II

(Nelegislatívne akty)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2019/1390

z 31. júla 2019,

ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES [1], a najmä na jeho článok 13 ods. 2,

keďže:

(1) Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 [2] obsahuje testovacie metódy na stanovenie fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity chemických látok, ktoré sa majú uplatňovať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006.

(2) Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) vypracúva harmonizované a medzinárodne schválené usmernenia na testovanie chemických látok na regulačné účely. OECD pravidelne vydáva nové a revidované usmernenia na testovanie chemických látok, pričom zohľadňuje vedecký pokrok v tejto oblasti.

(3) V nadväznosti na prijatie príslušných usmernení OECD na testovanie by sa mali stanoviť dve nové testovacie metódy na posúdenie ekotoxicity a deväť nových testovacích metód na stanovenie toxicity pre zdravie ľudí, pričom by sa malo aktualizovať sedem testovacích metód s cieľom zohľadniť technický pokrok a podľa možnosti vždy znížiť počet zvierat používaných na pokusné účely v súlade s článkom 13 ods. 2 nariadenia (ES) č. 1907/2006. Jedenásť z uvedených testovacích metód súvisí s testami *in vitro* na stanovenie podráždenia/poleptania kože a oka, kožnej citlivosti, genotoxicity a endokrinných účinkov. Navrhovaná zmena bola prekonzultovaná so zainteresovanými stranami.

[1] Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.

[2] Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 z 30. mája 2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) (Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1).

(4) Nariadenie (ES) č. 440/2008 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť.

(5) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného na základe článku 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení v súlade s prílohou k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 31. júla 2019

Za Komisiu
predseda
Jean-Claude JUNCKER

PRÍLOHA

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení takto:

1. V časti B sa kapitola B.4 nahrádza takto:

„B.4 **AKÚTNE PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 404 (2015). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne preskúmavajú, aby sa zabezpečilo, že odzrkadľujú najaktuálnejšie vedecké poznatky. Pri preskúmaní usmernenia OECD TG 404 sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam v súvislosti s dobrými životnými podmienkami zvierat a posúdeniu všetkých existujúcich informácií o testovanej chemikálii, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na laboratórnych zvieratách. Súčasťou aktualizovanej verzie usmernenia OECD TG 404 (ktoré bolo pôvodne prijaté v roku 1981 a revidované v rokoch 1992, 2002 a 2015) sú odkazy na usmerňovací dokument o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade podráždenia/poleptania kože (1), v ktorom sa navrhuje modulárny prístup k testovaniu podráždenia a poleptania kože. V rámci prístupu IATA sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, a i) poskytuje sa usmernenie o tom, ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie potenciálu chemikálií na spôsobenie podráždenia a poleptania kože a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (1). V uvedenom usmernení sa okrem toho podľa potreby odporúča v počiatočnom teste *in vivo* použiť postupne, a nie súčasne, tri testovacie náplasti na zviera.

2. Vymedzenia podráždenia a poleptania kože sú uvedené v dodatku k tejto testovacej metóde.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

3. V záujme vedeckej spoľahlivosti a dobrých životných podmienok zvierat sa testovanie *in vivo* nemá vykonávať, pokiaľ neboli všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálnym poleptaním/podráždením kože testovanou chemikáliou vyhodnotené v analýze váhy dôkazov, ako sa uvádza v usmerňovacom dokumente o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu v prípade podráždenia/poleptania kože, t. j. v rámci troch častí tohto usmernenia a príslušných modulov (1). Stručne možno uviesť, že časť 1 sa venuje existujúcim údajom v rámci siedmich modulov týkajúcich sa údajov o ľuďoch, údajov *in vivo*, údajov *in vitro*, údajov o fyzikálno-chemických vlastnostiach (napr. pH, obzvlášť silná kyslosť alebo zásaditosť) a údajom získaným z netestovacích metód. V časti 2 sa uskutočňuje analýza váhy dôkazov. Ak analýza váhy dôkazov nevedie k presvedčivým záverom, má sa uskutočniť časť 3 s dodatočným testovaním, pričom sa začína metódami *in vitro* a testovanie *in vivo* sa používa len ako posledná možnosť. Táto analýza tak zníži potrebu testovania *in vivo* na poleptanie/podráždenie kože testovanými chemikáliami, pre ktoré už existujú dostatočné dôkazy z iných štúdií k uvedeným dvom sledovaným parametrom.

PRINCÍP TESTU IN VIVO

4. Chemikália, ktorá sa má testovať, sa aplikuje v jednorazovej dávke na kožu pokusného zvieraťa; neošetrené časti kože testovaného zvieraťa slúžia ako kontrola. V stanovených intervaloch sa zistí a vyhodnotí stupeň podráždenia/poleptania a následne sa opíše, aby sa zabezpečilo kompletné posúdenie účinkov. Trvanie štúdie má byť dostatočné na posúdenie vratnosti alebo nevratnosti pozorovaných účinkov.

5. Zvieratá vykazujúce pretrvávajúce príznaky silného utrpenia a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu sa humánnym spôsobom usmrtia a testovaná chemikália sa na základe toho zatriedi. Kritériá pre rozhodnutie o humánnom usmrtení moribundných a silne trpiacich zvierat sú predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (2).

PRÍPRAVA NA TEST IN VIVO

Výber druhov zvierat

6. Ako laboratórne zviera sa prednostne používa králik – albín a použijú sa zdravé mladé dospelé králiky. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

Príprava zvierat

7. Približne 24 hodín pred testom sa dôkladným ostrihaním na chrbtovej časti trupu týchto zvierat odstráni srsť. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa koža neodrala, a použijú sa iba zvieratá so zdravou, neporušenou kožou.

8. Niektoré druhy králikov majú miesta s hustou srsťou, ktoré sa objavujú v určitých obdobiach roka. Takéto miesta, zarastené hustou srsťou, by sa nemali používať ako miesta na testovanie.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

9. Zvieratá by sa mali umiestniť jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 20 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala prevyšovať 70 %, cieľová relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie možno používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

TESTOVACÍ POSTUP

Aplikácia testovanej chemikálie

10. Testovaná chemikália sa aplikuje na malú plochu (približne 6 cm^2) kože a zakryje náplasťou z gázy, ktorá sa prichytí leukoplastom, ktorý nespôsobuje podráždenie. V prípadoch, keď nie je možná priama aplikácia (napr. kvapaliny alebo niektoré pasty), sa testovaná chemikália nanesie najskôr na náplasť z gázy, ktorá sa potom aplikuje na kožu. Náplasť sa voľne prichytí, aby bola v kontakte s kožou, pomocou vhodného semiokluzívneho obväzu počas trvania expozície. Ak sa testovaná chemikália aplikuje na náplasť, pripevní sa tak, aby mala dobrý kontakt s kožou a aby testovaná chemikália bola na koži rovnomerne rozložená. Je potrebné zabrániť tomu, aby zviera dosiahlo na náplasť a aby požilo alebo vdýchlo testovanú chemikáliu.

11. Kvapalné testované chemikálie sa spravidla aplikujú neriedené. Pri testovaní tuhých látok (ktoré sa môžu v prípade potreby rozotrieť na prach) sa testovaná chemikália navlhčí malým množstvom vody (alebo v prípade potreby iným vhodným nosičom), ktoré bude dostatočné na to, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Ak sa použijú iné nosiče ako voda, prípadný vplyv nosiča na podráždenie kože testovanou chemikáliou má byť minimálny.

12. Po skončení expozície, ktorá trvá zvyčajne štyri hodiny, sa zvyšná testovaná chemikália odstráni podľa potreby s použitím vody alebo vhodného rozpúšťadla bez toho, aby sa pozmenila existujúca reakcia alebo integrita epidermy.

Úroveň dávky

13. Na testované miesto sa aplikuje dávka 0,5 ml kvapaliny alebo 0,5 g tuhej látky alebo pasty.

Počiatočný test (test *in vivo* podráždenia/poleptania kože na jednom zvierati)

14. Keď sa na základe analýzy váhy dôkazov alebo predchádzajúceho testovania *in vitro* určí, že testovaná chemikália je žieravá, dráždivá alebo neklasifikovaná, zvyčajne nie je potrebné ďalšie testovanie *in vivo*. Avšak v prípadoch, keď sa považuje za odôvodnené získanie ďalších údajov, sa vykoná test *in vivo*, a to najskôr na jednom zvierati s využitím tohto prístupu. Postupne sa na zviera aplikujú najviac tri testovacie náplasti. Prvá náplasť sa odstráni po troch minútach. Ak sa nezistí závažná reakcia kože, na iné miesto sa aplikuje druhá náplasť, ktorá sa odstráni po jednej hodine. Ak zo zistení v tomto štádiu vyplýva, že je humánne, aby sa expozícia mohla predĺžiť na štyri hodiny, aplikuje sa tretia náplasť, ktorá sa odstráni po štyroch hodinách, a reakcia sa vyhodnotí.

15. Ak sa zistí žieravý účinok po ktorejkoľvek z troch postupných expozícií, test sa ihneď ukončí. Ak sa po odstránení poslednej náplasti nezistí žieravý účinok, zviera sa pozoruje 14 dní, pokiaľ sa poleptanie neprejaví skôr.

16. V tých prípadoch, keď sa neočakáva, že testovaná chemikália spôsobí poleptanie, ale môže byť dráždivá, aplikuje sa jediná náplasť jednému zvieraťu na štyri hodiny.

Potvrdzujúci test (test *in vivo* podráždenia kože na ďalších zvieratách)

17. Ak sa nezistí žieravý účinok v počiatočnom teste, dráždivá alebo negatívna reakcia sa potvrdí na maximálne dvoch ďalších zvieratách, každé s jednou náplasťou s časom expozície štyri hodiny. Ak sa v počiatočnom teste zistí dráždivý účinok, môže sa vykonať potvrdzujúci test postupným spôsobom alebo expozíciou dvoch ďalších zvierat súčasne. Vo výnimočnom prípade, keď sa neuskutoční počiatočný test, dvom alebo trom zvieratám sa môže aplikovať jediná náplasť, ktorá sa odstráni po štyroch hodinách. V prípade, keď sa použijú dve zvieratá, ak obidve vykazujú rovnakú reakciu, nie je potrebné ďalšie testovanie. V opačnom prípade sa testuje aj tretie zviera. Môže byť potrebné, aby sa nejednoznačné reakcie vyhodnotili na ďalších zvieratách.

Obdobie pozorovania

18. Dĺžka obdobia pozorovania má byť dostatočná na celkové posúdenie vratnosti zistených účinkov. Pokus je však potrebné ukončiť vždy, keď zviera vykazuje pretrvávajúce príznaky silnej bolesti alebo utrpenia. Na určenie vratnosti účinkov sa zvieratá pozorujú do 14 dní po odstránení náplastí. Ak sa vratnosť pozoruje pred uplynutím 14 dní, pokus by sa mal v tej chvíli ukončiť.

Klinické pozorovania a vyhodnotenie kožných reakcií

19. Všetky zvieratá sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože) a edému (opuchu), a reakcie sa vyhodnotia po 60 minútach a potom po 24, 48 a 72 hodinách po odstránení náplasti. V prípade počiatočného testu na jednom zvierati sa testované miesto vyšetrí aj bezprostredne po odstránení náplasti. Kožné reakcie sa vyhodnotia a zaznamenajú podľa stupňov v tabuľke uvedenej ďalej. Ak sa po 72 hodinách vyskytne poškodenie kože, ktoré nie je možné označiť ako podráždenie alebo poleptanie, budú potrebné pozorovania až do 14. dňa, aby sa určila vratnosť účinkov. Okrem pozorovania podráždenia sa celkove opíšu a zaznamenajú všetky lokálne toxické účinky, ako je napríklad odmastenie pokožky, a všetky systémové nežiaduce účinky (napr. účinky na klinické toxické príznaky a telesnú hmotnosť). Na objasnenie nejednoznačných reakcií je potrebné uvažovať o vykonaní histopatologického vyšetrenia.

20. Vyhodnotenie kožných reakcií je nevyhnutne subjektívne. Na podporu zosúladenia pri vyhodnocovaní kožnej reakcie a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní výsledkov, zamestnanci uskutočňujúci vyšetrenia musia byť primerane vyškolení na používanie systému hodnotenia (pozri tabuľku uvedenú ďalej). Užitočnou by mohla byť ilustrovaná príručka na vyhodnotenie podráždenia kože a iných lézií (3).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

21. Výsledky štúdie sa zhrnú v podobe tabuliek v záverečnej správe o teste a zahŕňajú všetky body uvedené v odseku 24.

Vyhodnotenie výsledkov

22. Stupne podráždenia kože sa posudzujú v súvislosti s charakterom a závažnosťou lézií a ich vratnosťou alebo nevratnosťou. Jednotlivé stupne nepredstavujú absolútne kritérium pre dráždivé vlastnosti materiálu, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovaného materiálu. Skôr je potrebné na jednotlivé stupne nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré sa majú posudzovať v súvislosti s inými pozorovaniami zo štúdie.

23. Pri hodnotení dráždivých reakcií je potrebné posúdiť vratnosť poškodení kože. Keď reakcie ako alopécia (obmedzená), hyperkeratóza, hyperplázia a šupinatosť pretrvávajú do konca 14-dňového obdobia pozorovania, testovaná chemikália sa pokladá za dráždivú.

Správa o teste

24. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Zdôvodnenie testovania in vivo:

— analýza váhy dôkazov na základe údajov z predchádzajúcich testov vrátane výsledkov stratégie postupného testovania,

— opis relevantných údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,

— údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,

— opis uskutočnených testov *in vitro* vrátane podrobných údajov o postupoch, získaných výsledkov s testovanými/referenčnými látkami,

— analýza váhy dôkazov pre uskutočnenie štúdie *in vivo*.

Testovaná chemikália:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— viaczložková látka, zmes a látky neznámeho alebo variabilného zloženia, komplexné reakčné produkty alebo biologické materiály (UVCB): charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe,

— podmienky skladovania.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (ak je to vhodné), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň, zdôvodnenie použitia iných zvierat ako králika – albína,

— počet zvierat každého pohlavia,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu,

— vek na začiatku štúdie,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testovania:

— technika prípravy miesta aplikácie náplasti,

— podrobnosti o materiáloch náplastí a postupe vykonania náplasťového testu,

— podrobnosti o príprave testovanej chemikálie, jej aplikácii a odstránení.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie stupňov reakcie podráždenia/poleptania pre každé zviera vo všetkých meraných časoch,

— opisy všetkých pozorovaných lézií,

— podrobný opis charakteru a stupňa zisteného podráždenia alebo poleptania a všetky histopatologické pozorovania,

— opis iných nepriaznivých lokálnych (napr. odmastenie kože) a systémových účinkov okrem podráždenia kože alebo poleptania.

Diskusia k výsledkom

Záver

LITERATÚRA

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

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

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

Tabuľka

Vyhodnotenie Reakcií Kože

Vytvorenie erytému alebo chrasty

Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej vyhodnoteniu erytému	4

Maximálny možný stupeň: 4

Vytvorenie edému

Žiadny edém	0
Veľmi slabý edém (sotva pozorovateľný)	1
Slabý edém (okraje oblasti jasne ohraničené zreteľným opuchom)	2
Mierny edém (opuch približne 1 mm)	3
Výrazný edém (opuch viac ako 1 mm a presahujúci za oblasť expozície)	4

Maximálny možný stupeň: 4

Na objasnenie nejednoznačných reakcií sa môže vykonať histopatologické vyšetrenie.

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália je látka alebo zmes.

Podráždenie kože je vznik vratného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín.

Poleptanie kože je vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch strata farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.“

2. V časti B sa kapitola B.17 nahrádza takto:

„B.17 ***IN VITRO* TESTY NA GÉNOVÉ MUTÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK S VYUŽITÍM GÉNOV HPRT A XPRT**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 476 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Táto súčasná revidovaná verzia TM B.17 zohľadňuje takmer tridsaťročné skúsenosti s týmto testom, ako aj výsledky z vývoja samostatnej novej metódy zameranej na *in vitro* testy na génové mutácie cicavčích buniek s využitím génu tymidínkinázy. TM B.17 je súčasťou série testovacích metód v oblasti genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (1).

2. *In vitro* test na génové mutácie cicavčích buniek sa používa na zistenie génových mutácií vyvolaných chemikáliami. V bunkových líniách, ktoré sa používajú v týchto testoch, sa merajú priame mutácie v reportérových génoch, konkrétne v endogénnom géne hypoxantín-guanín-fosforibozyltransferázy (Hprt v bunkách hlodavcov, HPRT v ľudských bunkách; v tejto testovacej metóde spoločne označované ako gén Hprt a test HPRT) a prenesenom géne xantín-guanín-fosforibozyltransferázy (gpt) (označovaný ako test XPRT). Testmi mutácií HPRT a XPRT sa zisťuje rôzne spektrum genetických udalostí. Okrem mutačných udalostí zisťovaných testom HPRT (napr. bázové zámeny, posuny čítacieho rámca, malé delécie a včlenenia) možno pomocou autozomálnej lokalizácie preneseného génu gpt zistiť mutácie v dôsledku veľkých delécií a prípadne mitotickej rekombinácie, ktorá sa nezistila prostredníctvom testu HPRT, pretože gén Hprt sa nachádza v X-chromozóme (2) (3) (4) (5) (6) (7). Pokiaľ ide o regulačné účely, test XPRT sa v súčasnosti využíva menej často než test HPRT.

3. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. Testy vykonávané *in vitro* si vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Exogénny systém metabolickej aktivácie nenapodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*.

5. Je potrebné dbať na to, aby sa predišlo podmienkam, ktoré by viedli k falošným pozitívnym výsledkom (t. j. možnej interakcii so systémom testovania), ktoré by neboli spôsobené priamou interakciou medzi testovanými chemikáliami a genetickým materiálom bunky, pričom medzi takéto podmienky patria zmeny pH alebo osmolality (8) (9) (10), interakcia so zložkami média (11) (12) alebo nadmerné úrovne cytotoxicity (13). Cytotoxicita, ktorá prekračuje odporúčané horné hranice cytotoxicity uvedené v odseku 19, sa na účely testu HPRT považuje za nadmernú.

6. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

PRINCÍP TESTU

7. Mutantné bunky s nedostatočnou enzymatickou aktivitou Hprt v teste HPRT alebo enzymatickou aktivitou xprt v teste XPRT sú rezistentné voči cytostatickým účinkom purínového analógu 6-tioguanínu (TG). Bunky s dostatkom Hprt (v teste HPRT) alebo gpt (v teste XPRT) sú citlivé na TG, čo spôsobuje inhibíciu bunkového metabolizmu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Mutantné bunky sú tak schopné rozširovať sa za prítomnosti TG, zatiaľ čo normálne bunky, ktoré obsahujú Hprt (v teste HPRT) alebo gpt (v teste XPRT), toho schopné nie sú.

8. Bunky v suspenzii alebo jednovrstvových kultúrach sa vystavia testovanej chemikálii s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie i bez takéhoto zdroja (pozri odsek 14) na primeraný čas (3 – 6 hodín) a následne sa subkultivujú na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypového prejavu pred mutantnou selekciou (14) (15) (16) (17). Cytotoxicita sa určuje na základe relatívneho prežitia (RS), t. j. klonovacej účinnosti meranej bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s negatívnou kontrolou (odsek 18 a dodatok 2). Ošetrené kultúry sa dostatočné obdobie, charakteristické pre každý typ buniek, udržiavajú v médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypový prejav indukovaných mutácií (zvyčajne minimálne 7 – 9 dní). Po fenotypovom prejave sa frekvencia mutácií stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných kolónií a do média bez selektívneho činidla na stanovenie klonovacej účinnosti (životaschopnosti). Po vhodnom inkubačnom čase sa kolónie zrátajú. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií s korekciou podľa klonovacej účinnosti v čase mutantnej selekcie.

OPIS METÓDY

Príprava

Bunky

9. Typy buniek použité na testy HPRT a XPRT majú mať preukázanú citlivosť na chemické mutagény, vysokú klonovaciu účinnosť, stabilný karyotyp a stabilnú frekvenciu spontánnych mutácií. Medzi najčastejšie používané bunky v teste HPRT patria línie CHO, CHL a V79 buniek škrečkov čínskych, lymfómové bunky myší L5178Y a TK6 ľudské lymfoblastoidné bunky (18) (19). Bunky AS52 odvodené od CHO, ktoré obsahujú prenesený gén gpt (a majú deletovaný gén Hprt), sa používajú pre test XPRT (20) (21); test HPRT nemožno uskutočniť na bunkách AS52 v dôsledku delécie génu hprt. Použitie iných bunkových línií má byť opodstatnené a validované.

10. Bunkové línie by sa mali pravidelne kontrolovať, pokiaľ ide o stabilitu modálneho počtu chromozómov a o vylúčenie kontaminácie mykoplazmou (22) (23), a v prípade kontaminácie alebo zmeny modálneho počtu chromozómov by sa nemali použiť. Mala by sa stanoviť dĺžka bežného bunkového cyklu pri použití v skúšobnom laboratóriu, ktorá by mala byť v súlade s bunkovými charakteristikami uvedenými v literatúre. Je potrebné skontrolovať aj frekvenciu spontánnych mutácií v zásobe materských buniek a nepoužívať zásobu v prípade neprijateľnej frekvencie mutácií.

11. Pred použitím v tomto teste sa kultúry podľa potreby prečistia od existujúcich mutantných buniek, napr. kultiváciou v médiu HAT pre test HPRT a v médiu MPA pre test XPRT (5) (24) (pozri dodatok 1). Prečistené bunky možno kryogénne zakonzervovať a následne rozmraziť, aby ich bolo možné používať ako pracovné zásoby. Nanovo rozmrazenú pracovnú zásobu možno používať na účely testu, keď sa dosiahnu normálne časy zdvojenia. Pri vykonávaní testu XPRT sa pre rutinnú kultúru buniek AS52 používajú podmienky, ktoré zabezpečujú udržiavanie preneseného génu gpt (20).

Médiá a podmienky kultivácie

12. Na udržiavanie kultúr by sa malo použiť vhodné kultivačné médium a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, atmosféra s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2, inkubačná teplota 37 °C). Bunkové kultúry sa majú vždy udržiavať v podmienkach, v ktorých je zabezpečené, že ich rast prebieha v logaritmickej fáze. Osobitne dôležité je zvoliť médium a podmienky kultivácie tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas doby expresie a optimálna klonovacia účinnosť mutantných aj nemutantných buniek.

Príprava kultúr

13. Bunkové línie sa rozmnožujú zo zásobných kultúr, nasadia sa do kultivačného média v takej hustote, aby pri bunkách v suspenziách alebo v jednovrstvových bunkových kultúrach pokračoval exponenciálny rast počas času ošetrenia a doby expresie (napr. malo by sa zabrániť zhlukovaniu v prípade buniek rastúcich v jednovrstvových bunkových kultúrach).

Metabolická aktivácia

14. Ak sa použijú bunky s nedostatočnou endogénnou metabolickou kapacitou, mali by sa použiť exogénne systémy metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom, ktorý sa štandardne odporúča, pokiaľ to nie je odôvodnené inak, je kofaktormi obohatená postmitochondriálna frakcia (S9) pripravená z pečene hlodavcov (väčšinou potkanov) ošetrená činidlami na indukciu enzýmov, ako je napríklad Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) alebo kombinácia fenobarbitalu a β-naftoflavónu (29) (30) (31) (32). Použitie uvedenej kombinácie nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (33) a preukázalo sa, že táto kombinácia je rovnako účinná pri indukcii oxidáz so zmiešanou funkciou ako Aroclor 1254 (29) (31). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách od 1 obj. % do 2 obj. %, môže sa však zvýšiť až na 10 obj. %. Výber typu a koncentrácie použitého exogénneho systému metabolickej aktivácie alebo metabolického induktora môže ovplyvniť trieda testovaných látok (34) (35) (36).

Príprava testovanej chemikálie

15. Testované chemikálie v tuhom skupenstve by sa podľa potreby mali rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle pred ich aplikáciou na bunky (pozri odsek 16). Kvapalné testované chemikálie možno pridať priamo do testovacieho systému a/alebo pred aplikáciou na testovací systém rozriediť. Plynné alebo prchavé testované chemikálie by sa mali testovať tak, že sa štandardné protokoly vhodne upravia, napríklad sa v nich uskutoční aplikácia v uzavretých kultivačných nádobách (37) (38). Prípravky testovanej chemikálie by sa mali pripraviť bezprostredne pred aplikáciou, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

PODMIENKY TESTOVANIA

Rozpúšťadlá

16. Rozpúšťadlo by sa malo zvoliť tak, aby sa optimalizovala rozpustnosť testovaných chemikálií bez toho, aby rozpúšťadlo malo negatívny vplyv na vykonávanie testu (napr. zmenou rastu buniek), ovplyvňovalo integritu testovanej chemikálie, reagovalo s kultivačnými nádobami a narušovalo systém metabolickej aktivácie. Odporúča sa, pokiaľ je to možné, najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla (alebo kultivačného média). Medzi osvedčené rozpúšťadlá patrí napr. voda a dimetylsulfoxid. Organické rozpúšťadlá by vo všeobecnosti nemali presiahnuť 1 obj. % a vodné rozpúšťadlá (fyziologický roztok alebo voda) by nemali presiahnuť 10 obj. % v konečnom médiu s testovanou chemikáliou. Ak sa použijú iné ako osvedčené rozpúšťadlá (napr. etanol alebo acetón), ich použitie by malo byť podložené údajmi o ich kompatibilite s testovanou chemikáliou a testovacím systémom a o tom, že v použitej koncentrácii nie sú genotoxické. V prípade, že tieto podkladové údaje nie sú k dispozícii, je dôležité do testu doplniť neošetrené kontroly (pozri dodatok 1) s cieľom preukázať, že zvolené rozpúšťadlo nevyvoláva žiadne nepriaznivé ani mutagénne účinky.

Meranie cytotoxicity a výber expozičných koncentrácií

17. Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by sa malo zabrániť použitiu koncentrácií, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne reakcie, napr. koncentrácií vyvolávajúcich nadmernú cytotoxicitu (pozri odsek 20), zrážanie kultivačného média (pozri odsek 21) alebo výrazné zmeny pH alebo osmolality (pozri odsek 5). Ak testovaná chemikália v čase, keď sa pridáva, spôsobuje výraznú zmenu pH média, mohlo by sa pH upraviť aplikovaním tlmivého roztoku do konečného média s testovanou chemikáliou tak, aby nedošlo k falošným pozitívnym výsledkom a aby sa zachovali vhodné kultivačné podmienky.

18. Koncentrácia sa určuje na základe cytotoxicity a iných faktorov (pozri odseky 20 – 22). Aj keď z hľadiska lepšieho definovania koncentrácií, ktoré sa majú použiť v hlavnom experimente, môže byť užitočné hodnotenie cytotoxicity v počiatočnom teste, počiatočný test nie je povinný. Aj keď sa vykoná počiatočné hodnotenie cytotoxicity, vyžaduje sa aj meranie cytotoxicity jednotlivých kultúr v hlavnom experimente. Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia (RS), t. j. klonovacej účinnosti (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia, a to na základe počtu buniek v porovnaní s upravenou klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %) (pozri vzorec v dodatku 2).

19. Mali by sa vyhodnotiť aspoň štyri testovacie koncentrácie (bez rozpúšťadla a pozitívnych kontrol), ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (vhodná cytotoxicita, počet buniek atď.). Hoci sa odporúča použitie duplicitných kultúr, pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť buď paralelné kultúry, alebo jednotlivé ošetrené kultúry. Výsledky získané z nezávislých paralelných kultúr pri danej koncentrácii sa majú uvádzať samostatne, možno ich však zlúčiť na účely analýzy údajov (17). V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú malú alebo nevykazujú žiadnu cytotoxicitu, budú za bežných okolností vhodné približne dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrácií. Pri výskyte cytotoxicity by vybrané testované koncentrácie mali pokrývať rozsah od koncentrácie, ktorá vyvoláva cytotoxicitu, po koncentrácie, pri ktorých je cytotoxicita mierna a slabá alebo žiadna. Mnohé testované chemikálie vykazujú strmé krivky závislosti reakcie od koncentrácie a s cieľom pokryť celý rozsah cytotoxicity alebo podrobne preskúmať vzťah medzi koncentráciou a reakciou môže byť nevyhnutné použiť viac koncentrácií s tesným odstupom a viac ako štyri koncentrácie, najmä v situáciách, keď sa vyžaduje opakovať experiment (pozri odsek 43). Použitie viac ako štyroch koncentrácií môže byť obzvlášť dôležité pri použití jednotlivých kultúr.

20. Ak maximálna koncentrácia vychádza z cytotoxicity, cieľová najvyššia koncentrácia by mala mať hodnotu relatívneho prežitia v rozsahu 20 až 10 %. Pri interpretácii pozitívnych výsledkov, ktoré sa zistili len pri hodnote relatívneho prežitia 10 % alebo nižšej, je potrebné postupovať obozretne (odsek 43).

21. V prípade slabo rozpustných testovaných chemikálií, ktoré nie sú cytotoxické pri koncentráciách nižších, než je najnižšia nerozpustná koncentrácia, by najvyššia analyzovaná koncentrácia mala na konci ošetrenia testovanou chemikáliou vyvolať zakalenie alebo zrazeninu viditeľnú voľným okom alebo pomocou inverzného mikroskopu. Aj keď sa cytotoxicita vyskytne pri koncentrácii vyššej, ako je najnižšia nerozpustná koncentrácia, testovať sa odporúča len pri jednej koncentrácii vyvolávajúcej zakalenie alebo viditeľnú zrazeninu, pretože falošné účinky môžu byť spôsobené zrazeninou. Pri koncentrácii vyvolávajúcej zrazeninu je potrebné zabezpečiť, aby táto zrazenina nenarušovala vykonávanie testu. Môže byť užitočné pred experimentom stanoviť rozpustnosť v kultivačnom médiu.

22. Ak sa nezistí žiadna zrazenina ani obmedzujúca cytotoxicita, najvyššia testovaná koncentrácia by mala zodpovedať 10 mM, 2 mg/ml alebo 2 µl/ml, podľa toho, ktorá je najnižšia (39) (40). Keď testovaná chemikália nemá určené zloženie, napr. látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály [t. j. chemické látky neznámeho alebo variabilného zloženia (UVCB)] (41), extrakty z prostredia atď., môže byť potrebná vyššia maximálna koncentrácia (napr. 5 mg/mL) v prípade absencie dostatočnej cytotoxicity, aby sa zvýšila koncentrácia jednotlivých zložiek. Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (42).

Kontroly

23. Pre všetky experimentálne podmienky by sa mali zahrnúť súbežné negatívne kontroly (pozri odsek 16), ktoré pozostávajú zo samotného rozpúšťadla v médiu s testovanou chemikáliou a s ktorými sa manipuluje rovnakým spôsobom ako s ošetrenými kultúrami.

24. Súbežné pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti laboratória identifikovať mutagény v podmienkach použitého testovacieho protokolu a v prípade potreby aj na preukázanie účinnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Príklady pozitívnych kontrol sú uvedené v tabuľke 1 ďalej. V odôvodnených prípadoch sa môžu na pozitívnu kontrolu použiť alternatívne látky. Keďže testy na cicavčích bunkách *in vitro* na zistenie genetickej toxicity sú dostatočne štandardizované, možno testy využívajúce ošetrenia s exogenóznou metabolickou aktiváciou a bez takejto aktivácie uskutočniť len pomocou pozitívnej kontroly vyžadujúcej metabolickú aktiváciu. V tomto prípade reakcia na túto jednu pozitívnu kontrolu preukáže činnosť systému metabolickej aktivácie, ako aj vnímavosť testovacieho systému. Každá pozitívna kontrola sa má použiť pri jednej alebo viacerých koncentráciách, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast voči pozadiu s cieľom preukázať citlivosť testovacieho systému, pričom reakciu by nemalo narušiť prekročenie limitov cytotoxicity, ktoré sú stanovené pre túto testovaciu metódu (pozri odsek 20).

Tabuľka 1

Referenčné látky odporúčané na posúdenie spôsobilosti laboratória a na výber pozitívnych kontrol

Stav metabolickej aktivácie	Lokus	Látka a číslo CAS
neprítomnosťexogénnej metabolickej aktivácie	*Hprt*	etyl-metánsulfonát [č. CAS 62-50-0] N-etyl-N-nitrózomočovina [č. CAS 759-73-9] 4-nitrochinolín-1-oxid [č. CAS 56-57-5]
	xprt	streptonigrín [č. CAS 3930-19-6] mitomycín C [č. CAS 50-07-7]
prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	*Hprt*	3-metylcholantrén [č. CAS 56-49-5] 7,12-dimetylbenzantracén [č. CAS 57-97-6] benzo[a]pyrén (č. CAS 50-32-8)
	xprt	benzo[a]pyrén (č. CAS 50-32-8)

POSTUP

Ošetrenie testovanou chemikáliou

25. Proliferujúce bunky sa ošetria testovanou chemikáliou za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie. Expozícia trvá primeraný čas (primeraný čas je zvyčajne 3 až 6 hodín).

26. Minimálny počet buniek použitých v každej z testovacích kultúr (kontrolnej aj ošetrenej) v každom štádiu testu je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným usmernením je ošetriť a subkultivovať dostatočný počet buniek na to, aby sa vo všetkých štádiách testu vo všetkých kultúrach zachovalo 10 spontánnych mutantov (17). Frekvencia spontánnych mutácií je vo všeobecnosti v rozsahu 5 až 20×10^{-6}. Na dosiahnutie frekvencie spontánnych mutácií 5×10^{-6} a zachovanie dostatočného počtu spontánnych mutantov (najmenej 10) aj pri kultúrach ošetrených pomocou koncentrácií, ktoré počas ošetrenia spôsobujú 90 % cytotoxicitu (10 % relatívne prežitie), by bolo potrebné ošetriť aspoň 20 × 106 buniek. Okrem toho sa počas doby expresie musí kultivovať a naočkovať na účely mutantnej selekcie dostatočný počet buniek (nikdy nie menej ako 2 milióny) (17).

