunere pot fi sifonate zilnic pentru a îndepărta alimentele neconsumate și deșeurile, astfel încât să se evite contaminarea încrucișată a bazinelor. Ar trebui să se acorde atenție reducerii la minim a stresului și traumei la animale, în special în timpul deplasării, al curățării acvariului și al manipulării. Condițiile/activitățile stresante, precum zgomotul puternic și/sau neîncetat, lovirea acvariilor, vibrațiile în bazin, ar trebui evitate.

Durata expunerii la substanța chimică de testat

30. Expunerea este inițiată la embrionii nou eclozați (etapele 8-10 din NF) și se continuă până la împlinirea a zece săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF (≤ 45 de zile de la inițierea testului) în grupul martor. În general, durata LAGDA este de 16 săptămâni (maximum 17 săptămâni).

Inițierea testului

31. Pentru animalele părinți utilizate pentru inițierea testului ar fi trebuit să se dovedească anterior că se poate determina sexul genetic al progeniturilor lor (apendicele 5). După ce adulții au depus icre, embrionii sunt colectați, tratați cu cisteină pentru a elimina stratul de gelatină și verificați pentru viabilitate (23). Tratamentul cu cisteină permite manipularea embrionilor în timpul verificării fără lipirea de suprafețe. Verificarea are loc sub un microscop de disecție, utilizând o pipetă oculară de dimensiuni corespunzătoare pentru a elimina embrionii neviabili. Se preferă ca, pentru test, să se utilizeze icrele din cadrul unei singure depuneri care determină o viabilitate de peste 70 %. Embrionii din etapele 8-10 din NF sunt distribuiți în mod aleatoriu în bazine de tratare prin expunere care conțin un volum adecvat de apă de diluție până când fiecare bazin conține 20 de embrioni. Embrionii ar trebui să fie manipulați cu grijă pe durata acestui transfer pentru a reduce la minim stresul cauzat de manipulare și pentru a evita orice vătămare. La 96 ore după fertilizare, mormolocii ar trebui să se deplaseze spre partea superioară a coloanei de apă și să înceapă să se prindă de părțile laterale ale bazinului.

Regimul de hrănire

32. Modificarea ratei hranei și a ratei de alimentare în diferite etape ale vieții *X. laevis* constituie un aspect foarte important al protocolului LAGDA. Hrănirea excesivă a larvelor în etapa larvară conduce, de regulă, la o creștere a incidenței și gravității scoliozei (apendicele 8) și ar trebui evitată. Pe de altă parte, hrănirea necorespunzătoare în faza larvară conduce la rate de dezvoltare foarte variabile între martori, ceea ce poate să compromită puterea statistică sau să creeze confuzie la nivelul rezultatelor testului. Apendicele 4 prezintă regimul alimentar și de hrănire recomandat pentru larve și exemplarele juvenile pentru *X. laevis* în condiții dinamice, dar sunt permise alternative cu condiția ca organismele supuse testării să crească și să se dezvolte în mod satisfăcător. Este important de remarcat că, în cazul în care se măsoară punctele finale specifice sistemului endocrin, hrana ar trebui să nu conțină substanțe active endocrin, precum făina de soia.

Hrănirea larvelor

33. Hrana larvară recomandată constă în furaje de început pentru păstrăvi, discuri de alge *Spirulina* și chipsuri de alge (de exemplu, fulgi TetraFin®, Tetra, Germania) amestecați în apă de cultură (sau diluție). Acest amestec se administrează de trei ori pe zi în zilele lucrătoare și o dată pe zi în weekend. Mormolocii sunt hrăniți, de asemenea, cu creveți în saramură *Artemia* spp., cu nauplii de 24 de ore, de două ori pe zi în timpul săptămânii și o dată pe zi în weekend, începând cu ziua 8 după fertilizare. Hrana larvară, care ar trebui să fie consecventă în fiecare vas de testare, ar trebui să permită creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a animalelor de testare, pentru a asigura reproductibilitatea și transferabilitatea rezultatelor testului: (1) timpul median până la etapa 62 din NF la martori ar trebui să fie ≤ 45 de zile și (2) se recomandă o masă medie cuprinsă între 1,0 ± 0,2 g în etapa 62 din NF la martori.

Hrana puietului de pește

34. De îndată ce metamorfoza este completă, regimul de hrănire constă în alimentare cu broască cu mare de calitate superioară, de exemplu, Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, SUA) (apendicele 4). În cazul broscuțelor (puiet timpuriu), granulele sunt măcinate scurt într-un aparat de măcinat cafea sau blender ori zdrobite cu mojar și pistil pentru a reduce dimensiunea acestora. După ce puietul ajunge la o dimensiune suficient de mare pentru a consuma granule, nu mai este necesară măcinarea sau zdrobirea. Animalele ar trebui hrănite o dată pe zi. Hrana puietului ar trebui să permită creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a organismelor: se recomandă o greutate medie încadrată în valoarea 11,5 ± 3 g la puietul din martor la terminarea testului.

Chimie analitică

35. Înainte de inițierea testului, ar trebui să se determine stabilitatea substanței chimice de testat (de exemplu, solubilitatea, caracterul degradabil și volatilitatea) și toate metodele analitice necesare, de exemplu, folosind informațiile sau cunoștințele existente. Atunci când dozarea este realizată prin apa de diluție, se recomandă ca soluțiile de testat din fiecare bazin duplicat să fie analizate înainte de începerea testului, pentru a verifica performanța sistemului. În perioada de expunere, concentrațiile substanței chimice de testat se determină la intervale adecvate, de preferință în fiecare săptămână pentru cel puțin un duplicat din fiecare grup de tratament, cu rotire între duplicate din cadrul aceluiași grup de tratament în fiecare săptămână. Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Însă, în cazul în care concentrația substanței chimice de testat în soluție a fost menținută în mod satisfăcător, pe tot parcursul testului, în limitele valorii de ± 20 % din concentrația nominală, rezultatele pot fi bazate fie pe valori nominale, fie pe cele măsurate. De asemenea, coeficientul de variație (CV) al concentrațiilor de testat măsurate pe durata testării din cadrul unui tratament ar trebui să fie menținut la maxim 20 % pentru fiecare concentrație. Atunci când concentrațiile măsurate nu rămân în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală (de exemplu, la testarea substanțelor chimice foarte biodegradabile sau adsorbtive), ar trebui să se determine și să se exprime concentrațiile de efect în raport cu media aritmetică a concentrației în cazul testelor în regim dinamic.

36. Debitul apei de diluție și al soluției mamă ar trebui să fie verificat la intervale corespunzătoare (de exemplu, de trei ori pe săptămână) în perioada de expunere. În cazul substanțelor chimice care nu pot fi detectate la unele sau la toate concentrațiile nominale (de exemplu, din cauza degradării rapide sau a adsorbției în vasele de testare sau ca urmare a acumulării unei substanțe chimice marcate în organismele animalelor expuse), se recomandă ca rata de reînnoire a soluției de testare din fiecare cameră să fie adaptată pentru a menține concentrațiile de testare constante, în măsura posibilității.

Observații și măsurători ale punctelor finale

37. Punctele finale evaluate în cursul expunerii sunt cele care indică toxicitatea, inclusiv mortalitatea, comportamentul anormal, cum ar fi semnele clinice ale bolii și/sau toxicități generale, precum și determinările de creștere (lungime și greutate) și punctele finale ale patologiei care pot reacționa atât la toxicitatea generală, cât și la modurile endocrine de acțiune care vizează căile mediate de estrogen, androgen sau tiroidă. În plus, concentrația de plasmă VTG poate fi măsurată, opțional, la încheierea testului. Măsurarea VTG poate fi utilă pentru înțelegerea rezultatelor studiului în contextul mecanismelor endocrine în cazul substanțelor chimice suspectate de a perturba sistemul endocrin. Punctele finale și calendarul măsurătorilor sunt sintetizate în tabelul 1.

Tabelul 1

Prezentarea punctelor finale ale LAGDA

Puncte finale (*)	Zilnic	Eșantionare intermediară (eșantionare larvară)	Încheierea testului (eșantionare de puieți)
Mortalitate și anomalii	X		
Timp până la etapa 62 din NF		X	
Histopatologie (glanda tiroidă)		X	
Morfometrie (creștere în greutate și lungime)		X	X
Indice somatic al ficatului (LSI)			X
Raporturile sexului genetic/fenotipic			X
Histopatologie (gonade, canale de reproducere, rinichi și ficat)			X
Vitelogenina (VTG) (opțional)			X

(*) Toate punctele finale sunt analizate statistic.

Mortalitate și observații zilnice

38. Toate bazinele de testare ar trebui verificate zilnic pentru identificarea exemplarelor moarte, iar mortalitatea se înregistrează pentru fiecare bazin. Exemplarele moarte ar trebui să fie îndepărtate din bazinul de testare imediat după ce au fost observate. Stadiul de dezvoltare al animalelor moarte ar trebui să fie clasificat fie ca fiind stadiul 58 din NF (apariție pre-membru anterior), stadiul 58 din NF - stadiul 62 din NF - stadiul 63 din NF - stadiul 66 din NF (între stadiul 62 din NF și absorbția completă a cozii) sau stadiul 66 după NF (etapa post-larvară). Rate ale mortalității de peste 20 % pot să indice condiții de testare necorespunzătoare sau efecte toxice evidente ale substanței chimice de testat. Animalele tind să prezinte cea mai mare sensibilitate la evenimentele de mortalitate neindusă de substanțe chimice în primele câteva zile de dezvoltare după evenimentul de depunere a icrelor și în plin proces metamorfic. O astfel de mortalitate ar putea fi evidențiată de datele de control.