Čas do prejavenia fenotypu a meranie frekvencie mutácií

27. Po období ošetrenia sa vykoná kultivácia buniek, aby sa mohol prejaviť mutantný fenotyp. Najmenej 7 až 9 dní je vo všeobecnosti dostatočných, aby bol možný takmer optimálny fenotypový prejav novoindukovaných mutantov Hprt a xprt (43) (44). Počas tohto času sa bunky pravidelne subkultivujú, aby sa zachoval ich exponenciálny rast. Po fenotypovom prejave sa bunky opätovne naočkujú do média so selektívnym činiteľom aj bez selektívneho činiteľa (6-tioguanín) na stanovenie počtu mutantov, resp. klonovacej účinnosti v čase selekcie. Na toto očkovanie možno použiť Petriho misky na jednovrstvové bunkové kultúry alebo mikrotitračné platničky pre bunky v suspenzii. Na účely mutantnej selekcie sa bunky naočkujú s takou hustotou, aby sa zabezpečila optimálna výťažnosť mutantov (t. j. aby sa predišlo metabolickému spolupôsobeniu) (17). Misky sa inkubujú primeraný čas na zabezpečenie optimálneho rastu kolónie (napr. 7 – 12 dní) a kolónie sa spočítajú. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií s korekciou podľa klonovacej účinnosti v čase mutantnej selekcie (pozri vzorce v dodatku 2).

Spôsobilosť laboratória

28. Na to, aby sa pred vykonaním rutinného testu zistilo, či má laboratórium s danou skúškou dostatočné skúsenosti, malo by mať vykonanú sériu pokusov s referenčnými pozitívnymi látkami pôsobiacimi prostredníctvom rôznych mechanizmov (aspoň jedna látka aktívna s metabolickou aktiváciou a jedna látka aktívna bez metabolickej aktivácie, vybraté z látok uvedených v tabuľke 1) a s rôznymi negatívnymi kontrolami (pri použití rôznych rozpúšťadiel/nosičov). Reakcie týchto pozitívnych a negatívnych kontrol by mali byť v súlade s príslušnou literatúrou. Tento postup sa nepoužije v prípade laboratórií, ktoré majú skúsenosti, t. j. ktoré majú k dispozícii databázu historických údajov, ako sa definuje v odsekoch 30 až 33.

29. Mal by sa preskúmať výber látok na pozitívnu kontrolu (pozri tabuľku 1 v odseku 25) za neprítomnosti aj za prítomnosti metabolickej aktivácie, aby sa preukázala spôsobilosť zistiť mutagénne chemikálie, stanoviť účinnosť systému metabolickej aktivácie a preukázať vhodnosť podmienok pre rast buniek počas ošetrovania, fenotypového prejavu a mutatnej selekcie, ako aj vhodnosť postupov hodnotenia. Rozsah koncentrácií vybraných látok by sa mal zvoliť tak, aby poskytol opakovateľné zvýšenia súvisiace s jednotlivými koncentráciami v porovnaní s úrovňou pozadia, aby sa tak preukázala citlivosť a dynamické rozpätie testovacieho systému.

Údaje o historických kontrolách

30. Laboratórium by malo určiť:

— rozsah a distribúciu historických pozitívnych kontrol,

— rozsah a distribúciu historických negatívnych kontrol (neošetrených, s rozpúšťadlom).

31. Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s distribúciou historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi o kontrolách (22). S pridávaním ďalších experimentálnych údajov k distribúcii kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tejto distribúcie (17) (45) (46).

32. Databázu historických negatívnych kontrol laboratória by na začiatku malo tvoriť minimálne 10 experimentov, ale podľa možnosti by mala pozostávať aspoň z 20 experimentov vykonaných za porovnateľných experimentálnych podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (47)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov týkajúcich sa pozitívnych a negatívnych kontrol a preukázať, že metodika v danom laboratóriu je „pod kontrolou“ (46). Ďalšie odporúčania k vytváraniu a využívaniu historických údajov (t. j. kritériá zaradenia údajov medzi historické údaje a ich vylúčenia z historických údajov a kritériá prijateľnosti v prípade daného experimentu) možno nájsť v literatúre (45).

33. Údaje o negatívnych kontrolách majú obsahovať frekvencie mutácií z jednej alebo prednostne z paralelných kultúr podľa opisu v odseku 23. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí distribúcie databázy historických negatívnych kontrol laboratória (17) (45) (46). V prípade, že údaje o súbežných negatívnych kontrolách nepatria do 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do distribúcie historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne mimo uvedených medzí a pokiaľ existujú dôkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri vyššie), a dôkazy o tom, že nedošlo k technickému alebo ľudskému zlyhaniu.

34. Všetky zmeny v skúšobnom protokole by sa mali zvážiť z hľadiska ich súladu s existujúcimi databázami historických kontrol laboratória. Každý výrazný nesúlad by mal viesť k vytvoreniu novej databázy historických kontrol.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Prezentovanie výsledkov

35. Súčasťou prezentovania výsledkov majú byť všetky údaje potrebné na výpočet cytotoxicity (vyjadrenej ako relatívne prežitie). Tieto údaje, ktoré sa uvádzajú pre ošetrené aj kontrolné kultúry, obsahujú počet buniek na konci ošetrenia, počet buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení a počty kolónií (alebo počet jamiek bez kolónií v prípade mikrotitračnej metódy). Relatívne prežitie jednotlivých kultúr sa vyjadruje ako percentuálna hodnota vzhľadom na súbežnú kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1).

36. Súčasťou prezentovania výsledkov majú byť aj všetky údaje potrebné na výpočet frekvencie mutácií. Údaje, ktoré sa uvádzajú pre ošetrené aj kontrolné kultúry, obsahujú: 1. počet buniek naočkovaných so selektívnym činiteľom a bez selektívneho činiteľa (v čase naočkovania buniek na účely mutantnej selekcie) a 2. počet spočítaných kolónií (alebo počet jamiek bez kolónií v prípade mikrotitračnej metódy) z misiek so selektívnym činiteľom a bez selektívneho činiteľa. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií (v miskách so selektívnym činiteľom) s korekciou podľa klonovacej účinnosti (z misiek bez selektívneho činiteľa). Frekvencia mutácií sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na milión životaschopných buniek (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1).

37. Mali by sa uvádzať údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa dodatočne sumarizujú v tabuľkovej forme.

Kritériá prijateľnosti

38. Prijateľnosť testu je založená na týchto kritériách:

— Súbežná negatívna kontrola sa považuje za prijateľnú na doplnenie do databázy historických negatívnych kontrol laboratória, ako je opísané v odseku 33.

— Súbežné pozitívne kontroly (pozri odsek 24) by mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v databáze historických pozitívnych kontrol, a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou.

— Testovali sa dve experimentálne podmienky (t. j. s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie), pokiaľ jedna z nich neviedla k pozitívnym výsledkom (pozri odsek 25).

— Analyzovateľný je adekvátny počet buniek a koncentrácií (odseky 25, 26 a 19).

— Kritériá výberu najvyššej koncentrácie sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 20, 21 a 22.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

39. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak pre ktorúkoľvek z preskúmaných experimentálnych podmienok platí, že:

— aspoň jedna z testovaných koncentrácií vykazuje štatisticky významné zvýšenie v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— ide o nárast, pri ktorom sa pri hodnotení vhodným testovaním trendov potvrdí súvislosť s koncentráciou,

— niektorý z týchto výsledkov je mimo distribúcie údajov historických negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 33).

Ak sú splnené všetky tieto kritériá, testovaná chemikália sa považuje za schopnú vyvolať génové mutácie v kultivovaných bunkách cicavcov v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (46) (48).

40. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne negatívnu, ak pre všetky preskúmané experimentálne podmienky platí, že:

— ani jedna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— hodnotenie pomocou vhodného testovania trendov ukáže, že nedochádza k nárastu v závislosti od koncentrácie,

— všetky výsledky sa vyskytujú v rámci distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. v 95 % regulačných medziach Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 33).

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať génové mutácie v kultivovaných bunkách cicavcov v tomto testovacom systéme.

41. Neexistuje požiadavka na potvrdenie jednoznačne pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

42. V prípade, že reakcia nie je jednoznačne negatívna ani jednoznačne pozitívna podľa uvedeného opisu, alebo v prípade, že ide o pomoc pri stanovovaní biologickej relevantnosti výsledku, by sa údaje mali odborne posúdiť a/alebo podrobiť ďalšiemu skúmaniu. Prípadne by mohlo byť užitočné uskutočnenie opakovaného experimentu pomocou zmenených experimentálnych podmienok [napr. odstup medzi koncentráciami, iné podmienky metabolickej aktivácie (t. j. koncentrácia S9 alebo pôvod S9)].

43. V zriedkavých prípadoch neumožní súbor údajov ani po ďalšom skúmaní vyvodiť záver o pozitívnom alebo negatívnom výsledku. Reakcia na testovanú chemikáliu sa preto uzavrie ako nejednoznačná (interpretovaná ako s rovnakou pravdepodobnosťou pozitívna alebo negatívna).

Správa o teste

44. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— percentuálny podiel rozpúšťadla v konečnom kultivačnom médiu.

Bunky:

Pre hlavné laboratórne kultúry:

— typ, zdroj bunkových línií,

— počet pasáží, ak je dostupný, a história laboratória,

— vlastnosti karyotypu a/alebo modálny počet chromozómov,

— metódy udržiavania bunkových kultúr,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— časy zdvojenia buniek.

Podmienky testovania:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzení rozpustnosti,

— skladba média, koncentrácia CO_2, úroveň vlhkosti,

— koncentrácia testovanej chemikálie vyjadrená ako konečná koncentrácia v kultivačnom médiu (napr. µg alebo mg/ml alebo mM kultivačného média),

— koncentrácia (a/alebo objem) rozpúšťadla a testovanej chemikálie pridaných do kultivačného média,

— inkubačná teplota,

— inkubačný čas,

— trvanie ošetrenia,

— hustota buniek počas ošetrenia,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie (zdroj S9, metóda prípravy zmesi S9, koncentrácia alebo objem zmesi S9 a S9 v konečnom kultivačnom médiu, kontroly kvality S9),

— látky na pozitívnu a negatívnu kontrolu, konečné koncentrácie pre každú z podmienok ošetrenia;

— dĺžka doby expresie (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),

— identita selektívneho činiteľa a jeho koncentrácia,

— kritériá prijateľnosti testov,

— metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,

— metódy použité na meranie cytotoxicity,

— akékoľvek doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity a použitej metódy,

— dĺžka inkubačného času po očkovaní,

— kritériá na považovanie štúdií za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné,

— metódy použité na určenie pH, osmolality a zrážania.

Výsledky:

— počet ošetrených buniek a počet subkultivovaných buniek pre jednotlivé kultúry,

— merania cytotoxicity a prípadné iné pozorovania,

— známky zrážania a čas ich stanovenia,

— počet buniek naočkovaných v selektívnom a neselektívnom médiu,

— počet kolónií v neselektívnom médiu a počet rezistentných kolónií v selektívnom médiu a súvisiace frekvencie mutácií,

— ak je to možné, závislosť medzi koncentráciou a reakciou,

— údaje o súbežných negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách obsahujúce rozsahy, stredné hodnoty, štandardné odchýlky a interval spoľahlivosti (napr. 95 %), ako aj počet údajov,

— štatistické analýzy (pre jednotlivé kultúry a spojené paralelné kultúry v odôvodnených prípadoch) a hodnoty p, ak existujú.

Diskusia o výsledkoch.

Záver

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). *Evaluation of the Ability of a Battery of Three In Vitro Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity*. Mutation Res., 584, 1–256.

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

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

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

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

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

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

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). *Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells*, Mol. Cell. Biol., 4, 1411–1415.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). K dispozícii na adrese: [http://www.pops.int.html].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Substitučné mutagény bázového páru: chemikálie, ktoré spôsobujú substitúciu bázových párov v DNA.

Chemikália: látka alebo zmes.

Klonovacia účinnosť: percentuálny podiel buniek naočkovaných s nízkou hustotou, ktoré sú rastom schopné vytvoriť kolóniu, ktorú možno spočítať.

Koncentrácie: sú konečné koncentrácie testovanej chemikálie v kultivačnom médiu.

Cytotoxicita: v prípade skúšok v rámci tejto testovacej metódy znamená cytotoxicita pokles relatívneho prežitia ošetrených buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri príslušný odsek).

Priama mutácia: génová mutácia z rodičovského typu na mutantnú formu, ktorá spôsobuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity alebo funkcie kódovaného proteínu.

Konštrukčné mutagény: chemikálie, ktoré v molekule DNA spôsobujú pridanie alebo deléciu jedného alebo viacerých bázových párov.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov DNA, aduktov, zmien usporiadania, mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Médium HAT: médium, ktoré obsahuje hypoxantín, aminopterín a tymidín a slúži na odstránenie mutantov HPRT.

Mitotická rekombinácia: rekombinácia medzi homológnymi chromatidmi počas mitózy, ktorá môže potenciálne indukovať zlom dvojvláknového reťazca DNA alebo stratu heterozygozity.

Médium MPA: médium, ktoré obsahuje xantín, adenín, tymidín, aminopterín a kyselinu mykofenolovú a slúži na odstránenie mutantov XPRT.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Frekvencia mutácií (MF): podiel počtu zistených mutantných kolónií a počtu buniek naočkovaných v selektívnom médiu, ktorý sa upraví na základe klonovacej účinnosti (alebo životaschopnosti) v čase selekcie.

Čas do prejavenia fenotypu: Čas po ošetrení, počas ktorého prebieha genetická zmena v rámci genómu a už existujúce génové produkty sa vyčerpajú až do bodu, keď dôjde k zmene fenotypovej charakteristiky.

Relatívne prežitie (RS): na základe relatívneho prežitia sa meria cytotoxicita súvisiaca s ošetrením. Relatívne prežitie predstavuje klonovaciu účinnosť (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %).

Frakcie pečene S9: supernatant pečeňového homogenátu po odstredení pri 9 000 g, t. j. surový pečeňový extrakt.

Zmes S9: zmes frakcie pečene S9 a kofaktorov potrebných pre aktivitu metabolických enzýmov.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla: všeobecný termín na vymedzenie kontrolných kultúr, ku ktorým sa pridáva len rozpúšťadlo používané na rozpúšťanie testovanej chemikálie.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Neošetrená kontrola: kultúry, ktoré sa neošetrujú (t. j. testovanou chemikáliou ani rozpúšťadlom), ale sa spracovávajú súbežne a rovnakým spôsobom ako kultúry, ku ktorým sa pridáva testovaná chemikália.

UVCB: chemické látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Dodatok 2

VZORCE NA POSÚDENIE CYTOTOXICITY A FREKVENCIE MUTÁCIÍ

Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia, t. j. klonovacej účinnosti (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s upravenou klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %) (pozri vzorec relatívneho prežitia ďalej).

Upravená klonovacia účinnosť pre kultúru ošetrenú pomocou testovanej chemikálie sa vypočíta ako:

$$\text{Upravená CE} = \frac{\text{počet buniek na konci ošetrenia}}{\text{počet buniek na začiatku ošetrenia}}$$

Relatívne prežitie (RS) pre kultúru ošetrenú pomocou testovanej chemikálie sa vypočíta ako:

$$\text{RS} = \frac{\text{upravená CE vošetrenej kultúre}}{\text{upravená CE vkontrole srozpúšťadlom}} \times 100$$

Frekvencia mutácií predstavuje podiel klonovacej účinnosti mutantných kolónií v selektívnom médiu a klonovacej účinnosti v neselektívnom médiu, ktorá sa meria pre tú istú kultúru v čase selekcie.

$$\text{Frekvencia mutácií} = \frac{\text{klonovacia účinnosť mutantných kolónií vselektívnom médiu}}{\text{klonovacia účinnosť vneselektívnom médiu}}$$

Keď sa na účely klonovacej účinnosti používajú Petriho misky:

Klonovacia účinnosť = počet kolónií/počet naočkovaných buniek.

Keď sa na účely klonovacej účinnosti používajú mikrotitračné platničky:

Počet kolónií na jamku mikrotitračnej platničky zodpovedá Poissonovmu rozdeleniu.

Klonovacia účinnosť = –LnP(0)/počet naočkovaných buniek na jednu jamku

Keď –LnP(0) je pravdepodobný počet prázdnych jamiek spomedzi nasadených jamiek a opisuje ho tento vzorec:

LnP(0) = –Ln (počet prázdnych jamiek/počet naočkovaných jamiek).“

3. V časti B sa kapitola B.22 nahrádza takto:

„B.22 **TEST DOMINANTNÝCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ PRI HLODAVCOCH**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 478 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a faktory dobrých životných podmienok zvierat. Táto upravená verzia testovacej metódy zohľadňuje viac než tridsaťročné skúsenosti s týmto testom a potenciál na integrovanie alebo kombinovanie tohto testu s inými testmi toxicity, napríklad v rámci štúdií vývojovej, reprodukčnej toxicity alebo genotoxicity. Vzhľadom na obmedzenia tohto testu a používanie veľkého počtu zvierat však táto skúška nie je určená na to, aby sa používala ako primárna metóda, ale skôr ako doplnková testovacia metóda, ktorú možno použiť, len ak neexistuje žiadna alternatíva z hľadiska regulačných požiadaviek. Kombinovanie testov toxicity potenciálne umožňuje ušetriť veľké počty zvierat, ktoré by sa inak využívali v rámci testov toxicity. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (1).

2. Účelom testu dominantných letálnych mutácií (DL) je skúmať, či chemikálie vyvolávajú mutácie v dôsledku chromozómových aberácií v zárodočných bunkách. Okrem toho je test dominantných letálnych mutácií relevantný pre hodnotenie genotoxicity, pretože faktory *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA sú aktívne a prispievajú k reakciám, hoci sú v prípade rôznych druhov odlišné. Vyvolanie dominantných letálnych mutácií po vystavení testovanej chemikálii naznačuje, že chemikália ovplyvnila zárodočné tkanivá pokusného zvieraťa.

3. Dominantné letálne mutácie spôsobujú smrť embrya alebo plodu. Vyvolanie dominantných letálnych mutácií po vystavení testovanej chemikálii naznačuje, že chemikália ovplyvnila zárodočné bunky pokusného zvieraťa.

4. Skúška dominantných letálnych mutácií je užitočná na potvrdenie pozitívnych výsledkov testov pomocou somatických sledovaných parametrov *in vivo* a je relevantným sledovaným parametrom na predikciu nebezpečnosti pre ľudí a rizika genetických chorôb prenášaných prostredníctvom zárodočnej línie. Táto skúška je však prácna a vyžaduje si vysoký počet zvierat, v dôsledku čoho je jej uskutočnenie veľmi drahé a časovo náročné. Keďže spontánna frekvencia dominantných letálnych mutácií je pomerne vysoká, má táto skúška všeobecne obmedzenú citlivosť pri detekcii malých zvýšení frekvencie mutácií.

5. Vymedzenie kľúčových pojmov je uvedené v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

6. Tento test sa najčastejšie uskutočňuje na myšiach (2) (3) (4), ale ak je to vedecky opodstatnené, v niektorých prípadoch môžu byť vhodné aj iné druhy, napríklad potkany (5) (6) (7) (8). Dominantné letálne mutácie sú vo všeobecnosti dôsledkom veľkých chromozómových aberácií (štrukturálnych a numerických abnormalít) (9) (10) (11), nemožno však vylúčiť ani génové mutácie. Dominantná letálna mutácia je mutácia, ku ktorej dochádza v zárodočnej bunke ako takej alebo ktorá vznikne po oplodnení v skorých fázach embrya, pričom nespôsobuje dysfunkciu gaméty, ale je letálna pre oplodnené vajíčko alebo vyvíjajúce sa embryo.

7. Jednotlivé samce sa postupne pária s panenskými samicami vo vhodných intervaloch. Počet párení po ošetrení závisí od konečného účelu štúdie dominantných letálnych mutácií (odsek 23) a má zabezpečiť, aby sa z hľadiska dominantných letálnych mutácií posúdili všetky fázy dozrievania samčej zárodočnej bunky (12).

8. Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália alebo jej metabolity nedosiahnu semenníky, nie je vhodné tento test použiť.

PRINCÍP TESTU

9. Vo všeobecnosti sa samčí jedinci vystavia testovanej chemikálii prostredníctvom vhodného spôsobu expozície a pária sa s neovplyvnenými panenskými samičkami. Rôzne typy zárodočných buniek možno testovať s využitím postupných intervalov párenia. Po uplynutí primeraného času po párení sa samice usmrtia a vyšetrením ich materníc sa určí počet implantátov a živých a mŕtvych embryí. Dominantná letalita testovanej chemikálie sa určí porovnaním počtu živých implantátov na samicu v ošetrenej skupine s počtom živých implantátov na samicu v kontrolnej skupine s nosičom/v kontrolnej skupine s aplikáciou rozpúšťadla. Zvýšenie počtu mŕtvych implantátov na samicu v ošetrenej skupine v porovnaní s počtom mŕtvych implantátov na samicu v kontrolnej skupine odráža postimplantačné straty vyvolané testovanou chemikáliou. Postimplantačné straty sa vypočítajú stanovením pomeru mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov v ošetrenej skupine v porovnaní s pomerom mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov v kontrolnej skupine. Predimplantačné straty sa môžu odhadnúť na základe porovnania rozdielu počtu žltých teliesok a celkového počtu implantátov alebo porovnaním všetkých implantátov na samicu v ošetrenej a v kontrolnej skupine.

OVEROVANIE SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

10. Kompetencia na vykonávanie tejto skúšky sa určí preukázaním schopnosti reprodukovať frekvencie dominantných letálnych mutácií z publikovaných údajov [napr. (13) (14) (15) (16) (17) (18)] s látkami, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola (vrátane slabých reakcií), napríklad s látkami uvedenými v tabuľke 1, a s kontrolnými skupinami s nosičom, a získaním frekvencií z negatívnych kontrol, ktoré sú v súlade s prijateľným rozsahom údajov (pozri referencie uvedené vyššie) alebo s distribúciou historických kontrol laboratória, ak je k dispozícii.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber druhov zvierat

11. Mali by sa vyberať bežne používané laboratórne kmene zdravých pohlavne dospelých zvierat. Bežne sa používajú myši, vhodné však môžu byť aj potkany. Použiť možno akékoľvek iné vhodné druhy cicavcov, ak je to vedecky zdôvodnené v správe.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

12. V prípade hlodavcov by mala byť teplota v miestnosti pre zvieratá 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť ideálne 50 – 60 %, mala by dosahovať minimálne 40 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala presiahnuť 70 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva touto cestou. Pred ošetrením alebo párením sa hlodavce umiestnia do malých skupín (najviac päťčlenných) rovnakého pohlavia, pokiaľ sa neočakáva ani nepozoruje agresívne správanie, a to prednostne v pevných klietkach s vhodným obohatením prostredia. Ak to je vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne.

Príprava zvierat

13. Zdravé, pohlavne zrelé a dospelé samčie a samičie zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Každé zviera sa jednotlivo označí humánnou, minimálne invazívnou metódou (napr. krúžkovanie, označenie štítkom, aplikácia mikročipu alebo biometrická identifikácia, nie však skracovanie prstov ani uší) a aklimatizuje sa na laboratórne podmienky v priebehu minimálne piatich dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Malo by sa zabrániť krížovej kontaminácii pozitívnou kontrolou a testovanou chemikáliou. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

Príprava dávok

14. Tuhé testované chemikálie by sa pred podávaním dávok zvieratám mali rozpustiť alebo suspendovať vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo rozriedené pred podávaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálnochemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly. Ak údaje o stabilite nepreukazujú prijateľnosť uskladnenia a nestanovujú vhodné podmienky skladovania, mali by sa používať čerstvo pripravené testované chemikálie.

Podmienky testovania

Rozpúšťadlo/nosič

15. Rozpúšťadlo/nosič by nemal vyvolávať toxické účinky v používaných objemoch dávok a nemalo by pri nich existovať podozrenie na možnosť chemickej reakcie s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť referenčné údaje uvádzajúce ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Príklady bežne používaných kompatibilných rozpúšťadiel/nosičov zahŕňajú vodu, fyziologický roztok, roztok metylcelulózy, roztok sodnej soli karboxymetylcelulózy, olivový olej a kukuričný olej.

Pozitívne kontroly

16. Pokiaľ laboratórium nepreukázalo spôsobilosť pri vykonávaní testu a bežne nepoužívalo test v nedávnej minulosti (napr. počas posledných 5 rokov), vždy sa majú používať zvieratá na súbežné pozitívne kontroly. Nie je však potrebné ošetriť zvieratá v rámci pozitívnej kontroly rovnakým spôsobom ako zvieratá, ktorým sa podáva testovaná chemikália, ani odoberať vzorky pri všetkých intervaloch párenia. O látkach na pozitívnu kontrolu má byť známe, že vyvolávajú dominantné letálne mutácie pri podmienkach použitých v teste. S výnimkou ošetrenia sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v ošetrenej skupine.

17. Dávky látok na pozitívnu kontrolu sa zvolia tak, aby vyvolávali slabé až mierne účinky, na základe ktorých možno kriticky posúdiť funkčnosť a citlivosť skúšky, pričom majú konzistentne vyvolávať pozitívne dominantné letálne mutácie. Príklady látok na pozitívnu kontrolu a vhodných dávok sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady látok na pozitívnu kontrolu

Látka [č. CAS] (referenčné č.)	Rozsah efektívnej dávky (mg/kg) (druhy hlodavcov)	Obdobie podávania (v dňoch)
trietylénmelamín [51-18-3] (15)	0,25 (myši)	1.
cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50 – 150 (myši)	5.
cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25 – 100 (potkany)	1.
etyl-metánsulfonát [62-50-0] (13)	100 – 300 (myši)	5.
monomerický akrylamid [79-06-1] (17)	50 (myši)	5.
chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (myši)	1.

Negatívne kontroly

18. Súčasťou každého času odberu vzoriek by mali byť zvieratá z negatívnych kontrol ošetrované len s rozpúšťadlom alebo nosičom, s ktorými sa inak zaobchádza rovnako ako s pokusnými skupinami (20). Ak neexistujú historické alebo zverejnené kontrolné údaje, ktoré by preukazovali, že zvolené rozpúšťadlo/nosič nespôsobujú žiadne dominantné letálne mutácie ani iné nepriaznivé vplyvy, zvieratá z neošetrenej kontroly by mali byť súčasťou aj každého času odberu vzoriek na stanovenie prijateľnosti kontroly s nosičom.

POSTUP

Počet zvierat

19. Jednotlivé samce sa postupne pária vo vhodne zvolených intervaloch (napr. v týždenných intervaloch, odseky 21 a 23) prednostne s jednou panenskou samičkou. Počet samcov v jednej skupine sa vopred určí tak, aby mal (v kombinácii s počtom spárených samíc v jednotlivých intervaloch párenia) dostatočnú štatistickú váhu potrebnú na zistenie minimálne zdvojnásobenia frekvencie dominantných letálnych mutácií (odsek 44).

20. Počet samíc na jeden interval párenia je takisto potrebné vopred určiť na základe výpočtov štatistickej váhy tak, aby umožňoval detekciu minimálne zdvojnásobenia frekvencie dominantných letálnych mutácií (t. j. dostatočný počet gravidných samíc, aby celkovo poskytli aspoň 400 implantátov) (20) (21) (22) (23), pričom sa očakáva aspoň jeden mŕtvy implantát na jednotku analýzy (t. j. skupina párenia na dávku) (24).

Obdobie podávania a intervaly párenia

21. Počet intervalov párenia nasledujúcich po ošetrení sa riadi harmonogramom ošetrovania a má zabezpečiť, že sa všetky štádiá dozrievania samčích zárodočných buniek posúdia z hľadiska vyvolania dominantných letálnych mutácií (12) (25). V prípade jedného ošetrenia do piatich podaní denných dávok sa má uskutočniť 8 (myš) alebo 10 (potkan) párení v týždenných intervaloch po poslednom ošetrení. V prípade viacnásobného podania dávky sa počet intervalov párenia môže znížiť úmerne k predĺženému času obdobia podávania, pričom sa však musí zachovať cieľ posúdenia všetkých štádií spermatogenézy (napr. po 28-dňovej expozícii sú na posúdenie všetkých štádií spermatogenézy pri myšiach dostatočné len 4 párenia v týždenných intervaloch). Všetky harmonogramy ošetrovania a párenia musia byť vedecky odôvodnené.

22. Samice sa majú ponechať so samcami počas aspoň jedného estrálneho cyklu (napr. jeden týždeň pokrýva jeden estrálny cyklus pri myšiach a potkanoch). Samice, ktoré sa nepárili počas týždňového intervalu, možno použiť pre nasledujúci interval párenia. Prípadne sa majú ponechať dovtedy, kým nedôjde k páreniu, čo sa stanoví na základe prítomnosti spermií vo vagíne alebo prítomnosti vaginálnej zátky.

23. Použitý režim expozície a párenia závisí od konečného účelu štúdie dominantných letálnych mutácií. Ak je cieľom určiť, či daná chemikália vyvoláva dominantné letálne mutácie ako také, prijateľnou metódou by bola expozícia počas celého cyklu spermatogenézy (napr. 7 týždňov pri myši, 5 – 7 ošetrení za týždeň) a uskutočnenie jedného párenia na záver. Ak je však cieľom identifikovať typ zárodočnej bunky, ktorý je citlivý z hľadiska vyvolania dominantných letálnych mutácií, uprednostňuje sa jednorazová alebo 5-dňová expozícia, po ktorej nasleduje párenie v týždňových intervaloch.

Úrovne dávok

24. Ak sa z dôvodu, že ešte nie sú dostupné vhodné údaje na pomoc pri výbere dávky, vykoná predbežná štúdia na zistenie rozsahu, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu s použitím toho istého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacieho režimu, aké majú byť použité v hlavnej štúdii (26). Štúdia by sa mala zamerať na zistenie maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako najvyššia dávka, ktorá sa bude tolerovať bez dôkazu toxicity obmedzujúcej štúdiu, a to vzhľadom na trvanie štúdie (napr. abnormálne správanie alebo reakcie, menšie zníženie telesnej hmotnosti alebo hematopoetická systémová cytotoxicita), ale nie smrti ani znakov bolesti, utrpenia či stavu, ktorý si vyžaduje humánne usmrtenie (27).

25. Maximálna tolerovaná dávka nesmie zároveň nepriaznivo ovplyvňovať úspešnosť párenia (21).

26. Testované chemikálie s osobitnými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) a chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností, môžu predstavovať výnimku z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť prípad od prípadu.

27. Na získanie informácií o vzťahu dávky a účinku by kompletná štúdia mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu a minimálne tri úrovne dávok, pričom vo všeobecnosti je každá úroveň dávky dvojnásobkom, no nie viac než štvornásobkom predchádzajúcej. Ak testovaná chemikália nevyvoláva toxicitu v štúdii na zistenie rozsahu alebo na základe existujúcich údajov, najvyššia dávka pri jednorazovom podaní by mala byť 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Ak však testovaná chemikália spôsobuje toxicitu, maximálna tolerovaná dávka by mala byť najvyššia podávaná dávka a použité úrovne dávky by mali podľa možnosti pokrývať rozsah od maximálnej dávky po dávku, ktorá spôsobuje slabú alebo nespôsobuje žiadnu toxicitu. V prípade netoxických chemikálií je limitná dávka pre obdobie podávania v trvaní najmenej 14 dní 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň a pre obdobia podávania kratšie ako 14 dní je limitná dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

Podávanie dávok

28. Pri plánovaní skúšky by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto možno ako opodstatnené zvoliť spôsoby expozície napríklad prostredníctvom stravy, pitnej vody, podkožne, intravenózne, topickou cestou, inhalačne, perorálne (pomocou sondy) alebo implantačne. V každom prípade by sa mal zvoliť taký spôsob, ktorým sa zaručí adekvátna expozícia cieľového tkaniva, resp. tkanív. Vo všeobecnosti sa neodporúča použitie intraperitoneálnej injekcie, keďže to nie je zamýšľaný spôsob expozície ľudí, a mal by sa použiť iba v prípade, že je k dispozícii osobitné vedecké zdôvodnenie. Ak je testovaná chemikália primiešaná do krmiva alebo pitnej vody, najmä v prípade jednej dávky, treba dbať na to, aby sa medzi konzumáciou potravy a vody a párením ponechal dostatočný čas, aby sa umožnilo zistenie účinkov (odsek 31). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť zvyčajne vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť objem najviac 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie väčších objemov ako uvedený objem (pokiaľ to dovoľujú predpisy o dobrých životných podmienkach zvierat) by sa malo zdôvodniť. Zmeny v testovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vzhľadom na telesnú hmotnosť pri všetkých úrovniach dávky.

Pozorovania

29. Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania testovaných zvierat a zaznamenať klinické príznaky, najlepšie každý deň v rovnakom čase a so zreteľom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Počas obdobia podávania dávok je potrebné aspoň dvakrát denne sledovať chorobnosť a úmrtnosť všetkých zvierat. Všetky zvieratá by sa mali odvážiť na začiatku štúdie, aspoň raz za týždeň počas štúdií s opakovanou dávkou a potom pri usmrtení. Spotreba potravy by sa mala merať aspoň raz týždenne. Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, mala by sa pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň odmerať spotreba vody. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť usmrtené pred dokončením testovacieho obdobia (27).