39. În plus, ar trebui să se înregistreze orice observație legată de comportamentul anormal, malformații evidente (de exemplu , scolioză) sau leziuni. Observațiile referitoare la scolioza ar trebui să fie numărate (incidența) și clasificate în funcție de severitate (de exemplu, nu este remarcabilă – NR, minim – 1, moderat – 2, sever – 3; apendicele 8). Ar trebui să se depună eforturi pentru a se asigura că limitarea prevalenței scoliozei moderate și grave (de exemplu, sub 10 % la martori) pe parcursul studiului, deși o mai mare prevalență a anomaliilor în martori nu ar constitui neapărat un motiv pentru oprirea testului. Comportamentul normal, în cazul exemplarelor larvare, este caracterizat prin suspendarea în coloana de apă cu coada ridicată deasupra capului, bătaia ritmică și regulată a înotătoarei caudale, ridicarea periodică la suprafață, opercularea și receptivitatea la stimuli. Un comportament anormal ar include, de exemplu, plutirea la suprafață, rămânerea pe fundul bazinului, înotare inversată sau neregulată, lipsa de activitate la suprafață și lipsa de reacție la stimuli. În cazul animalelor post-metamorfice, în plus față de comportamentele anormale de mai sus, ar trebui să se înregistreze diferențele mari de consum de hrană între tratamente. Malformațiile evidente și leziunile majore ar putea include anomalii morfologice (de exemplu, deformări ale membrelor), leziuni hemoragice, edem abdominal și infecții bacteriene sau fungice. Apariția leziunilor pe capul puieților, în poziția posterioară nărilor, ar putea fi indicații ale unor niveluri de umiditate insuficiente. Aceste determinări sunt calitative și ar trebui considerate analoage semnelor clinice de boală/stres și ar trebui să fie realizate prin comparații cu exemplarele din martori. În cazul în care rata apariției este mai mare la bazinele expuse decât în cazul martorilor, atunci acestea ar trebui considerate drept dovadă de toxicitate evidentă.

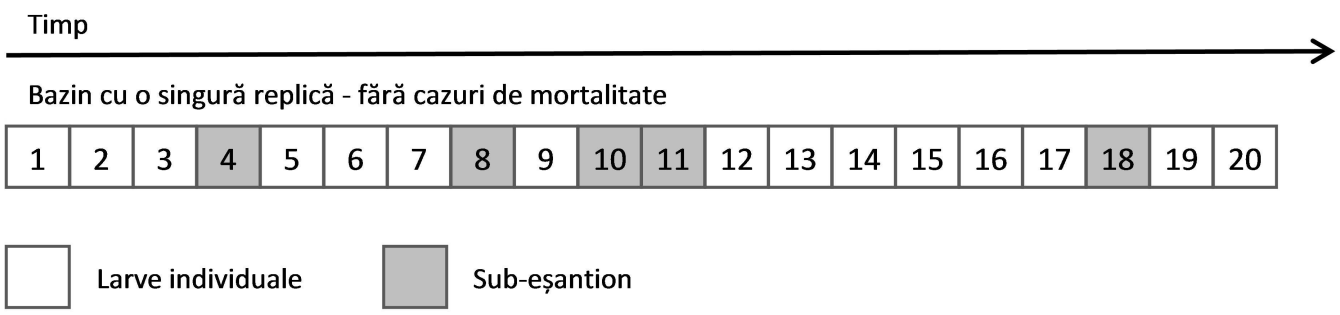
Sub-eșantionarea larvară

Prezentare generală a sub-eșantionării larvare:

40. Mormolocii care au ajuns în stadiul 62 din NF ar trebui să fie eliminați din bazine și fie eșantionați, fie mutați în următoarea parte a expunerii, într-un bazin nou, sau separați fizic de mormolocii rămași în același bazin cu un separator. Mormolocii sunt verificați în fiecare zi și se înregistrează ziua de studiu în care un mormoloc individual ajunge în stadiul 62 din NF. Caracteristica definitorie utilizată în această evaluare este forma capului. Atunci când capul a ajuns să fie redus ca dimensiune, astfel încât acesta este vizual de aproximativ aceeași lățime ca și trunchiul mormolocului, iar membrele anterioare se află la nivelul părții centrale a inimii, atunci exemplarul respectiv ar fi considerat ca ajungând în stadiul 62 din NF.
41. Obiectivul este de a eșantiona un număr total de cinci mormoloci aflați în stadiul 62 din NF în fiecare bazin duplicat. Aceasta ar trebui să fie efectuată cu totul în mod aleatoriu, dar decisă *a priori*. Un exemplu ipotetic de bazin duplicat este prezentat în **figura 1**. În cazul în care există 20 de mormoloci supraviețuitori într-un anumit bazin atunci când primul exemplar ajunge în stadiul 62 din NF, ar trebui să se aleagă cinci numere aleatorii de la 1 la 20. Mormolocul nr. 1 este primul exemplar care va ajunge în stadiul 62 din NF, iar mormolocul nr. 20 este ultimul exemplar dintr-un bazin care va ajunge în stadiul 62 din NF. În mod similar, dacă există 18 larve supraviețuitoare într-un bazin, ar trebui să se aleagă cinci numere aleatorii de la 1 la 18. Aceasta ar trebui să fie efectuată pentru fiecare bazin duplicat atunci când primul exemplar supus testării ajunge în stadiul 62 din NF. În cazul în care există rate de mortalitate în cadrul eșantionării în stadiul 62 din NF, probele rămase trebuie să fie prelevate din nou în mod aleatoriu pe baza numărului de larve rămase până în stadiul 62 din NF și a numărului de probe suplimentare necesare pentru a se ajunge la un total de cinci probe provenite din respectivul duplicat. În ziua în care un mormoloc ajunge în stadiul 62 din NF, se face trimitere la diagrama de eșantionare întocmită pentru a stabili dacă exemplarul respectiv este selectat sau separat fizic de mormolocii rămași pentru a fi expus în continuare. În exemplul prezentat (figura 1), primul exemplar care urmează să ajungă în stadiul 62 din NF (și anume, caseta nr. 1) este separat fizic de celelalte larve, este expus în continuare și este înregistrată ziua de studiu în care exemplarul ajunge în stadiul 62 din NF. Ulterior, exemplarele nr. 2 și 3 sunt tratate în același mod ca și nr. 1, iar apoi exemplarul nr. 4 este prelevat pentru creștere și histologia tiroidiană (conform acestui exemplu). Această procedură continuă până când cel de al 20lea exemplar fie se alătură celorlalte exemplare care au trecut de stadiul 62 din NF, fie este eșantionat. Procedura de selecție aleatorie utilizată trebuie să asigure pentru fiecare organism testat probabilitatea egală de a fi selectat. Acest lucru poate fi realizat prin utilizarea oricărei metode de selecție aleatorie, dar impune, de asemenea, ca fiecare mormoloc să fie prins în plasă la un anumit moment în perioada de subeșantionare în stadiul 62 din NF.

Figura 1

Exemplu ipotetic de regim de eșantionare în stadiul 62 din NF, pentru un singur bazin duplicat



42. Pentru subeșantionarea larvară, punctele finale obținute sunt: (1) timpul până în stadiul 62 din NF (și anume, numărul de zile între fertilizare și stadiul 62 din NF), (2) anomaliile externe, (3) morfometria (de exemplu, greutate și lungime) și (4) histologia tiroidei.

Eutanasierea mormolocilor

43. Subeșantionul de mormoloci în stadiul 62 din NF (5 exemplare per duplicat) ar trebui să fie eutanasiați prin imersiune timp de 30 de minute în cantități adecvate (de exemplu, 500 ml) de soluție anestezică (de exemplu, 0,3 % soluție de metan sulfonat de tricaină MS-222, CAS.886-86-2). Soluția MS-222 ar trebui să fie tamponată cu bicarbonat de sodiu la o valoare a pH-ului de aproximativ 7,0, deoarece soluția MS-222 netamponată este acidă și iritantă pentru pielea broaștei, determinând o absorbție scăzută și stresarea suplimentară inutilă a organismelor.
44. Cu ajutorul unei plase de tip sită se scoate un mormoloc din camera experimentală și se transportă (plasează) în soluția de eutanasiere. Exemplarul este eutanasiat în mod corespunzător și este pregătit pentru autopsie atunci când nu reacționează la stimuli externi, cum ar fi ciupirea membrului din spate cu o pereche de forceps.

Morfometrie (greutate și lungime)

45. Măsurătorile greutății în stare umedă (cea mai apropiată valoare mg) și lungimea bot-cloacă (SVL) (la valoarea cea mai apropiată de 0,1 mm) pentru fiecare mormoloc ar trebui efectuate imediat după ce acesta nu mai reacționează ca urmare a anesteziei (figura 2a). Pentru măsurarea SVL dintr-o fotografie se poate utiliza un software de analiză a imaginii. Mormolocii ar trebui uscați înainte de cântărire pentru a îndepărta excesul de apă. După măsurarea dimensiunii corpului (greutate și SVL) ar trebui să se înregistreze și să se noteze orice anomalii morfologice brute și/sau orice semne clinice ale toxicității, precum scolioza (a se vedea apendicele 8), peteșiile și hemoragia și se recomandă documentarea digitală. Este de precizat că peteșiile reprezintă mici pete hemoragice de culoare roșie sau vișinie apărute pe piele ca urmare a rupturilor capilare.