Odber a spracovanie tkaniva

30. Samice sa usmrtia v druhej polovici gravidity na 13. deň gravidity v prípade myší a 14. – 15. deň gravidity v prípade potkanov. Vyšetrením maternic sa určia dominantné letálne mutácie a stanoví sa počet implantátov, živých a mŕtvych embryí a žltých teliesok.

31. Rohy maternice a vaječníky sa odhalia, aby bolo možné spočítať žlté telieska, a plody sa vyberú, spočítajú a odvážia. Maternice treba starostlivo vyšetriť a zistiť prípadné resorpcie zakryté živými plodmi, pričom všetky resorpcie je potrebné zaznamenať. Zaznamená sa úmrtnosť plodov. Zaznamená sa aj počet úspešne oplodnených samíc a celkový počet implantácií, predimplantačné straty a postimplantačná úmrtnosť (vrátane skorých a neskorých resorpcií). Okrem toho sa viditeľné plody môžu najmenej dva týždne uchovávať v Bouinovom fixačnom prostriedku a následne sa vyšetrením zistí prítomnosť významných vonkajších malformácií (28) s cieľom získať doplňujúce informácie o reprodukčných a vývojových účinkoch testovanej látky.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

32. Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek, ktoré ukazujú počet spárených samcov, počet gravidných samíc a počet negravidných samíc. Výsledky každého párenia vrátane identity každého samca a každej samice sa uvádzajú samostatne. Pre každú samicu sa uvedie interval párenia, úroveň dávky ošetrených samcov a počet živých a mŕtvych implantátov.

33. Postimplantačné straty sa vypočítajú stanovením pomeru mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov z ošetrenej skupiny v porovnaní s pomerom mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov v kontrolnej skupine s nosičom/v kontrolnej skupine s aplikáciou rozpúšťadla.

34. Predimplantačné straty sa vypočítajú ako rozdiel medzi počtom žltých teliesok a počtom implantátov alebo ako zníženie priemerného počtu implantátov na samicu v porovnaní s kontrolnými pároveniami. Je potrebné uviesť, ak sa predimplantačné straty určia odhadom.

35. Faktor dominantnej letálnej mutácie sa odhaduje ako: (postimplantačné úmrtia/celkový počet implantácií na samicu) × 100.

36. Treba vykazovať údaje o toxicite a o klinických príznakoch (podľa odseku 29).

Kritériá prijateľnosti

37. Prijateľnosť testu určujú tieto kritériá:

— Súbežná negatívna kontrola je v súlade so zverejnenými normami pre údaje historických negatívnych kontrol a s údajmi laboratória o historických kontrolách, ak sú k dispozícii (pozri odseky 10 a 18).

— Súbežné pozitívne kontroly vyvolávajú reakcie, ktoré sú v súlade so zverejnenými normami pre údaje historických pozitívnych kontrol alebo s údajmi laboratória o historických pozitívnych kontrolách, ak sú k dispozícii, a vedú k štatisticky významnému nárastu v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri odseky 17 a 18).

— Analyzoval sa primeraný celkový počet implantátov a dávok (odsek 20).

— Kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 24 a 27.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

38. Na zabezpečenie dostatočných údajov na analýzu vzťahu medzi dávkou a reakciou treba analyzovať najmenej tri skupiny ošetrené podaním dávky.

39. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak:

— najmenej jedna z testovaných dávok vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— ide o nárast, ktorý pri hodnotení vhodným testom potvrdí súvislosť s dávkou najmenej pri jednej experimentálnej podmienke (napr. týždenný interval párenia), a

— niektorý z týchto výsledkov je mimo prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo distribúcie historických údajov negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za schopnú vyvolať dominantné letálne mutácie v zárodočných bunkách pokusných zvierat. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód sú opísané v odseku 44. Iné odporúčané štatistické prístupy možno nájsť aj v literatúre (20) (21) (22) (24) (29). V použitých štatistických testoch by sa malo zviera posudzovať ako pokusná jednotka.

40. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne negatívnu, ak:

— ani jedna z testovaných dávok nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— neexistuje nárast súvisiaci s dávkou pri žiadnej experimentálnej podmienke a

— všetky výsledky sú v rámci prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať dominantné letálne mutácie v zárodočných bunkách pokusných zvierat.

41. Neexistuje požiadavka na overenie jednoznačne pozitívnej alebo jednoznačne negatívnej reakcie.

42. Ak reakcia nie je jednoznačne negatívna ani pozitívna a má sa pomôcť pri stanovení biologickej relevantnosti výsledku (napr. slabé alebo hraničné zvýšenie), údaje by sa mali vyhodnotiť na základe odborného posúdenia a/alebo ďalšieho skúmania pomocou existujúcich experimentálnych údajov, napríklad posúdením, či je pozitívny výsledok mimo prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (30).

43. V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, nemusí byť na základe daného súboru údajov možné dospieť k záveru o pozitívnych alebo negatívnych výsledkoch, a preto sa takéto údaje budú považovať za nejednoznačné.

44. V použitých štatistických testoch by sa malo samčie zviera posudzovať ako pokusná jednotka. Hoci je možné, že údaje o počtoch (napr. počet implantátov na samicu) môžu zodpovedať Poissonovmu rozdeleniu a/alebo pomery (napr. pomer mŕtvych implantátov) môžu mať binomické rozdelenie, často sa stáva, že takéto údaje majú nadmerný rozptyl (31). V rámci štatistickej analýzy by sa malo tak najskôr uskutočniť testovanie nadmerného alebo nedostatočného rozptylu pomocou testov rozptylu, ako je napr. Cochranov binomický test rozptylu (32) alebo Taroneho test C(α) na určenie binomického nadmerného rozptylu (31) (33). Ak sa nezistí odchýlka od binomického rozdelenia, trendy v pomeroch v rámci úrovní dávok možno testovať pomocou testovania trendov podľa Cochranovho a Armitageovho testu (34) a párové porovnania s kontrolnou skupinou možno testovať pomocou Fisherovho exaktného testu (35). Podobne, ak sa nezistí odchýlka od Poissonovho rozdelenia, trendy v počtoch možno testovať pomocou Poissonovej regresie (36) a párové porovnania s kontrolnou skupinou možno testovať v kontexte Poissonovho modelu pomocou párových kontrastov (36). Ak sa zistí značný nadmerný alebo nedostatočný rozptyl, odporúčajú sa neparametrické metódy (23) (31). Patria sem testy založené na poradí, napríklad Jonckheereho-Terpstrov test trendu (37) Mannove-Whitneyho testy (38) párových porovnaní s kontrolnou skupinou s nosičom/s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, ako aj testy na základe permutácie, prevzorkovania alebo testy typu „bootstrap“ pre trendové a párové porovnania s kontrolnou skupinou (31) (39).

45. Pozitívna skúška dominantných letálnych mutácií poskytuje dôkaz o genotoxicite testovanej chemikálie v zárodočných bunkách ošetreného samca testovaného druhu.

46. Zváženie toho, či sú pozorované hodnoty v rozsahu historickej kontroly alebo mimo nej, môže poskytnúť usmernenie pri hodnotení biologického významu reakcie (40).

Správa o teste

47. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Zhrnutie.

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Príprava testovanej chemikálie:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa,

— príprava potravy, pitnej vody alebo inhalačných prípravkov,

— analytické stanovenie prípravkov (napr. stabilita, homogenita, nominálne koncentrácie) v prípade, že sa vykonávajú.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie voľby,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— metóda na jedinečnú identifikáciu zvierat,

— pre krátkodobé štúdie: telesná hmotnosť jednotlivých samčích zvierat na začiatku a na konci testu, v prípade štúdií dlhších ako jeden týždeň: telesná hmotnosť jednotlivých zvierat počas štúdie a spotreba potravy. Mali by sa uviesť aj rozsah telesnej hmotnosti, stredná hodnota a štandardná odchýlka pre každú skupinu.

Podmienky testovania:

— údaje z pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrol,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu,

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— odôvodnenie cesty podania,

— metódy merania toxicity pre zvieratá vrátane, keď to je možné, histopatologických alebo hematologických analýz a frekvencia pozorovaní a vážení zvierat,

— metódy overovania, či sa testovaná chemikália dostala do cieľového tkaniva alebo hlavného obehu v prípade negatívnych výsledkov,

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v potrave/pitnej vode a zo spotreby potravy/pitnej vody, ak sa uplatňuje,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody,

— podrobné informácie o obohatení prostredia klietky,

— podrobný opis harmonogramu ošetrovania a harmonogramu odberu vzoriek a zdôvodnenie ich voľby,

— metóda analgézie,

— metóda usmrtenia,

— postupy izolácie a uchovávania tkanív,

— zdroj a čísla šarží všetkých súprav a reakčných činidiel (v náležitých prípadoch),

— metódy vyčísľovania dominantných letálnych mutácií,

— harmonogram párenia,

— metódy použité na stanovenie toho, že sa uskutočnilo párenie,

— čas usmrtenia,

— kritériá hodnotenia účinkov dominantných letálnych mutácií vrátane údajov o žltých telieskach, implantáciách, resorpciách a predimplantačných stratách, živých implantátoch, mŕtvych implantátoch.

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane toxických príznakov,

— telesná hmotnosť samcov počas období ošetrovania a párenia,

— počet spárených samíc,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,

— súbežné a historické údaje o negatívnych kontrolách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— súbežné údaje o pozitívnych kontrolách,

— údaje v tabuľkovej forme o jednotlivých matkách vrátane počtu žltých teliesok na matku, počtu implantácií na matku, počtu resorpcií a predimplantačných strát na matku, počtu živých implantátov na matku, počtu mŕtvych implantátov na matku, hmotnosti plodu,

— vyššie uvedené údaje zhrnuté za jednotlivé obdobia párenia a dávky s uvedením frekvencie dominantných letálnych mutácií,

— použité štatistické analýzy a metódy.

Diskusia o výsledkoch.

Záver.

LITERATÚRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes.

Žlté teliesko (Corpus luteum): štruktúra vylučujúca hormóny, ktorá vzniká na vaječníku v mieste folikulu, ktorý uvoľnil vajíčko. Počet žltých teliesok vo vaječníkoch zodpovedá počtu ovulovaných vajíčok.

Dominantná letálna mutácia: mutácia, ku ktorej dochádza v zárodočnej bunke alebo ktorá vznikne po oplodnení, spôsobujúca smrť embrya alebo plodu.

Miera plodnosti: počet spárených gravidných samíc na počet spárených samíc.

Interval párenia: čas medzi skončením expozície a párením ošetrených samcov. Kontrolou tohto intervalu je možné posúdiť chemické účinky na rôznych typoch zárodočných buniek. V rámci párenia myší počas 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. a 8. týždňa sa po skončení expozície merajú účinky na spermie, kondenzované spermatidy, okrúhle spermatidy, pachyténne spermatocyty, rané spermatocyty, diferencované spermatogóniá, diferencované spermatogóniá a spermatogóniá kmeňových buniek.

Preimplantačné straty: rozdiel medzi počtom implantátov a počtom žltých teliesok. Môžu sa odhadnúť aj na základe porovnania celkového počtu implantátov na samicu v ošetrenej a v kontrolnej skupine.

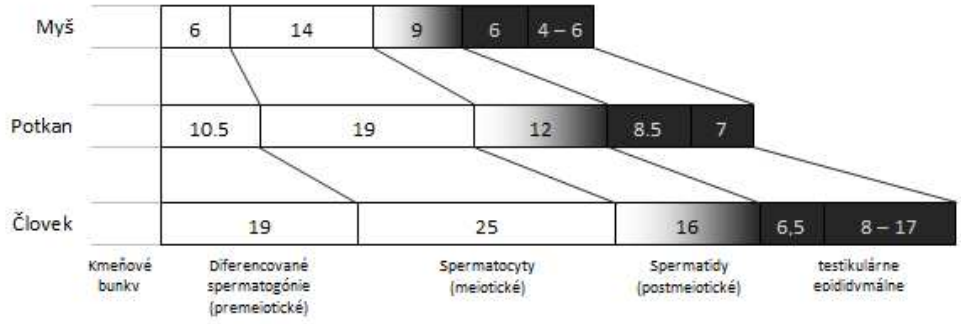
Postimplantačné straty: pomer počtu mŕtvych implantátov v ošetrenej skupine v porovnaní s pomerom počtu implantátov v kontrolnej skupine.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: chemická látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií a biologické materiály.

Dodatok 2

ČASOVÝ PRIEBEH SPERMATOGENÉZY U CICAVCOV



Obr. 1: Porovnanie obdobia vývoja (v dňoch) samčej zárodočnej bunky u myší, potkanov a ľudí. V časových úsekoch, ktoré sú vytieňované, nedochádza k oprave DNA.

Na obr. 1 je zobrazená schéma spermatogenézy u myší, potkanov a ľudí (prevzaté z publikácie Adler, 1996). Nediferencované spermatogóniá zahŕňajú typy: A – jednoduché (single); A – spárované (paired); a A – usporiadané (aligned) spermatogóniá (Hess a de Franca, 2008). A – jednoduché sa považujú za pravé kmeňové bunky, preto na posúdenie vplyvov na kmeňové bunky musí medzi poslednou injekciou testovanej chemikálie a párením uplynúť aspoň 49 dní (u myší).

Odkazy

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

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

4. V časti B sa kapitola B.23 nahrádza takto:

„B.23 **TEST SPERMATOGONIÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ABERÁCIE U CICAVCOV**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 483 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a faktory dobrých životných podmienok zvierat. Táto upravená verzia testovacej metódy zohľadňuje veľa rokov skúseností s touto skúškou a potenciál na integrovanie tohto testu do iných štúdií toxicity alebo genotoxicity alebo na kombinovanie s takýmito štúdiami. Kombinovanie štúdií toxicity potenciálne umožňuje znížiť počty zvierat používaných v rámci testov toxicity. Táto testovacia metóda je súčasťou série testovacích metód týkajúcich sa genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (1).

2. Účelom testu spermatogoniálnej chromozómovej aberácie *in vivo* u cicavcov je identifikovať tie chemikálie, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové aberácie spermatogoniálnych buniek cicavcov (2) (3) (4). Okrem toho je test relevantný pre hodnotenie genotoxicity, pretože faktory metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA *in vivo* sú aktívne a prispievajú k odozvám, aj keď môžu byť v prípade rôznych druhov odlišné. Táto testovacia metóda nie je navrhnutá na meranie numerických abnormalít, skúška sa na tento účel nepoužíva rutinne.

3. Týmto testom sa merajú štrukturálne chromozómové aberácie (chromozómového aj chromatidového typu) pri delení spermatogoniálnych zárodočných buniek, a preto sa očakáva, že na jeho základe sa bude dať predpovedať indukcia dedičnej mutácie v týchto zárodočných bunkách.

4. Vymedzenie základných pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

5. V tomto teste sa rutinne používajú hlodavce, ale ak je to vedecky opodstatnené, v niektorých prípadoch môžu byť vhodné aj iné druhy. Štandardnými cytogenetickými prípravami semenníkov hlodavcov sa generujú mitotické (spermatogóniá) a meiotické (spermatocyty) metafázy. Mitotické a meiotické metafázy sa určia na základe morfológie chromozómov (4). Týmto cytogenetickým testom *in vivo* sa zisťujú štrukturálne chromozómové aberácie v spermatogoniálnych mitózach. Iné cieľové bunky nie sú predmetom tejto testovacej metódy.

6. Na zistenie aberácie chromatidového typu v spermatogoniálnych bunkách by sa malo skúmať prvé mitotické delenie buniek po ošetrení, predtým ako tieto aberácie v nasledujúcom delení konvertujú na chromozómové aberácie. Ďalšie informácie z ošetrených spermatocytov sa dajú získať analýzou meiotických chromozómov na zistenie štrukturálnych chromozómových aberácií počas diakinézy – metafázy I a metafázy II.

7. V semenníkoch sa nachádza viacero generácií spermatogónií (5) a tieto rôzne typy zárodočných buniek môžu vykazovať rôznu škálu citlivosti na chemické ošetrenie. Zistené aberácie predstavujú teda celkovú odozvu populácie ošetrených spermatogoniálnych buniek. Väčšina mitotických buniek v prípravkoch semenníkov sú spermatogóniá B, ktorých bunkový cyklus trvá približne 26 hodín (3).

8. Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália alebo jej metabolity nezasiahnu semenníky, nie je vhodné tento test použiť.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

9. Zvieratá sú vo všeobecnosti exponované príslušným spôsobom vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie a vo vhodnom čase po aplikácii testovanej chemikálie sa usmrtia. Pred usmrtením sa zvieratám aplikuje prostriedok zastavujúci metafázu (napr. kolchicín alebo Colcemid®). Následne sa zo zárodočných buniek urobia chromozómové prípravky, zafarbia sa a metafázové bunky sa analyzujú na chromozómové aberácie.