Colectarea și fixarea țesuturilor

46. Pentru subeșantionarea larvelor, se evaluează glandele tiroide pentru histologie. Partea posterioară a trunchiului inferior până la membrele posterioare se îndepărtează și se elimină. Carcasa tăiată este fixată în fixatorul Davidson. Volumul fixatorului din rezervor ar trebui să fie de cel puțin 10 ori mai mare decât volumul aproximativ al țesuturilor. Ar trebui să se procedeze la agitarea sau circularea corespunzătoare a fixatorului pentru fixarea țesuturilor de interes. Toate țesuturile rămân în fixatorul Davidson timp de cel puțin 48 de ore, dar nu mai mult de 96 de ore, după care acestea sunt clătite cu apă deionizată și păstrate în formalină neutră tamponată 10 % (1) (29).

Histologia glandei

47. Fiecare subeșantion de larve (țesuturi fixe) este analizat din punct de vedere histologic în ceea ce privește glandele tiroidei, și anume diagnostic și grad de gravitate (29) (30).

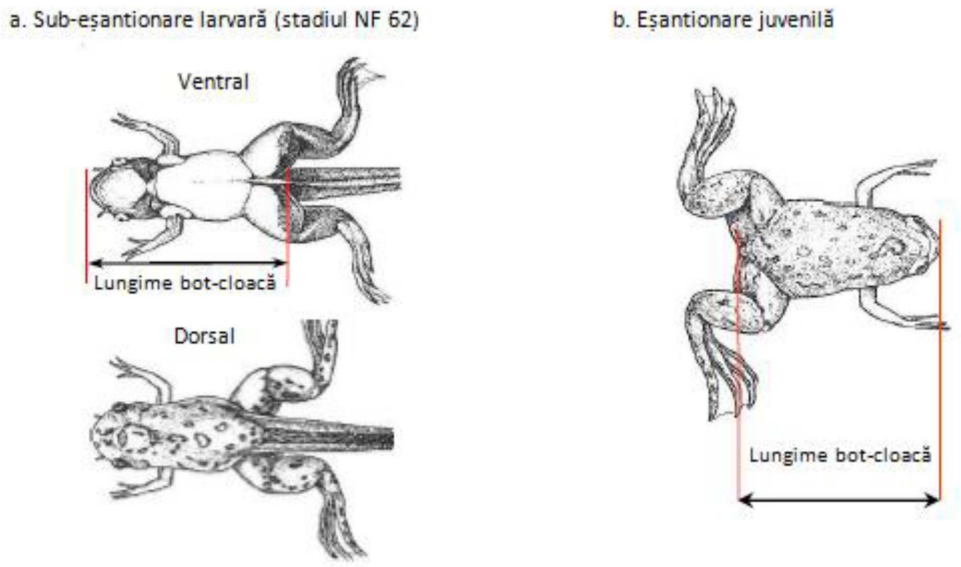


Figura 2: Repere pentru măsurarea lungimii bot-cloacă pentru LAGDA în stadiul 62 din NF (a) și pui de broască (b). Caracteristicile definitorii ale stadiului 62 din NF (a): capul prezintă aceeași lățime cu trunchiul, lungimea nervului olfactiv este mai scurtă decât diametrul bulbului olfactiv (vedere dorsală), iar membrele posterioare se află la nivelul inimii (vedere ventrală). Imagini adaptate din materialul Nieuwkoop și Faber (1994).

Sfârșitul expunerii larvare

48. Având în vedere numărul inițial de mormoloci, se preconizează că este probabil să existe un procent redus de exemplare care nu se dezvoltă normal și care nu încheie procesul de metamorfoză (stadiul 66 din NF) într-un interval rezonabil de timp. Perioada de expunere a larvelor nu ar trebui să depășească 70 de zile. Orice mormoloci rămași la finalul acestei perioade ar trebui să fie eutanasiați (a se vedea punctul 43), greutatea lor în stare umedă și SVL ar trebui să fie măsurate, aceștia ar trebui să fie clasificați pe stadii conform Nieuwkoop și Faber, 1994 și se notează orice anomalii legate de dezvoltare.

Sacrificarea după stadiul 66 din NF

49. Zece exemplare din fiecare bazin ar trebui să se dezvolte în continuare din stadiul 66 din NF (resorbția completă a cozii) până la încetarea expunerii. Prin urmare, după ce toate animalele au ajuns în stadiul 66 din NF sau după 70 de zile (oricare dintre acestea survine mai întâi), ar trebui să se procedeze la sacrificare. Animalele care au trecut de stadiul 66 din NF și care nu vor continua să fie expuse ar trebui să fie selectate în mod aleatoriu.

50. Exemplarele care nu sunt selectate pentru continuarea expunerii sunt eutanasiate (a se vedea punctul 43). Pentru fiecare exemplar se măsoară stadiul de dezvoltare, greutatea umedă și SVL (figura 2b) și se realizează o autopsie macroscopică. Sexul fenotipic (pe baza morfologiei gonadei) este notat ca sex feminin, masculin sau nedeterminat.

Eșantionare de puieți

Prezentarea eșantionării de puieți

51. Exemplarele rămase continuă să fie expuse până la 10 săptămâni după timpul median în stadiul 62 din NF, în martorul cu apa de diluție (și/sau în martorul cu solvent, dacă este cazul). La sfârșitul perioadei de expunere, animalele rămase (maximum 10 broaște pentru fiecare duplicat) sunt eutanasiate și se măsoară sau se evaluează și se înregistrează diferitele puncte finale: (1) morfometria (greutate și lungime), (2) ratele sexului fenotipic/genotipic, (3) greutatea ficatului (indicele somatic al ficatului), (4) histopatologie (gonade, canale de reproducere, ficat și rinichi) și opțional (5) valoarea VTG a plasmei.

Eutanasierea broaștelor

52. Probele de puieți, broaștele după etapa metamorfică, sunt eutanasiate printr-o injecție intraperitoneală de anestezic, de exemplu, MS-222 de 10 % într-o soluție tamponată de fosfat adecvată. Eșantionarea broaștelor poate fi efectuată după ce acestea nu mai reacționează (de obicei, în aproximativ 2 minute de la injectare, în cazul în care se utilizează MS-222 de 10 % într-o doză de 0,01 ml per gram de broască). Chiar dacă puii de broaște ar putea fi scufundați într-o concentrație mai mare de anestezic (MS-222), experiența a demonstrat că este nevoie de mai mult timp pentru ca acestea să fie anesteziate utilizând această metodă și ar fi posibil ca durata să nu fie adecvată pentru a permite eșantionarea. Injectarea asigură o eutanasiere eficientă și rapidă înainte de eșantionare. Eșantionarea nu ar trebui să înceapă până când nu este confirmată lipsa de reacție a broaștelor, pentru a se obține certitudinea că exemplarele sunt moarte. În cazul în care broaștele manifestă semne de suferință considerabilă (se poate prezice în mod sigur suferința foarte gravă și decesul) și considerați se consideră că aceștia sunt muribunzi, animalele ar trebui anesteziate și eutanasiate și tratate drept mortalitate în scopul analizei datelor. Atunci când o broască este eutanasiată din cauza morbidității, acest aspect ar trebui observat și raportat. În funcție de momentul în care broasca este eutanasiată în timpul studiului, se poate proceda la reținerea acesteia pentru analiza histopatologică (fixarea broaștei pentru o posibilă histopatologie).

Morfometrie (greutate și lungime)

53. Măsurătorile greutății umede și ale SVL (figura 2 b) sunt identice cu cele prezentate pentru subeșantionarea larvară.

Valoarea VTG din plasmă (opțiune)

54. VTG este un marker biologic acceptat la scară largă care rezultă în urma expunerii la substanțe chimice estrogenice. În cazul LAGDA, valoarea VTG din plasmă poate fi măsurată opțional în cadrul eșantioanelor de puieți (acest lucru poate fi relevant în special în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată ca fiind un estrogen).

55. Membrele posterioare ale puieților eutanasiați sunt tăiate, iar sângele este colectat cu ajutorul unui capilar heparinizat (deși ar putea fi adecvate metode alternative de colectare a sângelui, cum ar fi puncția cardiacă). Sângele este expulzat într-o eprubetă de microcentrifugă (de exemplu, cu un volum de 1,5 ml) și centrifugat pentru obținerea plasmei. Probele de plasmă ar trebui păstrate la o temperatură de cel mult -70 °C până la determinarea VTG. Concentrația VTG din plasma poate fi măsurată printr-un test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA) (apendicele 6) sau printr-o metodă alternativă, cum ar fi spectrometria de masă (31). Se preferă anticorpi specifici speciei datorită unei sensibilități sporite.

Determinarea sexului genetic

56. Sexul genetic al fiecărui pui de baltă este evaluat pe baza markerilor dezvoltați de Yoshimo *et al*. (11). Pentru determinarea sexului genetic, se colectează și se păstrează (parțial sau integral), într-o eprubetă de microcentrifugă, un membru posterior (sau orice alt țesut) îndepărtat în timpul disecției (la broaște, pot fi obținute probe din orice țesut). Țesuturile pot fi păstrate la temperatura de -20 °C sau la temperaturi mai mici până la izolarea acidului dezoxiribonucleic (ADN). Izolarea ADN-ului din țesuturi poate fi realizată cu ajutorul unor kituri disponibile în comerț, iar analiza pentru detectarea prezenței sau absenței marcatorului este efectuată printr-o metodă de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (apendicele 5). În general, concordanța dintre sexul histologic și genotip între animalele din grupul martor la momentul eșantionării puieților în grupurile martor este mai mare de 95 %.

Colectarea și fixarea țesuturilor pentru histopatologie

57. Gonadele, canalele de reproducere, rinichii și ficatul sunt colectate pentru analiza histologică în timpul eșantionării finale. Se deschide cavitatea abdominală și se disecă și se cântărește ficatul. Apoi, se îndepărtează cu atenție organele digestive (de exemplu, stomacul, intestinele) din partea inferioară a abdomenului pentru a evidenția gonadele, rinichii și canalele de reproducere. Ar trebui să fie notate orice anomalii morfologice evidente ale gonadelor. În cele din urmă, ar trebui îndepărtate membrele posterioare dacă nu au fost îndepărtate în prealabil în vederea colectării sângelui. Ficatul colectat și carcasa cu gonadele lăsate *in situ* ar trebui să fie introduse imediat în fixatorul Davidson. Volumul fixatorului din rezervor ar trebui să fie de cel puțin 10 ori mai mare decât volumul aproximativ al țesuturilor. Toate țesuturile rămân în fixatorul Davidson timp de cel puțin 48 de ore, dar nu mai mult de 96 de ore, după care acestea sunt clătite cu apă deionizată și păstrate în formalină neutră tamponată 10 % (1) (29).

Histopatologie

58. Fiecare eșantion de puiet este supus evaluării histologice pentru identificarea patologiei la gonade, canale de reproducere, rinichi și țesut hepatic, și anume diagnostic și grad de gravitate (32). Din această evaluare reiese, de asemenea, fenotipul gonadei (de exemplu, ovar, testicul, hermafrodit) și, împreună cu măsurătorile individuale ale sexului genetic, aceste observații pot fi utilizate pentru a calcula raporturile sexului fenotipic/genotipic.

DATE ȘI RAPORTARE

Analiza statistică

59. LAGDA generează trei forme de date de analizat din punct de vedere statistic: (1) date continue cantitative (greutate, SVL, LSI, VTG), (2) date despre timpul până la evenimente pentru ratele de dezvoltare (și anume, zile până la stadiul 62 din NF de la momentul inițierii testului) și (3) date ordinale sub formă de punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare obținute în urma evaluărilor histopatologice.

60. Se recomandă ca modelul testului și selecția testului statistic să permită existența unei puteri adecvate pentru detectarea schimbărilor de importanță biologică în punctele finale în cazul în care va fi raportată valoarea CFEO sau CEx. Analizele statistice ale datelor (în general, baza medie a duplicatelor) ar trebui, de preferință, să urmeze procedurile descrise în documentul intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" (33) (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind ecotoxicitatea: un ghid pentru aplicare). Apendicele 7 al acestei metode de testare prezintă arborele decizional de analiză statistică recomandat și orientarea pentru tratarea datelor și alegerea celui mai adecvat test sau model statistic care să fie utilizat în LAGDA.

61. Datele provenite din eșantionarea puieților (de exemplu, creștere, LSI) ar trebui să fie analizate pentru fiecare sex genotipic separat, deoarece sexul genotipic este determinat pentru toate broaștele.

Considerații privind analiza datelor

Utilizarea de duplicate și tratamente compromise

62. Duplicatele și tratamentele pot fi compromise din cauza excesului de mortalitate prin toxicitate evidentă, boală sau eroare tehnică. Dacă un tratament este compromis din cauza unei boli sau a unei erori tehnice, ar trebui să existe trei tratamente necompromise cu trei duplicate necompromise disponibile pentru analiză. În cazul în care apare o toxicitate evidentă la tratamentul (tratamentele) puternic(e), este de preferat ca cel puțin trei niveluri de tratament cu trei duplicate necompromise să fie disponibile pentru analiză [în concordanță cu abordarea privind concentrația maximă tolerată din orientările OCDE privind testele (34)]. În plus față de mortalitate, semnele de toxicitate evidentă pot include efecte comportamentale (de exemplu, plutirea la suprafață, stagnarea pe fundul bazinului, mișcarea inversă sau neregulată, lipsa activității de revenire la suprafață), leziuni morfologice (de exemplu, leziuni hemoragice, edem abdominal) sau inhibarea reacțiilor alimentare normale la compararea calitativă cu exemplarele martor.

Martorul tratat cu solvent

63. La încheierea testului, ar trebui efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului (dacă se utilizează). Aceasta se realizează printr-o comparație statistică între grupul de martori solvent și grupul de martori apă de diluție. Cele mai relevante puncte finale care trebuie luate în considerare în această analiză sunt factorii determinanți ai creșterii (greutate și lungime), deoarece aceștia pot fi afectați prin toxicități generalizate. În cazul în care se detectează diferențe semnificative din punct de vedere statistic la aceste puncte finale între grupul cu martor tratat cu apă de diluție și grupul cu martor tratat cu solvent, ar trebui să se recurgă la cea mai bună apreciere profesională pentru a determina dacă validitatea testului este compromisă. În cazul în care cei doi martori diferă, tratamentele expuse la substanța chimică ar trebui comparate cu martorul tratat cu solvent, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă o comparație cu martorul tratat cu apă de diluție. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două grupuri cu martori, se recomandă ca tratamentele expuse la substanța chimică de testat să fie comparate cu cele ale grupului (grupul cu martor tratat cu solvent și grupul cu martor tratat cu apă de diluție), cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă numai comparația cu grupul cu martor tratat cu apă de diluție sau cu grupul cu martor tratat cu solvent.

Raportul testului

64. Raportul testului ar trebui să includă următoarele:

Substanța chimică de testat:

— proprietăți de natură fizică și, dacă este relevant, proprietăți fizico-chimice;

— Substanță monocomponentă:

aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

— Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Specii de testare:

— numele științific, sușa, dacă există, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate, precum și manipularea ulterioară.

— incidența scoliozei la martorii istorici pentru cultura mamă utilizată.

Condiții de testare:

— perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— modelul de testare (de exemplu, dimensiunea camerei, volumul materialului și al apei, numărul camerelor de testare și al duplicatelor, numărul organismelor de testare pe duplicat);

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (ar trebui să se specifice agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— metoda de dozare a substanței chimice de testat (*de exemplu*, pompe, sisteme de diluare);

— eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorilor măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testat în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă a fost măsurat), iodul total, carbonul organic total (dacă a fost măsurat), solide în suspensie (dacă au fost măsurate), salinitatea mediului de testare (dacă a fost măsurată) și alte măsurători făcute;

— concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard ale acestora;

— calitatea apei din vasele de testare, pH, temperatură (zilnic) și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații precise legate de hrană [*de exemplu*, tipul de aliment(e), sursa, cantitatea administrată și frecvența].

Rezultate:

— dovezi privind faptul că martorii au îndeplinit criteriile de validitate;

— date privind martorul (plus martorul tratat cu solvent, atunci când este utilizat) și grupurile de tratament, după cum urmează: mortalitatea și anomaliile observate, timpul până la etapa NF 62, evaluarea histologiei tiroidei (doar proba de larve), creșterea (greutatea și lungimea), LSI (numai proba de pești tineri), ratele sexului genetic/fenotipic (numai pentru proba de pești tineri), rezultatele examenului histopatologic pentru gonade, canalele de reproducere, rinichi și ficat (numai proba de pești tineri) și valoarea VTG a plasmei (numai pentru proba de pești tineri, dacă este prelevată);

— abordarea analizei statistice și a tratării datelor (testul statistic sau modelul utilizat);

— concentrația fără efect observat (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat;

— concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pentru fiecare răspuns evaluat (la $\alpha = 0,05$); CEx pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (*de exemplu* 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați ai modelului și erorile standard ale acestora.

— orice abatere de la metoda de testare și abateri de la criteriile de acceptare, precum și considerații privind eventualele consecințe asupra rezultatului testului.

65. Pentru rezultatele măsurărilor punctelor finale, ar trebui să fie prezentate valorile medii și deviațiile lor standard (în funcție de duplicat și concentrație, dacă este posibil).

66. Timpul mediu până la etapa NF 62 ar trebui calculat și prezentat ca medie a medianelor duplicatelor și a deviației standard a acestora. De asemenea, pentru tratamente, o medie de tratament ar trebui calculată și prezentată ca medie a medianelor duplicatelor și a deviației standard a acestora.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Agenția SUA pentru protecția mediului (2013). Validarea testului privind creșterea și dezvoltarea larvelor de amfibieni: Integrated Summary Report.

(2) OCDE (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) Nieuwkoop PD și Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, SUA.

(4) Kloas W și 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 și 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 și Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K și Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K și Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T și Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S și Degitz SJ. (2009) b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J și Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR și Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A și Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, SUA.

(17) Capitolul C.4 din prezenta anexă, Test de biodegradabilitate rapidă.

(18) Capitolul C.29 din prezenta anexă, Biodegradabilitatea rapidă - CO2 în vase închise ermetic (testul Headspace).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL și Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 23), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ și Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, SUA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Capitolul C.38 din prezenta anexă, Analiza metamorfozei la amfibieni.

(26) Capitolul C.48 din prezenta anexă, Analiza reproducerii pe termen scurt la pești.

(27) Capitolul C.41 din prezenta anexă, Testul de dezvoltare sexuală a peștilor.

(28) Capitolul C.49 din prezenta anexă, Testul de toxicitate acută la embrionii de pești (FET).

(29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (nr. 82) Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC și Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG și 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) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 228), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 54), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Punctele finale apicale: care provoacă efecte la nivel de populație.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

ELISA: test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic

CEx: (concentrație efectivă pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină o valoare x % a unui efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere dat în comparație cu un martor. De exemplu, o valoare EC50 este concentrația estimată să producă un efect asupra unui punct final de testare la 50 % dintr-o populație expusă într-un timp de expunere stabilit.

zdf: Zile după fertilizare

Test în regim dinamic: un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare în perioada de expunere.

Axa HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal

IUPAC: Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a unei substanțe chimice de testat la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul. Însă toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC ar trebui să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când aceste două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, ar trebui furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, CFEO). Apendicele 7 oferă orientări în acest sens.