OVEROVANIE SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

10. Kompetencia na vykonávanie tejto skúšky by sa mala určiť preukázaním schopnosti reprodukovať očakávané výsledky frekvencie štrukturálnych chromozómových aberácií v prípade spermatogónií s látkami, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola (vrátane slabých odoziev), napríklad s látkami uvedenými v tabuľke 1, a získaním frekvencií z negatívnych kontrol, ktoré sú v súlade s prijateľným rozsahom kontrolných údajov z publikovanej literatúry [napr. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)] alebo s rozložením historických kontrol laboratória, ak sú k dispozícii.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber druhov zvierat

11. Mali by sa vyberať bežne používané laboratórne kmene zdravých mladých dospelých zvierat. Bežne sa používajú samce myší, ak je to však vedecky opodstatnené a s cieľom umožniť priebeh testu v spojení s inou testovacou metódou, môžu sa použiť samce iných vhodných druhov cicavcov. V správe by malo byť poskytnuté vedecké zdôvodnenie použitia iných druhov než hlodavcov.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

12. V prípade hlodavcov by mala byť teplota v miestnosti pre zvieratá 22 °C (±3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť ideálne 50 – 60 %, mala by dosahovať minimálne 40 % a pokiaľ možno by nemala presiahnuť 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Hlodavce by sa mali umiestniť do malých skupín (najviac päť na klietku), pokiaľ sa neočakáva agresívne správanie, a to prednostne v klietkach s pevným dnom s vhodným obohatením prostredia. Ak to je vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne.

Príprava zvierat

13. Vo všeobecnosti sa používajú zdravé mladé dospelé samčie zvieratá (staré 8 až 12 týždňov na začiatku pokusu) a náhodne sa rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Každé zviera sa jednotlivo označí humánnou, minimálne invazívnou metódou (napr. krúžkovanie, označenie štítkom, aplikácia mikročipu alebo biometrická identifikácia, nie však skracovanie uší ani prstov) a aklimatizuje sa na laboratórne podmienky v priebehu minimálne piatich dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Malo by sa zabrániť krížovej kontaminácii pozitívnou kontrolou a testovanou chemikáliou. Na začiatku štúdie by mali byť rozdiely v hmotnosti zvierat minimálne a nemali by presiahnuť ±20 %.

Príprava dávok

14. Pevné testované chemikálie by sa pred podaním dávky zvieratám mali rozpustiť alebo suspendovať vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo rozriedené pred podaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálno-chemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly. Ak údaje o stabilite nepreukazujú prijateľnosť uskladnenia a nestanovujú vhodné podmienky skladovania, mali by sa používať čerstvo pripravené testované chemikálie.

Podmienky testovania – rozpúšťadlo/nosič

15. Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky pri používaných dávkach a nemali by mať schopnosť chemicky reagovať s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by sa malo podporiť referenčnými údajmi uvádzajúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Príklady bežne používaných kompatibilných rozpúšťadiel/nosičov zahŕňajú vodu, fyziologický roztok, roztok metylcelulózy, roztok sodnej soli karboxymetylcelulózy, olivový olej a kukuričný olej. Ak neexistujú historické alebo zverejnené údaje o kontrolách, z ktorých vyplýva, že zvolené atypické rozpúšťadlo/nosič neindukuje tvorbu štrukturálnych chromozómových aberácií ani iné škodlivé účinky, mala by sa vykonať východisková štúdia s cieľom stanoviť prijateľnosť kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom.

Pozitívne kontroly

16. Pokiaľ laboratórium nepreukázalo spôsobilosť pri vykonávaní testu a bežne nepoužívalo test v nedávnej minulosti (napr. počas posledných 5 rokov), vždy sa majú používať zvieratá na súbežné pozitívne kontroly. Ak nie je zahrnutá súbežná pozitívna kontrolná skupina, do každého experimentu by sa mali zahrnúť kontroly hodnotenia (fixované a nezafarbené sklíčka). Možno ich získať tak, že sa do hodnotenia štúdie zahrnú vhodné referenčné vzorky získané a uchované zo samostatného experimentu s pozitívnou kontrolou, ktorý sa vykonáva periodicky (napr. každých 6 až 18 mesiacov) v laboratóriu, kde sa test vykonáva; napríklad počas testovania spôsobilosti a potom pravidelne, podľa potreby.

17. Látky na pozitívnu kontrolu by mali spoľahlivo vyvolať zistiteľný nárast frekvencií buniek so štrukturálnymi chromozómovými aberáciami nad spontánne úrovne. Dávky na pozitívnu kontrolu by sa mali voliť tak, aby boli účinky zjavné, ale aby hodnotiteľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Príklady látok na pozitívnu kontrolu sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady látok na pozitívnu kontrolu

Látky [CAS č.] (referenčné č.)
cyklofosfamid (monohydrát) [č. CAS 50-18-0 (č. CAS 6055-19-2)] (9)
cyklohexylamín [č. CAS 108-91-8] (7)
mitomycín C [č. CAS 50-07-7] (6)
monomerický akrylamid [č. CAS 79-06-1] (10)
trietylénmelamín [č. CAS 51-18-3] (8).

Negatívne kontroly

18. Súčasťou každého odberu vzoriek by mali byť zvieratá z negatívnych kontrol ošetrované len s rozpúšťadlom alebo nosičom, s ktorými sa inak zaobchádza rovnako ako s pokusnými skupinami. Ak neexistujú historické alebo zverejnené kontrolné údaje, ktoré by preukazovali, že zvolené rozpúšťadlo/nosič nespôsobuje žiadne chromozómové aberácie ani iné nepriaznivé účinky, zvieratá z neošetrenej kontroly by mali byť súčasťou aj každého času odberu vzoriek na stanovenie prijateľnosti kontroly s nosičom.

POSTUP

Počet zvierat

19. Veľkosti skupín na začiatku štúdie by sa mali stanoviť s cieľom zabezpečiť minimálne 5 samčích zvierat na skupinu. Tento počet zvierat na skupinu sa považuje za dostatočný na zabezpečenie primeranej štatistickej váhy (t. j. na jeho základe sa dá vo všeobecnosti zistiť minimálne zdvojnásobenie frekvencie chromozómových aberácií, ak je úroveň negatívnej kontroly 1,0 % alebo vyššia, s 80 % pravdepodobnosťou na úrovni významnosti 0,05) (3) (11). Ako pomôcku pri bežných požiadavkách na maximálny počet zvierat možno uviesť, že štúdia s dvomi odbermi vzoriek, tromi dávkovými skupinami a so súbežnou negatívnou a pozitívnou kontrolnou skupinou (každá skupina zložená z piatich zvierat) by si vyžadovala 45 zvierat.

Harmonogram aplikácie

20. Testované chemikálie sa obvykle podávajú raz (t. j. ako jednorazové ošetrenie). Môžu sa použiť aj iné dávkovacie schémy, ak sú vedecky opodstatnené.

21. V skupine s najvyššou dávkou sa uskutočnia dva odbery vzoriek po ošetrení. Keďže čas potrebný na príjem a metabolizmus testovaných chemikálií a ich účinky na kinetiku bunkového cyklu môžu ovplyvniť optimálny čas na zistenie chromozómovej aberácie, uskutočňuje sa jeden skorý a jeden neskorý odber vzorky približne 24 a 48 hodín po ošetrení. V prípade iných dávok, ako je najvyššia dávka, by sa skorý odber vzoriek mal vykonať po 24 hodinách od ošetrenia (maximálne v dĺžke bunkového cyklu spermatogónií B, čím sa optimalizuje pravdepodobnosť hodnotenia prvých metafáz po ošetrení), ak neexistuje vedomosť o inom čase odberu vzoriek, ktorý by bol vhodnejší a opodstatnenejší.

22. Môžu sa použiť aj iné časy odberu vzoriek. Napríklad v prípade chemikálií, ktoré vyvolávajú účinky nezávislé od S, môže byť vhodnejší skorší čas odberu vzoriek (t. j. menej ako 24 hodín).

23. Môže sa použiť dávkovacia schéma ošetrenia s opakovanou dávkou, napr. v spojení s testom iného sledovaného parametra, pri ktorom sa používa obdobie podávania 28 dní (napr. TM B.58); v prípade ďalších skupín zvierat by sa však vyžadovalo použiť iné časy odberu vzoriek. Vhodnosť takéhoto harmonogramu sa musí vedecky odôvodniť prípad od prípadu.

24. Pred usmrtením sa zvieratám injekčne intraperitoneálne podáva vhodná dávka chemikálie zastavujúcej metafázu (napr. Colcemid® alebo kolchicín). Po vhodnom čase sa následne zo zvierat odoberú vzorky. U myší a potkanov ide o čas približne 3 – 5 hodín.

Úrovne dávok

25. Ak sa vykonáva predbežná štúdia na zistenie rozsahu dávky z dôvodu nedostatku vhodných údajov, ktoré by pomohli pri výbere dávky, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu použitím toho istého druhu, rodu a tej istej schémy ošetrenia ako v hlavnej štúdii a podľa odporúčaní na vykonávanie štúdií na zistenie rozsahu dávky (12). Takáto štúdia by sa mala zamerať na zistenie maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako dávka, ktorá v porovnaní s časom trvania štúdie vyvolá mierne toxické účinky (napr. nezvyčajné správanie alebo reakcie, mierny úbytok telesnej hmotnosti alebo cytotoxicitu hematopoietického systému), nie však smrť alebo známky bolesti, utrpenia, príp. ťažkostí, ktoré si vyžadujú usmrtenie zvierat (13).

26. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobí určité príznaky toxicity v spermatogoniálnych bunkách (napríklad: zníženie pomeru spermatogoniálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze). Toto zníženie by nemalo presiahnuť 50 %.

27. Testované chemikálie s osobitnými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) a chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností, môžu predstavovať výnimku z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť prípad od prípadu.

28. Na získanie informácií o odozve na dávku by kompletná štúdia mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu (odsek 18) a minimálne tri úrovne dávok vo všeobecnosti oddelené faktorom 2, ale nie vyšším ako 4. Ak testovaná chemikália nevyvoláva toxicitu v štúdii na zistenie rozsahu dávky alebo na základe existujúcich údajov, najvyššia dávka pri jednorazovom podaní by mala byť 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Ak však testovaná chemikália spôsobuje toxicitu, maximálna tolerovaná dávka by mala byť najvyššia podávaná dávka a použité úrovne dávky by mali podľa možnosti pokrývať rozsah od maximálnej dávky po dávku, ktorá spôsobuje slabú alebo nespôsobuje žiadnu toxicitu. Ak sa zistí toxicita v cieľovom tkanive (t. j. semenníky) pri všetkých testovaných úrovniach dávok, odporúča sa vykonanie ďalšej štúdie s netoxickými dávkami. Štúdie, ktorých cieľom je podrobnejšie charakterizovať kvantitatívne informácie o odozve na dávku, môžu vyžadovať dodatočné skupiny, ktorým sa budú podávať dávky. V prípade určitých druhov testovaných chemikálií (napr. humánne lieky), na ktoré sa vzťahujú osobitné požiadavky, sa tieto limity môžu líšiť. Ak testovaná chemikália vyvoláva toxicitu, mala by sa zvoliť limitná dávka plus dve nižšie dávky (podľa uvedeného opisu). Limitná dávka pre obdobie podávania v trvaní najmenej 14 dní je 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň a pre obdobie podávania kratšie ako 14 dní je limitná dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

Podávanie dávok

29. Pri plánovaní skúšky by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto sa za opodstatnené považuje zvoliť spôsoby expozície napríklad potravou, pitnou vodou, lokálne podkožne, intravenózne, orálne (sondou), inhaláciou alebo implantáciou. V každom prípade by sa mal zvoliť taký spôsob, ktorým sa zaručí adekvátna expozícia cieľového tkaniva. Okrem vedecky odôvodnených prípadov sa vo všeobecnosti neodporúča použitie intraperitoneálnej injekcie, keďže zvyčajne nepredstavuje fyziologicky relevantný spôsob expozície ľudí. Ak je testovaná chemikália primiešaná do potravy alebo pitnej vody, najmä v prípade jednej dávky, treba venovať pozornosť tomu, aby sa medzi spotrebou potravy a vody a odberom vzorky ponechal dostatočný čas, aby sa umožnilo zistenie účinkov (pozri odsek 33). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem zvyčajne nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť objem najviac 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie väčších objemov ako uvedený objem (pokiaľ to dovoľujú právne predpisy o dobrých životných podmienkach zvierat) by sa malo odôvodniť. Zmeny v testovanom objeme by sa mali minimalizovať tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vzhľadom na telesnú hmotnosť pri všetkých úrovniach dávky.

Pozorovania

30. Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania testovaných zvierat a zaznamenať klinické príznaky, najlepšie každý deň v rovnakom čase a so zreteľom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Najmenej dvakrát denne je u všetkých zvierat potrebné sledovať chorobnosť a úmrtnosť. Všetky zvieratá by sa mali odvážiť na začiatku štúdie, aspoň raz za týždeň počas štúdií s opakovanou dávkou, a pri usmrtení. V prípade štúdií, ktoré trvajú aspoň jeden týždeň, by sa malo aspoň raz za týždeň vykonať meranie spotreby potravy. Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, mala by sa spotreba vody odmerať pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť usmrtené pred ukončením testovacieho obdobia (13).

Príprava chromozómov

31. Okamžite po usmrtení sa z jedného alebo oboch semenníkov získavajú suspenzie zárodočných buniek, ktoré sa vystavia hypotonickému roztoku a fixujú sa podľa zavedených protokolov [napr. (2) (14) (15)]. Následne sa bunky nanesú na sklíčka a zafarbia (16) (17). Všetky sklíčka by sa mali okódovať, aby hodnotiteľ nepoznal ich identitu.

Analýza

32. V prípade každého zvieraťa by sa malo ohodnotiť minimálne 200 dobre nanesených metafáz (3) (11). Ak je frekvencia historickej negatívnej kontroly nižšia ako 1 %, malo by sa ohodnotiť viac ako 200 buniek/zviera, aby sa zvýšila štatistická váha (3). Mali by sa používať také metódy farbenia, ktoré umožňujú identifikáciu centroméry.

33. Aberácie chromozómového a chromatidového typu by sa mali zaznamenávať oddelene a klasifikovať podľa poddruhu (zlomy, výmeny). Gapy by sa mali zaznamenávať, ale neberú sa do úvahy pri určovaní, či chemikália vyvoláva významný nárast v rámci incidencie buniek s chromozómovou aberáciou. Postupmi používanými v laboratóriu by sa malo zabezpečiť, aby analýzu chromozómových aberácií vykonávali primerane vyškolení hodnotitelia. Vzhľadom na to, že pri príprave sklíčok často dochádza k zlomom časti buniek v metafáze s následnou stratou chromozómov, vyhodnocované bunky by mali obsahovať najmenej $2n \pm 2$ centromér, kde n je haploidný počet chromozómov pre daný druh.

34. Napriek tomu, že účelom testu je zistiť štrukturálne chromozómové aberácie, je dôležité zaznamenať frekvencie polyploidných buniek a buniek s endoreduplikovanými chromozómami, ak sa tieto udalosti spozorujú (pozri odsek 44).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

35. Údaje o jednotlivých zvieratách by sa mali uvádzať v tabuľkovej forme. Pre každé zviera by sa mal hodnotiť počet buniek so štrukturálnymi chromozómovými aberáciami a počet chromozómových aberácií na bunku. Aberácie chromatidového a chromozómového typu klasifikované podľa poddruhov (zlomy, výmeny) by mali byť uvedené oddelene spolu s ich počtom a frekvenciami výskytu v prípade experimentálnych a kontrolných skupín. Gapy sa zaznamenávajú oddelene. Frekvencia gapov sa zaznamenáva, ale vo všeobecnosti sa nezahŕňa do analýzy celkovej frekvencie štrukturálnych chromozómových aberácií. Uvádza sa percentuálny podiel polyploidie a buniek s endoreduplikovanými chromozómami, ak boli pozorované.

36. Treba vykazovať údaje o toxicite a o klinických príznakoch (podľa odseku 30).

Kritériá prijateľnosti

37. Prijateľnosť testu určujú tieto kritériá:

— súbežná negatívna kontrola je v súlade so zverejnenými normami pre historické údaje negatívnych kontrol, pri ktorých sa vo všeobecnosti očakáva, že budú predstavovať > 0 % a ≤ 1,5 % buniek s chromozómovými aberáciami, a s historickými údajmi laboratória o kontrolách, ak sú k dispozícii (pozri odseky 10 a 18),

— súbežné pozitívne kontroly vyvolávajú odozvy, ktoré sú v súlade so zverejnenými normami pre historické údaje z pozitívnych kontrol alebo s historickými údajmi laboratória z pozitívnych kontrol, ak sú k dispozícii, a v porovnaní s negatívnou kontrolou vedú k štatisticky významnému nárastu (pozri odseky 17, 18),

— analyzoval sa adekvátny počet buniek a dávok (pozri odsek 28 a 32),

— kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 25 a 26.

38. Ak sa pozoruje mitóza aj meióza, pomer spermatogoniálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze by sa mal stanoviť ako indikátor cytotoxicity v prípade všetkých ošetrených zvierat a zvierat z negatívnych kontrol pri celkovej vzorke 100 deliacich sa buniek na zviera. Ak sa pozoruje len mitóza, mitotický index sa stanovuje pre najmenej 1 000 buniek na jedno zviera.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

39. Na zabezpečenie dostatočných údajov na analýzu vzťahu medzi dávkou a odozvou treba analyzovať najmenej tri skupiny ošetrené podaním dávky.

40. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak:

— najmenej jedna z testovaných dávok vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— nárast aspoň pri jednom čase odberu vzoriek súvisí s dávkou a

— niektorý z týchto výsledkov je mimo prijateľného rozsahu údajov z negatívnych kontrol alebo distribúcie historických údajov z negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačné medze Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za schopnú vyvolať chromozómové aberácie v spermatogoniálnych bunkách testovaných zvierat. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno takisto nájsť aj v literatúre (11) (18). V použitých štatistických testoch by sa malo zviera posudzovať ako pokusná jednotka.

41. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne negatívnu, ak:

— ani jedna z testovaných dávok nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— neexistuje nárast súvisiaci s dávkou pri žiadnej experimentálnej podmienke a

— všetky výsledky sú v rámci prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačnej medze Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať chromozómové aberácie v spermatogoniálnych bunkách pokusných zvierat. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno takisto nájsť aj v literatúre (11) (18). Negatívnym výsledkom sa nevylučuje možnosť, že chemikálie môžu v neskorších vývojových fázach, ktoré nie sú predmetom štúdie, vyvolávať chromozómové aberácie alebo génové mutácie.

42. Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej odozvy.

43. Ak odozva nie je jednoznačne negatívna ani pozitívna a má sa pomôcť pri stanovení biologickej relevantnosti výsledku (napr. slabé alebo hraničné zvýšenie), údaje by sa mali vyhodnotiť na základe odborného posúdenia a/alebo ďalšieho skúmania pomocou existujúcich experimentálnych údajov, napríklad posúdením, či je pozitívny výsledok mimo prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (19).

44. V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, nemusí byť na základe daného súboru údajov možné dospieť k záveru o pozitívnych alebo negatívnych výsledkoch, a preto sa takéto údaje budú považovať za nejednoznačné.

45. Nárast počtu polyploidných buniek môže naznačovať, že testovaná chemikália má potenciál brzdiť mitotické procesy a indukovať numerické chromozómové aberácie (20). Nárast počtu buniek s endoreduplikovanými chromozómami môže naznačovať, že testovaná chemikália má potenciál brzdiť progres bunkového cyklu (21) (22), ktorý predstavuje iný mechanizmus indukcie numerických zmien chromozómov ako brzdenie mitotických procesov (pozri odsek 2). Preto by sa incidencia polyploidných buniek a buniek s endoreduplikovanými chromozómami mala zaznamenávať oddelene.

Správa o teste

46. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Zhrnutie.

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt atď., ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Príprava testovanej chemikálie:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči,

— príprava potravy, pitnej vody alebo inhalačných prípravkov,

— analytické stanovenie prípravkov (napr. stabilita, homogenita, nominálne koncentrácie) v prípade, že sa vykonávajú.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a zdôvodnenie jeho použitia,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— metóda na jedinečnú identifikáciu zvierat,

— v prípade krátkodobých štúdií: hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu; v prípade štúdií trvajúcich viac ako jeden týždeň: hmotnosť jednotlivých zvierat počas štúdie a konzumácia potravy. Mal by sa zahrnúť rozsah telesnej hmotnosti, stredná hodnota a štandardná odchýlka pre každú skupinu.

Podmienky testovania:

— údaje z pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrol,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa vykonala,

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— odôvodnenie cesty podania,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— zdôvodnenie času utratenia,

— metódy merania toxicity pre zvieratá vrátane, ak sú k dispozícii, histopatologických alebo hematologických analýz, ako aj frekvencia pozorovaní zvierat a váženia ich telesnej hmotnosti,

— metódy overovania, či sa testovaná chemikália dostala do cieľového tkaniva alebo hlavného obehu v prípade negatívnych výsledkov,

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v potrave/pitnej vode a zo spotreby potravy/pitnej vody, ak sa uplatňuje,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu ošetrovania a harmonogramu odberu vzoriek a zdôvodnenie ich voľby,

— metóda usmrtenia,

— metóda analgézie (v prípade použitia),

— postupy izolácie tkanív,

— identita chemikálie zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie ošetrenia,

— metódy prípravy sklíčok,

— kritériá na hodnotenie aberácií,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné.

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane toxických príznakov,

— hmotnosť tela a orgánov pri utratení (ak boli vykonané viaceré ošetrenia, telesné hmotnosti počas schémy ošetrenia),

— príznaky toxicity,

— mitotický index,

— pomer spermatogoniálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze alebo iný dôkaz expozície cieľového tkaniva,

— typ a počet odchýlok uvádzaný samostatne na každé zviera,

— celkový počet aberácií na skupinu s priemerom a štandardnou odchýlkou,

— počet buniek s aberáciami na skupinu s priemerom a štandardnou odchýlkou,

— vzťah medzi dávkou a odozvou, ak je možné ho určiť,

— použité štatistické analýzy a metódy,

— súbežné údaje z negatívnych kontrol,

— historické údaje z negatívnych kontrol, priemery, štandardné odchýlky a interval spoľahlivosti 95 % (ak je dostupný) alebo publikované historické údaje z negatívnych kontrol používané pri prijateľnosti výsledkov testu,

— súbežné údaje o pozitívnych kontrolách,

— zmeny v ploídii, ak sa pozorovali, vrátane frekvencie polyploidie a/alebo endoreduplikovaných buniek.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

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

(2) Adler, ID (1984). *Cytogenetic Tests in Mammals*. In: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*. Ed. S. Venitt a J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275-306.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(13) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment,* (No 19.), Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme celého(-ých) súboru(-ov) chromozómov (polyploidia).

Centroméra: oblasť(-ti) chromozómu, v ktorej(-ých) sa vlákna deliaceho vretienka pripájajú k chromozómu počas delenia bunky a ktorá(-é) umožňuje(-ú) riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Chemikália: látka alebo zmes.

Chromozómová diverzita: diverzita tvaru (napr. metacentrický, akrocentrický) a veľkosti chromozómov.

Aberácia chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako zlom jednej z chromatíd alebo zlom a opätovné spojenie medzi chromatídami.

Aberácia chromozómového typu: štrukturálne poškodenie chromozómu prejavujúce sa ako zlom alebo zlom a opätovné spojenie oboch chromatíd na rovnakej strane.

Klastogén: každá chemikália, ktorá spôsobuje štrukturálne chromozómové aberácie v populáciách buniek alebo organizmov.

Gap: achromatická lézia menšia ako šírka jednej chromatídy s minimálnym posunutím chromatíd.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov, delécií, aduktov, modifikácií a prepojení nukleotidov, prestavieb, mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Mitotický index (MI): pomer buniek v metafáze vydelený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa šírenia tejto populácie.

Mitóza: delenie bunkového jadra, ktoré sa zvyčajne delí na profázu, prometafázu, metafázu, anafázu a telofázu.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Numerické abnormality: zmena v počte chromozómov v porovnaní s bežným počtom charakteristickým pre použité zvieratá.

Polyploidia: násobok haploidného chromozómového čísla (*n*) odlišného od diploidného čísla (t. j. 3*n*, 4*n* atď.).

Štrukturálna aberácia: zmena chromozómovej štruktúry rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delécie a fragmenty, výmeny.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.“

5. V časti B sa kapitola B.40 nahrádza takto:

„B.40 **POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA POMOCOU TRANSKUTÁNNEHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (ďalej len „TM“) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (ďalej len „TG“) 430 (2015). Poleptanie kože je vznik nevratného poškodenia kože, ktoré sa prejavuje ako viditeľná nekróza cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie [v znení definície podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadenia Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1])]. Touto aktualizovanou testovacou metódou B.40 sa stanovuje postup *in vitro*, ktorý umožňuje identifikáciu nežieravých a žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN (1) a CLP.

2. Posudzovanie poleptania kože zvyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat (TM B.4, ekvivalent OECD TG 404 pôvodne prijatého v roku 1981 a revidovaného v rokoch 1992, 2002 a 2015) (2). Dodatočne k súčasnej testovacej metóde B.40 sa validovali a prijali dve ďalšie testovacie metódy *in vitro* na testovanie žieravých vlastností chemikálií pre kožu – TM B.40a (ekvivalent usmernenia OECD TG 431) (3) a TM B.65 (ekvivalent usmernenia OECD TG 435) (4), ktorými je tiež v prípade potreby možné určiť podkategórie žieravých chemikálií. Na testovanie poleptania kože sa prijalo niekoľko validovaných testovacích metód *in vitro* ako TM B.46 (ekvivalent usmernenia OECD TG 439) (5). V usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade poleptania a podráždenia kože sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené rôzne zdroje informácií a analytické nástroje, a poskytuje sa usmernenie o tom, i) ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie dráždivých a žieravých vlastností chemikálií pre kožu, a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (6).

3. Táto testovacia metóda sa týka koncového sledovaného parametra poleptania kože pre ľudské zdravie. Je založená na testovacej metóde pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER) na potkanej koži, pri ktorej sa žieraviny na kožných terčíkoch identifikujú ich schopnosťou spôsobiť stratu normálnej integrity a ochrannej funkcie *stratum corneum*. Príslušné usmernenie OECD na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2004, pričom v roku 2015 sa aktualizovalo s cieľom odkázať na usmerňovací dokument IATA.

4. Na posúdenie testovania poleptania kože *in vitro* sa na regulačné účely vykonali prevalidačné štúdie (7), po ktorých nasledovala riadna validačná štúdia testovacej metódy TER na potkanej koži na posúdenie poleptania kože (8) (9) (10) (11). Výsledky týchto štúdií viedli k odporúčaniu, že testovacia metóda TER (označená ako validovaná referenčná metóda alebo VRM) by sa na regulačné účely mohla používať pri posudzovaní poleptania kože *in vivo* (12) (13) (14).

5. Pred tým, ako sa na regulačné účely môže použiť navrhovaná podobná alebo upravená testovacia metóda TER *in vitro* na poleptanie kože, ktorá je iná ako validovaná referenčná metóda, mala by sa stanoviť jej spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jej navrhovaného používania, aby sa zabezpečila podobnosť s validovanými referenčnými metódami podľa výkonnostných noriem (PS) (15). Vzájomné uznávanie údajov OECD je možné zaručiť len po tom, ako sa každá navrhovaná nová alebo aktualizovaná testovacia metóda na základe noriem výkonnosti preskúma a zaradí do príslušného usmernenia OECD na vykonávanie testov.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

7. Z validačnej štúdie (10) a ďalších publikovaných štúdií (16) (17) vyplýva, že testovacou metódou TER na potkanej koži je možné rozlíšiť medzi známymi látkami so žieravými účinkami na kožu a látkami, ktoré nemajú žieravé účinky, s celkovou citlivosťou 94 % (51/54) a špecifickosťou 71 % (48/68) v prípade databázy so 122 látkami.

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

8. Predmetom tejto testovacej metódy sú poleptania kože *in vitro*. Umožňuje sa ňou identifikácia nežieravých a žieravých testovaných chemikálií v súlade s GHS OSN/CLP. Obmedzením tejto testovacej metódy, ako sa preukázalo vo validačných štúdiách (8) (9) (10) (11), je, že neumožňuje podkategorizáciu žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN/CLP. Spôsob použitia tejto testovacej metódy sa určí uplatniteľným regulačným rámcom. Keďže táto testovacia metóda neposkytuje dostatočné informácie o podráždení kože, treba poznamenať, že TM B.46 sa špecificky zameriava na zdravotný účinok podráždenia kože *in vitro* (5). Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii kože by sa mal použiť usmerňovací dokument OECD o IATA (6).

9. V rámci validácie, ktorá je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií, ktoré predstavovali najmä látky, a empirická databáza validačnej štúdie obsahovala celkovo 60 látok, ktoré pokrývali širokú škálu chemických tried (8) (9). Na základe celkových dostupných údajov je daná metóda testovania uplatniteľná na širokú škálu chemických tried a fyzikálnych stavov vrátane kvapalín, polotuhých látok, tuhých látok a voskov. Treba poznamenať, že počas validácie sa posudzoval porovnateľne malý počet voskov a tuhých žieravých látok, keďže pre špecifické fyzikálne stavy nie sú v súčasnosti k dispozícii testovacie predmety s vhodnými referenčnými údajmi. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti tejto testovacej metódy na špecifickú kategóriu látok, nemala by sa táto testovacia metóda pri tejto špecifickej kategórii použiť. Táto testovacia metóda sa považuje za aplikovateľnú nielen na látky, ale aj v prípade zmesí. Vzhľadom na skutočnosť, že zmesi zahŕňajú široké spektrum kategórií a zloženia, a v súčasnosti sú dostupné iba obmedzené informácie o testovaní zmesí, v prípadoch, kde možno preukázať dôkazy o nepoužiteľnosti testovacej metódy pre špecifickú kategóriu zmesí (napr. na základe stratégie navrhovanej Eskesom *et al.*, 2012) (18), testovacia metóda by sa nemala používať pri danej špecifickej kategórii zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže na tento účel poskytnúť adekvátne výsledky, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačných štúdiách (8) (9). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať testovacou metódou TER, súčasná testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

PRINCÍP TESTU

10. Testovaná chemikália sa aplikuje v trvaní do 24 hodín na epidermálny povrch kožných terčíkov v dvojkomorovom testovacom systéme, v ktorom tieto kožné terčíky majú funkciu deliacej steny medzi komorami. Kožné terčíky sa odoberú z potkanov vo veku 28 až 30 dní, ktoré boli usmrtené humánnym spôsobom. Žieravé chemikálie sa identifikujú ich schopnosťou spôsobiť stratu normálnej integrity a bariérnej funkcie rohovitej vrstvy (*stratum corneum*), čo sa pri meraní prejavuje ako zníženie TER pod prahovú úroveň (16) (pozri odsek 32). Na základe rozsiahlych údajov širokej škály látok, v prípade ktorých veľká väčšina hodnôt bola jednoznačne výrazne nad (často > 10 kΩ) alebo výrazne pod (často < 3 kΩ) touto hodnotou, sa pre TER na potkanej koži zvolila medzná hodnota 5 kΩ (16). Vo všeobecnosti chemikálie, ktoré nie sú u zvierat žieravé, ale sú dráždivé alebo nedráždivé, neznižujú TER pod túto medznú hodnotu. Použitie iných kožných prípravkov alebo iného vybavenia môže zmeniť medznú hodnotu, čo si vyžaduje ďalšiu validáciu.

11. Do testovacieho postupu je na potvrdenie pozitívnych výsledkov testovania TER vrátane hodnôt okolo 5 kΩ zaradený krok na stanovenie viazania farbiva. Krokom viazania farbiva sa stanovuje, či zvýšenie permeability iónov nastáva v dôsledku fyzického porušenia rohovitej vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo sa, že metóda TER používajúca potkaniu kožu umožňuje predvídať výsledky zisťovania žieravosti *in vivo* s králikmi podľa testovacej metódy B.4 (2).

PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI

12. Pred rutinným použitím testovacej metódy TER na potkanej koži, ktoré zodpovedá požiadavkám tejto testovacej metódy, by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť správnou klasifikáciou dvanástich chemikálií na preukázanie spôsobilosti odporúčaných v tabuľke 1. V prípadoch, keď uvedená látka nie je k dispozícii alebo keď je to odôvodniteľné, možno použiť inú látku, pri ktorej sú k dispozícii primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napríklad zo zoznamu referenčných chemikálií (16)], za predpokladu, že sa uplatnia rovnaké kritériá výberu, ktoré sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti ([1])

Látka	CASRN	Chemická trieda ([2])	GHS OSN/CLP Kat. založená na výsledkoch *in vivo* ([3])	VRM Kat. založená na výsledkoch *in vitro*	Fyzikálny stav	pH ([4])
Žieravé látky *in vivo*						
N,N'-dimetyl dipropyléntriamín	10563-29-8	organická báza	1A	6 × C	L	8,3
propán-l,2-diamín	78-90-0	organická báza	1A	6 × C	L	8,3
kyselina sírová (10 %)	7664-93-9	anorganická kyselina	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
hydroxid draselný (10 % vodný roztok)	1310-58-3	organická báza	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
kyselina oktánová (kaprylová)	124-07-2	organická kyselina	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terc-butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Nežieravé látky *in vivo*						
kyselina izostearová	2724-58-5	organická kyselina	NC	6 × NC	L	3,6
4H-1,2,4-triazoM-ylamín	584-13-4	organická báza	NC	6 × NC	S	5,5
fenetylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	6 × NC	L	6,8
deka-1,9-dién	1647-16-1	neutrálna organická látka	NC	6 × NC	L	3,9
tetrachlóretylén	127-18-4	neutrálna organická látka	NC	6 × NC	L	4,5

Skratky: aq = vodné; CASRN = registračné číslo CAS (CAS číslo, Chemical Abstracts Service Registry Number); VRM = validovaná referenčná metóda; C = žieravá látka; NC = nežieravá látka.