Concentrația letală medie (LC50): este concentrația unei substanțe chimice de testat care este considerată letală la 50 % din organismele testate pe durata testului.

Concentrația fără efect observat (CFEO): este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu martorul, nu are niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-un timp de expunere stabilit.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

VTG: vitelogenina este o fosfolipoglicoproteină precursoare a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

Apendicele 2

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

Substanță	Concentrație-limită
Particule în suspensie	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	50 ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

Apendicele 3

CONDIȚII DE TESTARE PENTRU LAGDA

1.	Specia de testare	*Xenopus laevis*
2.	Tipul de testare	Continuu în regim dinamic
3.	Temperatura apei	Temperatura nominală este de 21 °C. Temperatura medie pe durata testului este de 21 ± 1 °C (diferențele între duplicate și între tratamente nu ar trebui să depășească 1,0 °C)
4.	Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg) de 600-2000 lucși (lumeni/m^2) la suprafața apei
5.	Perioadă de expunere la lumină	12 h de lumină, 12 h de întuneric
6.	Volumul soluției de testare și vasul de testare (bazin)	4 - 10 l (adâncime a apei de minimum 10-15 cm) Bazin din sticlă sau oțel inoxidabil
7.	Schimburile de volum ale soluțiilor de testare	Constante, având în vedere menținerea condițiilor biologice și expunerea la substanța chimică (de exemplu, 5 reînnoiri pe zi ale volumului în bazin)
8.	Vârsta organismelor de testare la inițiere	stadiile 8-10 din Nieuwkoop și Faber (NF)
9.	Numărul de organisme per duplicat	20 de exemplare (embrioni)/bazin (duplicat) în momentul inițierii expunerii și 10 exemplare (exemplare tinere)/bazin (duplicat) după stadiul 66 din NF până la încetarea expunerii
10.	Număr de tratamente	Minim 4 tratamente cu substanțe chimice de testat, plus martorul (martorii) adecvat (adecvați)
11.	Numărul de duplicate per tratament	4 duplicate per tratament pentru substanța chimică de testat și 8 duplicate pentru martor(i)
12.	Numărul de organisme per concentrație de testare	Minim 80 de duplicate per tratament pentru substanța chimică de testat și 160 de animale pentru martor(i)
13.	Apa de diluție	Orice apă care permite creșterea și dezvoltarea normală a speciei *X. laevis* (de exemplu, apă de izvor sau apă de la robinet filtrată cu cărbune)
14.	Aerarea	Nu este necesară, dar este posibilă aerarea bazinelor în cazul în care nivelurile de oxigen dizolvat scad sub limitele recomandate, iar creșterea debitului soluției de testare este maximizată.
15.	Oxigenul dizolvat din soluția de testare	Oxigen dizolvat: ≥ 40 % din valoarea saturației aerului sau ≥ 3,5 mg/l

16. pH-ul soluției de testare	6,5-8,5 (diferențele între tratamente și între duplicate nu ar trebui să depășească 0,5)
17. Duritatea și alcalinitatea soluției de testare	10-250 mg $CaCO_3$/l
18. Regimul de hrănire	(A se vedea apendicele 4)
19. Perioadă de expunere	Din stadiile 8-10 din NF până la zece săptămâni după perioada mediană până la stadiul 62 din NF în grupul martor cu apă și/sau cu solvent (maxim 17 săptămâni)
20. Puncte finale biologice	Mortalitatea (și anomalii aparente), timpul până la stadiul 62 din NF (eșantion de larve), evaluarea histologiei tiroidei (eșantion de larve), creșterea (greutatea și lungimea), indicele somatic al ficatului (eșantionul de puieți), ratele sexului genetic/fenotipic (eșantionul de puieți), histopatologia pentru gonade, canalele de reproducere, rinichi și ficat (eșantion de puieți) și valoarea VTG din plasmă (opțional, eșantionul de puieți)
21. Criterii de validitate a testului	Oxigenul dizolvat ar trebui să fie de > 40 % din valoarea saturației aerului; temperatura medie a apei ar trebui să fie în limitele valorii de 21 ± 1 °C, iar diferențele între duplicate și între tratamente ar trebui să fie < 1,0 °C; pH-ul soluției de testare ar trebui să fie cuprins între 6,5 și 8,5; mortalitatea în martor ar trebui să fie ≤ 20 % în fiecare duplicat, iar perioada medie până la stadiul 62 din NF în martor ar trebui să fie ≤ 45 zile; greutatea medie a organismelor de testat în etapa 62 din NF și la încheierea testului la martori și martori tratați cu solvent (dacă se utilizează) ar trebui să atingă 1,0 ± 0,2 și, respectiv, 11,5 ± 3 g; ar trebui să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare în soluție a concentrațiilor substanței chimice de testat în limitele a ± 20 % din valorile medii măsurate.

Apendicele 4

REGIM DE HRĂNIRE

Ar trebui remarcat faptul că, deși se recomandă acest regim de hrănire, sunt permise alternative, cu condiția ca organismele de testare să crească și să se dezvolte într-un ritm corespunzător.

Hrănirea larvelor

Pregătirea alimentației larvelor

A. 1:1 (v/v) Trout Starter: alge/TetraFin® (sau un produs echivalent);

1. Trout Starter: se amestecă 50 g de Trout Starter (granule mici sau praf) și 300 ml de apă filtrată adecvată într-un blender la viteză mare timp de 20 de secunde

2. un amestec alge/TetraFin® (sau un produs echivalent); se amestecă 12 g de dischete de alge spirulină și 500 ml de apă filtrată într-un blender la viteză mare timp de 40 de secunde, se amestecă 12 g de TetraFin® (sau un produs echivalent) cu 500 ml de apă filtrată, iar apoi acestea se combină pentru a constitui 1 l de 12 g/l alge spirulină și 12 g/l TetraFin® (sau un produs echivalent).

3. Se combină volume egale din amestecul Trout Starter și din amestecul alge/TetraFin® (sau un produs echivalent)

B. Creveți în saramură:

15 ml de ouă de creveți în saramură sunt sparte într-un litru de apă sărată (preparată prin adăugarea a 20 ml NaCl la 1 l de apă deionizată). Creveții în saramură sunt recoltați după aerarea timp de 24 de ore la temperatura ambiantă sub lumină constantă. Pe scurt, se permite așezarea creveților în saramură timp de 30 de minute prin oprirea aerării. Chisturile care plutesc în partea superioară a recipientului cilindric sunt deversate și eliminate, iar creveții sunt trecuți prin filtre corespunzătoare și aduși la 30 ml cu apă filtrată.

Protocolul de hrănire

Tabelul 1 cuprinde o referință cu privire la tipul și cantitatea de hrană utilizată în stadiile larvare ale expunerii. Exemplarele ar trebui să fie hrănite de trei ori pe zi, de luni până vineri, și o dată pe zi în weekend.

Tabelul 1

Regimul de hrănire pentru larvele X. *laevis* în condiții dinamice

Timp (*) (După fertilizare)	Trout Starter: alge/TetraFin® sau un produs echivalent)		Creveți în saramură	
	În timpul săptămânii (de trei ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)	În timpul săptămânii (de două ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)
Zilele 4-14 (în săptămânile 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (în zilele 8-15) 1 ml (din ziua 16)	0,5 ml (în zilele 8-15) 1 ml (din ziua 16)
Săptămâna 2	0,67 ml	2,4 ml		
Săptămâna 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Timp (*) (După fertilizare)	Trout Starter: alge/TetraFin® sau un produs echivalent)		Creveți în saramură	
	În timpul săptămânii (de trei ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)	În timpul săptămânii (de două ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)
Săptămâna 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Săptămânile 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Ziua 0 este definită ca fiind ziua în care este realizată injecția hCG.

Tranziția de la regimul alimentar larvar la cel pentru puieți

Atunci când larvele încheie metamorfoza, acestea trec la o formulă de regim alimentar pentru puieți, care este explicată în continuare. În timpul acestei tranziții, regimul alimentar al larvelor ar trebui redus pe măsură ce crește cantitatea de hrană pentru puieți. Acest lucru se poate realiza prin scăderea proporțională a hranei larvare și, în același timp, creșterea proporțional a hranei pentru puieți, pe măsură ce fiecare grup de cinci mormoloci depășesc stadiul 62 din NF și se apropie de încheierea metamorfozei în stadiul 66 din NF.

Hrana puietului de pește

Regimul alimentar pentru puieți

După încheierea metamorfozei (stadiul 66), regimul alimentar se schimbă doar în cazul alimentației pentru broasca de mare de calitate superioară de 3/32 inch (Xenopus Express™, FL, SUA) sau o cantitate echivalentă.

Prepararea granulelor zdrobite pentru tranziția de la stadiul larvar la cel de puiet

Granulele alimentare pentru broasca de mare sunt măcinate pentru un timp scurt într-un aparat de măcinat cafea, un blender sau un mojar și pistil pentru a reduce dimensiunea granulelor cu aproximativ 1/3. Prin procesarea excesivă se produce praf, ceea ce nu este încurajat.

Protocolul de hrănire

Tabelul 2 cuprinde o referință cu privire la tipul și cantitatea de hrană utilizată în stadiul de puiet și de adult. Animalele ar trebui hrănite o dată pe zi. Ar trebui menționat că, în timpul metamorfozei exemplarelor, acestea continuă să primească o porțiune din creveții în saramură până când >95 % din exemplare încheie metamorfoza.

Exemplarele nu ar trebui să fie hrănite în ziua încheierii testului, pentru ca hrana să nu distorsioneze măsurătorile greutății.

Tabelul 2

Regimul de hrănire pentru puieții *X. laevis* în condiții dinamice. Ar trebui remarcat faptul că exemplarele nemetamorfozate, inclusiv cele a căror metamorfoză a fost întârziată de tratamentul chimic, nu pot mânca granule nezdrobite.

Timpul (*) (Săptămâni după data metamorfozei mediane)	Granule zdrobite (mg pe pui de broască)	Granule integrale (mg pe pui de broască)
Când exemplarele încheie metamorfoza	25	0
Săptămânile 0-1	25	28
Săptămânile 2-3	0	110
Săptămânile 4-5	0	165
Săptămânile 6-9	0	220

(*) Prima zi din săptămâna 0 este data metamorfozei mediane la exemplarele din martor.

Apendicele 5

Determinarea Sexului Genetic (Sexare Genetică)P

Metoda de stabilire a sexului genetic pentru *Xenopus laevis* se bazează pe studiul lui Yoshimoto *et al.*, 2008. Dacă este necesar, pot fi obținute proceduri în detaliu din această publicație. Dacă se consideră adecvat, pot fi utilizate metode alternative (de exemplu, qPCR de mare capacitate).

Primaze X. laevis

Marker DM-W

Direct:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Invers:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Martor pozitiv

Direct:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Invers:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificarea ADN

Purificarea ADN din țesut muscular sau cutanat, utilizând, de exemplu, kitul Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat. nr. 69 506) sau un produs similar în conformitate cu instrucțiunile kitului. ADN-ul poate fi eluat din coloanele de centrifugare utilizând mai puțină soluție-tampon pentru a genera eșantioane mai concentrate dacă acest lucru se consideră necesar pentru PCR. Este de precizat că ADN-ul este destul de stabilă, așadar ar trebui să se acorde atenție evitării contaminării încrucișate care ar putea conduce la o caracterizare greșită a masculilor ca femele, sau invers.

PCR

Un model de protocol care utilizează JumpStart^{TM}*Taq* de la Sigma este prezentat în **tabelul 1**.

Tabelul 1

Model de protocol care utilizează JumpStart^{TM}*Taq* de la Sigma

Amestec principal	1x (µl)	[Final]
NFW ([1])	11	—
10 X soluție tampon	2,0	—
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mm
dNTP (10 mm fiecare)	0,4	200 µM
Marker pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker invers pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
Martor pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
Martor invers pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM

Amestec principal	1x (µl)	[Final]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unități/µl
Model ADN	1,0	~200 pg/µl

([1]) Apă fără nuclează (*Nuclease-free water* – NFW)
Notă: La pregătirea amestecurilor principale, se pregătesc cantități suplimentare pentru a completa orice pierderi care ar putea apărea în timp introducerii cu pipeta (de exemplu: 25x ar trebui să se folosească doar pentru 24 de reacții).

Reacție:

Amestec principal	19,0 µl
Model	1,0 µl
Total	20,0 µl

Profil Thermocycler:

Etapa 1.	94 °C		1 min
Etapa 2.	94 °C		30 sec
Etapa 3.	60 °C		30 sec
Etapa 4.	72 °C		1 min
Etapa 5.	Treceți etapa 2.	la	35 de cicluri
Etapa 6.	72 °C		1 min
Etapa 7.	4 °C		menținere

Produsele PCR pot fi testate imediat într-un gel sau păstrate la 4 °C.

Electroforeză în gel de agaroză (3 %) (model de protocol)

50X TAE

Tris	24,2 g
Acid acetic glacial	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Se adaugă apă la 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agaroză

3 părți de agaroză NuSieve™ GTG™

1 partea de agaroză Fisher electroendosmoză scăzută (EEO)

Metoda

1. Se prepară un gel de 3 % prin adăugarea a 1,2 g de amestec cu agaroză la 43 ml 1X TAE. Se agită pentru a desface bucățile mari.

2. Amestecul cu agaroză se încălzește în cuptorul cu microunde până la dizolvarea completă (a se evita fierberea). Se lasă să se răcească lent.

3. Se adaugă 1,0 µL de bromură de etidiu (10 mg/ml). Se rotește balonul. Trebuie remarcat faptul că bromura de etidiu este mutagenă, așadar ar trebui să se utilizeze pentru această etapă substanțele chimice alternative, în măsura în care acest lucru este posibil din punct de vedere tehnic, pentru a reduce riscurile pentru sănătatea lucrătorilor ([1]).

4. Se toarnă gel în formă cu pieptenele. Se răcește complet.

5. Se adaugă gel în aparat. Se acoperă gelul cu 1X TAE.

6. Se adaugă 1 µl de 6x colorant de încărcare la fiecare 10 µl de produs PCR.

7. Se introduc eșantioane în godeuri cu pipeta.

8. Se analizează la 160 de volți constant timp de ~ 20 de minute.

În **figura 1** este prezentată o imagine de gel de agaroză care indică modele de exemplare de sex masculin și feminin.

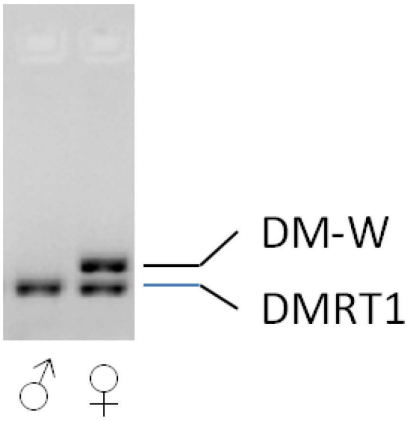


Figura 1 Imagine cu gel de agaroză care indică modelul orientativ de bandă pentru un exemplar mascul (♂), (bandă unică ~ 203 pb: DMRT1) și un exemplar femelă (♀) (două benzi la ~ 259 bp: DM-W și 203 bp:DMRT1).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

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.

([1]) În conformitate cu articolul 4.1 din Directiva 2004/37/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 29 aprilie 2004 privind protecția lucrătorilor împotriva riscurilor legate de expunerea la agenți cancerigeni sau mutageni la locul de muncă [a șasea directivă specială în sensul articolului 16 alineatul (1) din Directiva 89/391/CEE a Consiliului] (JO L 158, 30.4.2004, p. 50).

Apendicele 6

Măsurarea Vitelogeninei

Măsurarea vitelogeninei (VTG) se face utilizând o metodă de analiză de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), care a fost dezvoltată inițial pentru VTG a speciei fathead minnow (Parks *et al.*, 1999). În prezent, nu există anticorpi disponibili în comerț pentru *X. laevis*. Cu toate acestea, având în vedere abundența de informații pentru această proteină și disponibilitatea unor servicii de producție de anticorpi în comerț eficiente din punctul de vedere al costurilor, este rezonabil ca laboratoarele să poată desfășura cu ușurință un test ELISA pentru a efectua această măsurătoare (Olmstead *et al.*, 2009). De asemenea, Olmstead *et al.* (2009) oferă o descriere a analizei, astfel cum a fost modificată pentru VTG la *X. tropicalis*, prezentată în continuare. Metoda utilizează un anticorp realizat împotriva VTG a speciei *X. tropicalis*, dar este cunoscută, de asemenea, ca fiind aplicabilă pentru VTG a speciei *X. laevis*. Ar trebui remarcat faptul că pot fi utilizate, de asemenea, testele ELISA necompetitive și că este posibil ca acestea să aibă limite de detecție mai mici decât metoda descrisă mai jos.

Materiale și reactivi

— Ser cu primul anticorp (Ab) pre-adsorbit

— Se amestecă o parte de ser Anti-*X. tropicalis* VTG cu primul Ab cu două părți de plasmă de mascul cu martor și se lasă la temperatura camerei timp de ~ 75 de minute, se așează soluția pe gheață timp de 30 de minute, se centrifughează > 20K x G timp de 1 oră la 4 °C, se elimină supernatantul, partea alicotă și se păstrează la -20 °C.

— Al doilea anticorp

— Conjugat Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (de exemplu, Bio-Rad 172-1019)

— Standard VTG

— VTG de *X. laevis* purificat la 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidină) (de exemplu, KPL 50-76-00; sau Sigma T0440)

— Ser normal de gâscă (NGS)(de exemplu, Chemicon® S26-100 ml)

— Plăci de microtitrare din polistiren EIA de 96 de godeuri (de exemplu, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— Cuptor de hibridizare la temperatură de 37 °C (sau un incubator de aer cu echilibrare rapidă) pentru plăci, baie de apă pentru eprubete

— Alte echipamente de laborator, substanțe chimice și consumabile.

Rețete

Soluție-tampon de acoperire (50 mM de soluție-tampon carbonat, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
apă	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
apă	810 ml

Soluție-tampon de spălare (PBST):

10X PBS	100 ml
apă	900 ml

Se ajustează pH-ul la 7,3 cu 1 M HCl, apoi se adaugă 0,5 ml Tween-20

Soluție-tampon de analiză:

Ser normal de gâscă (NGS)	3,75 ml
Soluție-tampon de spălare	146,25 ml

Eșantionare

Sângele se recoltează cu o eprubetă microhematocrită heparinizată și se așează pe gheață. După centrifugare timp de 3 de minute, eprubeta este punctată, se deschide, iar plasma este expulzată în eprubete de microcentrifugare de 0,6 ml care conțin 0,13 unități de aprotinină liofilizată. (Aceste eprubete sunt preparate în prealabil prin adăugarea cantității adecvate de aprotinină, congelare și liofilizare într-un concentrator de tip speed-vac la căldură redusă până la uscare.) Plasma se păstrează la -80 °C până la analiză.

Procedura pentru o singură placă

Acoperirea plăcii

Se amestecă 20 µl de VTG purificată cu 22 ml de soluție-tampon de carbonat (final 3 µg/ml). Se adaugă 200 µl în fiecare godeu de pe o placă cu 96 de godeuri. Se acoperă placa cu o peliculă de adeziv de etanșare și se lasă la incubat la 37 °C pentru 2 ore (sau la 4 °C peste noapte).

Blocarea plăcii

Soluția de blocare este preparată prin adăugarea a 2 ml de Normal Goat Serum (NGS) la 38 ml de soluție-tampon de carbonat. Se îndepărtează soluția de acoperire și se agită conținutul uscat. Se adaugă 350 µl de soluție de blocare în fiecare godeu. Se acoperă cu o peliculă de adeziv de etanșare și se incubează peste noapte la 37 °C pentru 2 ore (sau la 4 °C peste noapte).

Prepararea standardelor

5,8 µl de VTG standard purificat se amestecă cu 1,5 ml de soluție-tampon de analiză într-o eprubetă de testare din sticlă de borosilicat de unică folosință de 12 × 75 mm. Se obține astfel o cantitate de 12 760 ng/ml. Apoi se efectuează o diluție în serie prin adăugarea de 750 µl din diluția anterioară la 750 µl de soluție-tampon de analiză pentru a genera concentrații finale de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 și 50 ng/ml.

Prepararea eșantioanelor

Se începe cu o diluție de 1:300 (de exemplu, se combină 1 µl de plasmă cu 299 µl de soluție-tampon de analiză) sau de 1:30 de plasmă în soluție-tampon de analiză. În cazul în care se preconizează o cantitate mare de VTG, pot fi necesare diluții suplimentare sau mai mari. Încercați să mențineți B/B_o în intervalul standardelor. În cazul eșantioanelor care nu au o valoare VTG apreciabilă, de exemplu, martorii masculi și femele (care sunt toți imaturi), se utilizează diluția de 1:30. Eșantioanele, diluate mai puțin de această valoare, pot prezenta efecte de matrice nedorite.

În plus, se recomandă să se analizeze un eșantion de martor pozitiv pe fiecare placă. Acesta provine dintr-o rezervă de plasmă care conține niveluri de VTG puternic induse. Rezerva este diluată inițial în NGS, împărțită în părți alicote și păstrată la -80 C. Pentru fiecare placă o parte alicotă se congelează, se diluează apoi în soluție-tampon de analiză și se testează similar unui eșantion de testare.

Incubația cu primul anticorp

Primul anticorp este pregătit prin efectuarea unei diluții de 1:2000 a serului cu primul anticorp pre-adsorbit în soluția-tampon de analiză (de exemplu, soluție-tampon de analiză 8 µl-16 ml). Se combină 300 µl din soluția cu primul anticorp cu 300 µl de eșantion/soluție standard într-o eprubetă de sticlă. Eprubeta B_o se prepară în mod similar cu 300 µl de soluție-tampon de analiză și 300 µl de anticorp. De asemenea, ar trebui să se prepare o eprubetă NSB utilizând numai 600 µl de soluție-tampon de analiză, și anume, niciun fără anticorp. Se acoperă eprubetele cu Parafilm și se agită ușor pentru amestecare. Se incubează într-o baie de apă la 37 °C timp de 1 oră.

Spălarea plăcii

Chiar înainte de finalizarea incubării primului anticorp, se spală placa. Aceasta se realizează prin scuturare pentru eliminarea conținutului și tamponarea pe hârtie absorbantă pentru uscare. Godeurile sunt apoi umplute cu 350 µl de soluție de spălare, șterse și uscate. Aici este utilă o pipetă cu mai multe canale cu picurare repetată sau un sistem de spălare a plăcii. Etapa de spălare se repetă de încă două ori, executându-se în total trei spălări.

Încărcarea plăcii

După spălarea plăcii, se îndepărtează eprubetele din baia de apă și se agită ușor. Se adaugă 200 µl din fiecare eșantion, din soluția standard, B_o și eprubeta NSB pentru a duplica godeurile plăcii. Se acoperă placa cu o peliculă de adeziv de etanșare și se lasă la incubat timp de o oră la 37 °C.

Incubația cu al doilea anticorp

La sfârșitul incubării din etapa anterioară, placa ar trebui să fie spălată din nou de trei ori, la fel ca mai sus. Se prepară al doilea anticorp diluat prin amestecarea a 2,5 µl din al doilea anticorp cu 50 ml de soluție-tampon de analiză. Se adaugă 200 µl din al doilea anticorp diluat în fiecare godeu, se etanșează ca mai sus și se incubează timp de 1 oră la 37 °C.

Adăugarea de substrat

După ce incubația cu al doilea anticorp s-a încheiat, se spală placa de trei ori, astfel cum s-a descris anterior. Apoi se adaugă 100 µl de substrat TMB în fiecare godeu. Se lasă reacția timp de 10 minute pentru a se desfășura, de preferință, ferită de lumina puternică. Se oprește reacția prin adăugarea a 100 µl de acid fosforic 1 M. Aceasta va determina schimbarea culorii din albastru în galben intens. Se măsoară absorbanța la 450 nm utilizând un cititor de placă.

Calcularea B/Bo

Se scade valoarea medie a NSB din toate măsurătorile. Se calculează B/B_o pentru fiecare eșantion și soluție standard împărțind valoarea absorbanței (B) la absorbanța medie a eșantionului B_o.

Se obține curba standard și se determină valorile necunoscute

Se generează o curbă standard cu ajutorul unui software de grafică pe calculator (de exemplu, Slidewrite™ sau Sigma Plot®) care va extrapola cantitatea din B/B_o a eșantionului pe baza B/B_o a standardelor. De regulă, cantitatea este reprezentată grafic pe o scară logaritmică și curba are o formă sigmoidă. Însă, este posibil să apară liniară atunci când se utilizează o gamă restrânsă de standarde. Se corectează cantitățile eșantionului pentru factorul de diluție, acestea fiind consemnate ca mg VTG/ml din plasmă.

Determinarea limitelor de detecție minime (MDL)

Adesea, în special la masculii normali, nu este clar cum să se raporteze rezultatele obținute pe baza valorilor mici. În aceste cazuri, ar trebui să se utilizeze „limitele de încredere” de 95 %, pentru a stabili dacă valoarea respectivă ar trebui consemnată ca fiind zero sau ca un alt număr. În cazul în care rezultatul eșantionului se încadrează în intervalul de încredere al standardului zero (B_0), rezultatul ar trebui consemnat ca fiind zero. Nivelul minim de detecție va fi cel mai scăzut standard care este în mod consecvent diferit de standardul zero; adică, cele două intervale de încredere nu se suprapun. Pentru orice rezultat al eșantionului care se încadrează în limita de încredere a nivelului minim de detecție, sau depășește această limită, se va consemna valoarea calculată. În cazul în care un eșantion se încadrează între standardul zero și intervalele de încredere ale nivelului minim de detecție, ar trebui să se consemneze o jumătate din nivelul minim de detecție pentru valoarea eșantionului respectiv.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113125.

Apendicele 7

Analiza Statistică

LAGDA generează trei forme de date de analizat din punct de vedere statistic: (1) date continue cantitative, (2) date despre timpul până la evenimente pentru ratele de dezvoltare (timpul până la stadiul 62 din NF) și (3) date ordinale sub formă de punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare obținute în urma evaluărilor histopatologice. Arborele decizional pentru analiza statistică recomandat pentru LAGDA este prezentat în figura 1. De asemenea, mai jos sunt indicate unele adnotări care ar putea fi necesare pentru a efectua analiza statistică pentru măsurătorile LAGDA. Pentru arborele decizional de analiză, ar trebui să se analizeze rezultatele măsurătorilor pentru mortalitate, creștere (greutate și lungime) și indicele somatic pentru ficat (LSI) în conformitate cu secțiunea „Alte puncte finale".

Flux continuu de date

Datele pentru punctele finale continue ar trebui să fie mai întâi verificate în ceea ce privește monotonicitatea prin transformarea datelor prin clasificare, corelarea cu un model ANOVA și compararea contrastelor liniare și pătratice. În cazul în care datele sunt monotone, se efectuează un test al tendințelor cu regresie Jonckheere-Terpstra pe valorile medii ale replicilor și nu ar trebui să se mai aplice analize ulterioare. O alternativă pentru datele care sunt distribuite în mod normal cu variații omogene este testul cu regresie Williams. Dacă datele nu sunt monotone (contrastul pătratic este semnificativ și cel liniar nu este semnificativ), acestea ar trebui să fie analizate folosind un model ANOVA de efecte mixte. Ulterior, datele ar trebui să fie evaluate pentru normalitate (de preferat, folosind testul Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling) și omogenitatea varianței (de preferință, folosind testul Levene). Ambele teste sunt efectuate pe valorile reziduale din modelul ANOVA de efecte mixte. Se poate recurge la opinia experților în locul acestor teste formale privind normalitatea și omogenitatea variației, deși sunt preferate testele formale. În cazul în care datele sunt distribuite în mod normal cu o variață omogenă, ipotezele unui efect mixt ANOVA se confirmă și se determină un efect semnificativ al tratamentului din testul lui Dunnett. În cazul în care se constată non-normalitatea sau caracterul eterogen al variației, atunci se încalcă ipotezele testului lui Dunnett și se caută o transformare pentru normalizare și stabilizare a variației. În cazul în care nu se constată o astfel de transformare, atunci se determină un efect semnificativ al tratamentului, cu un test al lui Dunn. Ori de câte ori este posibil, ar trebui să se efectueze un test unidirecțional, față de un test bidirecțional, însă se impune o apreciere profesională pentru a decide care este corespunzător pentru un anumit punct final.

Mortalitate

Datele privind mortalitatea ar trebui să fie analizate pentru perioada de timp care cuprinde întregul test și ar trebui să fie exprimate ca proporție care a murit într-un anumit bazin. Mormolocii care nu încheie procesul de metamorfoză în intervalul de timp dat, acei mormoloci care se află în sub-eșantionul de cohortă larvară, acei pești tineri care sunt eliminați, precum și orice animal care moare din cauza unei erori a experimentatorului ar trebui să fie tratați ca date cenzurate și să nu fie incluși în numitorul calculului procentual. Înainte de orice analiză statistică, ar trebui ca proporția mortalității să fie transformată în arcsin-rădăcină pătrată. O alternativă este utilizarea testului Cochran-Armitage de regresie, eventual cu o ajustare Rao-Scott în prezența supradispersiei.

Greutatea și lungimea (date privind creșterea)

Masculii și femelele nu sunt dimorfe din punct de vedere sexual în timpul metamorfozei, astfel încât datele privind creșterea în sub-eșantionul larvar ar trebui să fie analizate independent de sex. Cu toate acestea, datele privind creșterea puietului ar trebui să fie analizate separat pe criterii de sex genetic. Pentru aceste puncte finale este posibil să fie nevoie de o transformare log, deoarece normalitatea log a datelor privind dimensiunile nu este un lucru neobișnuit.

Indicele somatic pentru ficat (LSI)

Greutățile ficatului ar trebui să fie normalizate ca proporții din greutățile totale ale corpului (și anume, LSI) și ar trebui să fie analizate separat pe baza sexului genetic.

Timp până la stadiul 62 din NF

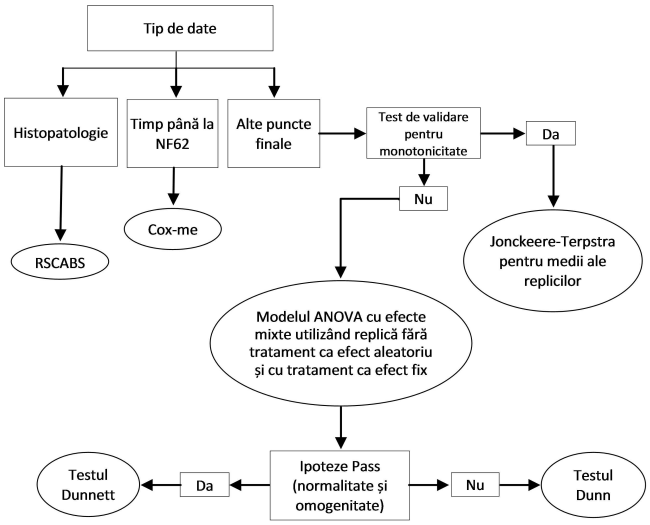
Datele privind timpul până la metamorfoză ar trebui să fie tratate ca date privind timpul până la eveniment, iar orice cazuri de mortalitate sau de exemplare care nu ajung în stadiul 62 NF în 70 de zile ar trebui tratate drept date cenzurate de drept (și anume, valoarea reală este mai mare de 70 de zile, dar studiul se încheie înainte ca animalele să fi atins stadiul 62 NF în 70 de zile). Timpul median până la încheierea stadiului 62 NF al metamorfozei la martorii din apa de diluție ar trebui să fie utilizat pentru stabilirea datei de încheiere a testului. Timpul mediu pentru încheierea metamorfozei ar putea fi determinat de factorii de estimare produs-limită Kaplan-Meier. Acest punct final ar trebui să fie analizat utilizând un model de risc proporțional cu efecte mixte Cox, care ține seama de structura replicată a studiului.

Date privind histopatologia (punctaje de severitate și stadii de dezvoltare)

Datele privind histopatologia sunt prezentate sub forma unor punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare. Un test denumit RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) utilizează un test al tendințelor Cochran-Armitage cu Rao-Scott cu regresie ajustat la fiecare nivel de severitate în cadrul unui răspuns histopatologic (Green *et al.*, 2014). Ajustarea Rao-Scott integrează în test modelul experimental al recipientului replicat. Procedura „by Slices" integrează estimarea biologică conform căreia severitatea efectelor tinde să crească, odată cu creșterea dozelor sau a concentrațiilor, păstrând în același timp punctajele individuale și indicând severitatea oricărui efect identificat. Procedura RSCABS nu doar determină tratamentele care sunt diferite din punct de vedere statistic de martori (și anume, au o patologie mai severă decât martorii), ci determină, de asemenea, la ce punctaj de severitate apare diferența, oferind astfel un context atât de necesar pentru analiză. În cazul stabilirii stadiilor de dezvoltare la gonade și canalele de reproducere, ar trebui să se aplice o manipulare suplimentară a datelor, întrucât una dintre ipotezele RSCABS este aceea că gradul de severitate crește odată cu doza. Efectul observat ar putea fi o întârziere sau o accelerare a dezvoltării. Prin urmare, datele privind stadiile de dezvoltare ar trebui să fie analizate, astfel cum au fost consemnate, pentru a detecta accelerarea procesului de dezvoltare și apoi a trece manual la o a doua analiză pentru a detecta o întârziere în dezvoltare.

Figura 1

Arborele decizional al analizei statistice pentru datele LAGDA.



REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

Apendicele 8

CONSIDERENTE PRIVIND URMĂRIREA ȘI MINIMIZAREA APARIȚIEI SCOLIOZEI

Scolioza idiopatică, ce se manifestă, de obicei, prin coadă îndoită la mormoloci *Xenopus laevis*, ar putea complica observațiile morfologice și comportamentale la populațiile testate. Ar trebui să se depună eforturi pentru a reduce la minimum sau a elimina incidența scoliozei, atât în stoc, cât și în condiții de testare. În cadrul testului final, se recomandă ca prevalența scoliozei moderate și severe să fie sub 10 %, pentru o mai bună încredere că testul poate detecta efecte la nivelul dezvoltării care sunt corelate cu tratamentul la larvelor amfibieni care sunt sănătoase în alte condiții.

Observațiile zilnice din timpul testului final ar trebui să înregistreze atât incidența (numărul individual), cât și severitatea scoliozei, în cazul în care acestea există. Natura anomaliei ar trebui să fie descrisă cu referire la locație (de exemplu, anterior sau posterior față de cloacă) și direcția curburii (de exemplu, lateral sau dorsto-ventrală). Severitatea poate fi clasificată după cum urmează:

(NR) Nu este remarcabilă: nu există o curbură

(1) *Minimă:* ușoară, curbură laterală posterior față de cloacă; aparent doar în repaus

(2) *Moderată:* curbură laterală posterior față de cloacă; vizibilă în orice moment, dar nu împiedică deplasarea

(3) *Severă:* curbură laterală anterior față de cloacă; SAU orice curbură care inhibă deplasarea; SAU orice curbură dorso-ventrală

Un comitet științific consultativ FIFRA al US EPA (FIFRA SAP 2013) a analizat datele sintetizate pentru scolioză în cadrul a cincisprezece analize privind metamorfoza la amfibii pe *X. laevis* (de la stadiul NF 51 până la 60+) și a prezentat recomandări generale pentru reducerea prevalenței acestei anomalii la populațiile de testare. Recomandările sunt relevante pentru LAGDA, chiar dacă acest test cuprinde un calendar de dezvoltare mai lung.

Performanța istorică privind depunerea icrelor

În general, ca perechi de reproducție ar trebui să fie utilizați adulții sănătoși și de înaltă calitate; eliminarea perechilor de reproducție care produc pui cu scolioză poate reduce la minim apariția acesteia în timp. În mod specific, ar putea fi benefică reducerea la minimum a utilizării stocului de reproducere cu exemplare capturate în sălbăticie. Perioada de expunere LAGDA începe cu stadiul NF cu 8-10 embrioni și nu este posibil să se determine încă de la începutul testului dacă anumite exemplare vor prezenta scolioză. Astfel, în afară de urmărirea incidenței scoliozei la animalele supuse testului, ar trebui să se documenteze performanța istorică privind seria de icre (inclusiv prevalența scoliozei la orice larve permise să se dezvolte). Ar putea fi util să se monitorizeze în continuare porțiunea fiecărei serii de icre care nu sunt utilizate într-un anumit studiu și să se consemneze aceste observații (FIFRA SAP 2013).

Calitatea apei

Este important să se asigure o calitate adecvată a apei, atât în stocul din laborator, cât și în timpul testului. În plus față de criteriile privind calitatea apei, care sunt evaluate în mod curent pentru testele de toxicitate acvatică, poate fi util să se monitorizeze și să se corecteze orice deficiențe de nutrienți (de exemplu, deficiența de vitamina C, calciu, fosfor) sau nivelurile în exces de seleniu și de cupru, care sunt raportate a provoca scolioză în grade diferite la speciile crescute în laborator *Rana* sp. și *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; astfel cum au fost raportate în FIFRA 2013). Utilizarea unui regim alimentar adecvat (a se vedea apendicele 4) și curățarea periodică a bazinelor, vor îmbunătăți, în general, calitatea apei și sănătatea exemplarelor de testare.

Regimul alimentar

Recomandări specifice privind un regim alimentar, care se constată că au fost reușite în cazul LAGDA, sunt prezentate în detaliu în apendicele 4. Se recomandă ca sursele de hrană pentru animale să fie verificate pentru a detecta prezența toxinelor biologice, a erbicidelor și a altor pesticide despre care se știe că provoacă scolioză la *X. laevis* sau la alte animale acvatice (Schlenk și Jenkins 2013). Spre exemplu, expunerea la anumiți inhibitori ai colinesterazei a fost asociată cu scolioza la pești (Schultz *et al.* 1985) și broaște (Bacchetta *et al.* 2008).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara și 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 și R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley și 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 și 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 și P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D. și Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 2123 mai 2013. Washington, DC.”