([1]) Látky na preukázanie spôsobilosti, rozdelené najprv podľa toho, či ide o žieravé alebo nežieravé látky, potom podľa podkategórie žieravých látok a následne podľa chemickej triedy, boli vybraté spomedzi látok použitých vo validačných štúdiách ECVAM testovacou metódou TER na potkanej koži (8) (9). Pokiaľ to nebolo uvedené inak, látky boli testované na úrovni čistoty získanej pri nákupe z komerčného zdroja (8). Výber v najvyššej možnej miere zahŕňa látky, ktoré: i) sú reprezentatívne z hľadiska rozsahu žieravých účinkov (napr. nežieravé; slabé až silné žieraviny), ktoré je možné zmerať alebo predvídať prostredníctvom validovanej referenčnej metódy; ii) sú reprezentatívne z hľadiska chemických tried použitých vo validačných štúdiách; iii) odrážajú vlastnosti výkonnosti validovanej referenčnej metódy; iv) majú dobre definované chemické štruktúry; v) pri referenčnej testovacej metóde *in vivo* vyvolávajú konečné výsledky; vi) sú komerčne dostupné a vii) nie sú s nimi spojené neúmerné náklady na zneškodnenie.

([2]) Chemická trieda pridelená podľa Barratt *et al.* (8).

([3]) Zodpovedajúce skupiny obalov OSN sú I, II a III (v danom poradí) pre kategórie GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C.

([4]) Hodnoty pH získané z publikácií Fentem *et al.* (9) a Barratt *et al.* (8).

POSTUP

13. K dispozícii sú štandardné operačné postupy (SOP) pre testovaciu metódu poleptania kože TER na potkanej koži (19). Testovacia metóda TER na potkanej koži, na ktorú sa vzťahuje táto testovacia metóda, by mala byť v súlade s týmto podmienkami:

Zvieratá

14. Mali by sa používať potkany, pretože citlivosť ich kože na látky tejto testovacej metódy už bola preukázaná (12) a sú jediným zdrojom kože, ktorý bol formálne validovaný (8) (9). Vek (v čase odberu kože) a kmeň potkanov sú osobitne dôležité na zabezpečenie toho, aby folikuly chlpov boli v latentnej fáze, predtým než sa začne rast zrelej srsti.

15. Chrbtová a bočná srsť mladých, približne 22-denných samcov alebo samíc potkanov (z kmeňa príbuzného Wistaru alebo porovnateľného kmeňa) sa opatrne odstráni malými nožnicami. Zvieratá sa následne umyjú opatrným utieraním, pričom sa ostrihaná oblasť ponorí do antibiotického roztoku (obsahujúceho napríklad streptomycín, penicilín, chloramfenikol a amfotericín v koncentráciách účinne inhibujúcich rast baktérií). Zvieratá sa na tretí alebo štvrtý deň po prvom omytí znova omyjú antibiotikami a použijú sa do troch dní od druhého omytia, keď sa rohovitá vrstva (*stratum corneum*) po odstránení srsti zregeneruje.

Príprava kožných terčíkov

16. Zvieratá sa humánne usmrcujú vo veku 28 až 30 dní, presný vek má rozhodujúci význam. Z každého zvieraťa sa potom odstráni dorzolaterálna koža, ktorá sa opatrne zbaví nadbytočného podkožného tuku. Odoberú sa kožné terčíky, z ktorých každý má priemer približne 20 mm. Koža sa pred použitím terčíkov môže uchovávať, ak sa preukáže, že údaje z pozitívnych a negatívnych kontrol sú rovnocenné s tými, ktoré sa získali s čerstvou kožou.

17. Každý kožný terčík sa preloží cez jeden z koncov trubice z PTFE (polytetrafluóretylén) tak, aby epidermálny povrch bol v kontakte trubicou. Cez koniec trubice sa natesno prevlečie gumený tesniaci krúžok, aby sa koža nepohybovala, a nadbytočné tkanivo sa oreže. Gumený tesniaci krúžok sa potom opatrne utesní na koniec trubice z PTFE vazelínou. Trubica sa v receptorovej komore obsahujúcej roztok $MgSO_4$ (154 mM) pridržiava pružinovou svorkou (obrázok 1). Kožný terčík by sa mal úplne ponoriť do roztoku $MgSO_4$. Z jednej kože potkana možno získať 10 až 15 kožných terčíkov. Rozmery trubice a tesniaceho krúžku sú uvedené na obrázku 2.

18. Pred začatím testovania sa na účely postupu kontroly kvality odmeria TER dvoch kožných terčíkov na každú kožu zvieraťa. Ak sa pri tejto testovacej metóde majú použiť zostávajúce terčíky, v prípade obidvoch terčíkov by mala byť nameraná hodnota elektrického odporu väčšia ako 10 kΩ. Ak je hodnota odporu nižšia ako 10 kΩ, zvyšné terčíky z danej kože by sa mali z testov vyradiť.

Aplikácia testovanej chemikálie a kontrolných látok

19. Pre každý testovací cyklus (pre každý pokus) by sa mali súbežne použiť pozitívne a negatívne kontroly, aby sa zaručila primeraná účinnosť daného experimentálneho modelu. V každom testovacom cykle (pri každom pokuse) by sa mali použiť kožné terčíky z jedného zvieraťa. Navrhovanými chemikáliami pre pozitívnu kontrolu je 10 M kyselina chlorovodíková a pre negatívnu kontrolu destilovaná voda.

20. Na epidermálny povrch vo vnútri trubice sa rovnomerne aplikujú tekuté testované chemikálie (150 µl). Pri testovaní tuhých materiálov sa na terčík rovnomerne aplikuje dostatočné množstvo tuhej látky, aby bol pokrytý celý povrch epidermy. Na tuhú látku sa pridá deionizovaná voda (150 µl) a trubica sa jemne pretrepe. S cieľom dosiahnuť maximálny styk s kožou môže byť potrebné zohriať tuhé látky na 30 °C, aby sa testovaná chemikália roztavila alebo zmäkla, alebo ju treba pomlieť na granulát alebo prášok.

21. Pre každú testovanú a kontrolnú chemikáliu sa v každom testovacom cykle (pri každom pokuse) použijú tri kožné terčíky. Testované chemikálie sa aplikujú 24 hodín pri teplote 20 – 23 °C. Testovaná chemikália sa odstráni omytím prúdom vody z vodovodu izbovej teploty, kým sa nedá odstrániť žiaden ďalší materiál.

Merania TER

22. Impedancia kože sa meria ako TER s použitím Wheatstonovho mostíka so striedavým prúdom nízkeho napätia (18). Všeobecné špecifikácie mostíka sú: 1 – 3 volty prevádzkového napätia, sínusový alebo pravouhlý tvar kmitov striedavého prúdu s frekvenciou 50 – 1 000 Hz a rozsah merania minimálne 0,1 – 30 kΩ. Merací mostík použitý vo validačnej štúdii meria induktanciu, kapacitanciu a odpor až do hodnôt 2 000 H, 2 000 μF a 2 MΩ pri frekvenciách 100 Hz alebo 1 kHz, s použitím sériových alebo paralelných hodnôt. Na účely merania TER v rámci skúšky žieravosti sa zaznamenávajú hodnoty odporu pri frekvencii 100 Hz a s použitím sériových hodnôt. Pred meraním elektrického odporu sa povrchové napätie kože zníži pridaním dostatočného množstva 70 % etanolu tak, aby sa epiderma zakryla. Po niekoľkých sekundách sa etanol z trubice odstráni a tkanivo sa potom zvlhčí pridaním 3 ml roztoku $MgSO_4$ (154 mM). Elektródy meracieho mostíka sa umiestnia na obe strany kožného terčíka a zmeria sa odpor v kΩ/kožný terčík (obrázok 1). Rozmery elektródy a dĺžka exponovanej elektródy pod krokosvorkami sú uvedené na obrázku 2. Svorka vnútornej elektródy je počas merania odporu položená na vrchu trubice z PTFE, aby sa zabezpečilo, že dĺžka elektródy ponorenej v roztoku $MgSO_4$ sa nemení. Vonkajšia elektróda je umiestnená vo vnútri receptorovej komory tak, aby spočívala na dne komory. Udržiava sa konštantná vzdialenosť medzi pružinovou svorkou a dolnou časťou trubice z PTFE (obrázok 2), pretože táto vzdialenosť má vplyv na nameranú hodnotu odporu. Vzdialenosť medzi vnútornou elektródou a kožným terčíkom by preto mala byť konštantná a minimálna (1 – 2 mm).

23. Ak je hodnota nameraného odporu väčšia ako 20 kΩ, môže to byť spôsobené tým, že na povrchu epidermy kožného terčíka sa nachádzajú zvyšky testovanej chemikálie. Táto vrstva sa môže odstrániť napríklad tak, že sa trubica z PTFE utesní palcom chráneným rukavicou a pretrepáva sa asi 10 sekúnd; odstráni sa roztok $MgSO_4$ a zopakuje sa meranie odporu s novým roztokom $MgSO_4$.

24. Vlastnosti a rozmery testovacej aparatúry a použitý experimentálny postup môžu mať vplyv na namerané hodnoty TER. Prahová hodnota 5 kΩ v prípade žieravín bola stanovená na základe údajov získaných špecifickou aparatúrou a špecifickým postupom, ktoré sú popísané v tejto testovacej metóde. Ak sa zmenia podmienky testovania alebo sa použije iná aparatúra, môžu sa použiť iné prahové a kontrolné hodnoty. Metodiku a prahové hodnoty odporu je preto potrebné kalibrovať testovaním série látok na preukázanie spôsobilosti, ktoré sa zvolia z látok použitých vo validačnej štúdii (8) (9), alebo z chemických tried podobných skúmaným látkam. V tabuľke 1 je uvedený zoznam vhodných látok na preukázanie spôsobilosti.

Metódy viazania farbiva

25. Expozícia kože určitým nežieravým materiálom môže mať za následok zníženie odporu pod prahovú hodnotu 5 kΩ, v dôsledku čoho sa umožní prienik iónov cez rohovitú vrstvu (*stratum corneum*) a zníži sa elektrický odpor (9). Napríklad neutrálne organické látky a látky, ktoré majú povrchovo aktívne vlastnosti (vrátane detergentov, emulzifikátorov a ostatných povrchovo aktívnych látok), môžu odstrániť kožné lipidy, čím sa bariéra stane pre ióny priepustnejšia. Preto, ak sú hodnoty TER takýchto chemikálií nižšie ako 5 kΩ, alebo sa pohybujú okolo tejto hodnoty, a kožný terčík nie je viditeľne poškodený, malo by sa vykonať posúdenie prieniku farbiva na kontrolných a ošetrených tkanivách, aby sa zistilo, či sú namerané hodnoty TER výsledkom zvýšenej priepustnosti kože alebo poleptania kože (7) (9). V prípade poleptania kože, keď sa rohovitá vrstva *stratum corneum* poruší, farbivo sulforodamín B pri aplikácii na povrch kože ňou rýchlo preniká a sfarbuje podkladové tkanivo. Toto konkrétne farbivo je stabilné v prostredí širokého rozsahu chemikálií a nemá naň vplyv extrakčný postup opísaný ďalej.

Aplikácia a odstránenie farbiva sulforodamínu B

26. Po posúdení TER sa síran horečnatý odstráni z trubice a koža sa pozorne preskúma, či nie je viditeľne poškodená. Ak sa nepozoruje žiadne väčšie viditeľné poškodenie (napr. perforácia), aplikuje sa 150 μl 10 hm./obj. % zriedenia sulforodamínu B (Acid Red 52; č. C.I. 45100; CAS číslo 3520-42-1) v destilovanej vode na každý kožný terčík počas 2 hodín. Tieto kožné terčíky sa potom asi 10 sekúnd omývajú vodou z vodovodu maximálne izbovej teploty, aby sa odstránilo všetko nadbytočné/neviazané farbivo. Všetky kožné terčíky sa opatrne odoberú z trubice z PTFE a umiestnia sa do nádoby (napr. 20 ml sklenená scintilačná nádoba) obsahujúcej deionizovanú vodu (8 ml). Nádoby sa 5 minút ľahko pretrepávajú, aby sa odstránilo nadbytočné neviazané farbivo. Tento postup oplachovania sa potom zopakuje a kožné terčíky sa následne vyberú a vložia do nádob obsahujúcich 5 ml 30 hm./obj. % nátrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilovanej vode a cez noc sa inkubujú pri teplote 60 °C.

27. Po inkubácii sa všetky kožné terčíky odstránia a zlikvidujú a zostávajúci roztok sa odstreďuje 8 minút pri teplote 21 °C (pri relatívnej odstredivej sile ~ 175 × g). Vzorka supernatantu s objemom 1 ml sa zriedi v pomere 1:5 obj. % [t. j. 1 ml + 4 ml] s 30 hm./obj. % SDS v destilovanej vode. Optická hustota (OD) roztoku sa meria pri 565 nm.

Výpočet obsahu farbiva

28. Obsah farbiva sulforodamín B v kožnom terčíku sa vypočíta z hodnôt OD (9) (molárny koeficient extinkcie farbiva sulforodamín B pri 565 nm = 8,7 × 10^4, molekulová hmotnosť = 580). Obsah farbiva sa určí pre každý kožný terčík s využitím vhodnej kalibračnej krivky a potom sa vypočíta stredná hodnota obsahu farbiva pre replikáty.

Kritériá prijateľnosti

29. Stredné hodnoty výsledkov TER sú prijateľné, ak súbežne namerané hodnoty pozitívnej aj negatívnej kontroly spadajú do prijateľných rozsahov danej metódy v danom skúšobnom laboratóriu. Pre opísanú metodiku a aparatúru sú prijateľné hodnoty rozsahov odporu uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah odporu (kΩ)
pozitívna	10 M kyselina chlorovodíková	0,5 – 1,0
negatívna	destilovaná voda	10 – 25

30. Výsledné stredné hodnoty viazania farbiva sú prijateľné, ak hodnoty pre súbežné kontroly spadajú do prijateľných rozsahov danej metódy. Pre opísanú metodiku a aparatúru sa navrhujú prijateľné rozsahy obsahu farbiva pre kontrolné látky uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah obsahu farbiva (μg/terčík)
pozitívna	10 M kyselina chlorovodíková	40 – 100
negatívna	destilovaná voda	15 – 35

Interpretácia výsledkov

31. Medzná hodnota TER na rozlíšenie medzi žieravou a nežieravou testovanou chemikáliou sa stanovila v rámci optimalizácie testovacej metódy, skúšala sa v predvalidačnej fáze a bola potvrdená formálnou validačnou štúdiou.

32. Prognostický model na testovaciu metódu poleptania kože TER na potkanej koži (9) (19) spojený s klasifikačným systémom GHS OSN/CLP:

Testovaná chemikália sa pokladá za látku nežieravú pre kožu:

i) ak je stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu väčšia ako (>) 5 kΩ, alebo

ii) ak sa stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu rovná 5 kΩ alebo je menšia (≤) a

— nepozoruje sa žiadne viditeľné poškodenie kožných terčíkov (napr. perforácia) a

— stredná hodnota obsahu farbiva kožného terčíka je menšia ako (<) stredná hodnota obsahu farbiva kožného terčíka získaná v rámci súbežne vykonávanej pozitívnej kontroly s 10 M HCl (pre hodnoty pozitívnej kontroly pozri odsek 30).

Testovaná chemikália sa pokladá za žieravú pre kožu:

i) ak sa stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu rovná 5Ω alebo je menšia (≤) a kožné terčíky sú viditeľne poškodené (napr. perforované) alebo

ii) ak sa stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu rovná 5 kΩ alebo je menšia (≤) a

— nepozoruje sa žiadne viditeľné poškodenie kožných terčíkov (napr. perforácia), ale

— stredná hodnota obsahu farbiva kožného terčíka sa rovná strednej hodnote obsahu farbiva kožného terčíka získaný v rámci súbežne vykonávanej pozitívnej kontroly s 10 M HCl (pre hodnoty pozitívnej kontroly pozri odsek 30) alebo je väčší (≥).

33. Jeden testovací cyklus (pokus), ktorý sa skladá najmenej z troch replík kožných terčíkov, by mal pre testovanú chemikáliu postačovať, ak je jeho klasifikácia jednoznačná. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replík a/alebo ak sa stredná hodnota TER rovná 5 ±0,5 k, je potrebné zvážiť vykonanie druhého nezávislého testovacieho cyklu (pokusu), ako aj tretieho testovacieho cyklu, ak sa výsledky z prvých dvoch testovacích cyklov (pokusov) nezhodujú.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

34. Správy o hodnotách odporu (kΩ) a prípadne hodnotách obsahu farbiva (μg/terčík) pre testovanú chemikáliu, ako aj pre pozitívne a negatívne kontroly, by sa mali podávať vo forme tabuliek vrátane údajov pre každý jednotlivý replikát terčíka v každom testovacom cykle (pokuse) a stredné hodnoty ± SD. O všetkých opakovaných pokusoch by sa mali podať správy. Pozorované poškodenie kožných terčíkov by sa malo nahlasovať pre každú testovanú chemikáliu.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované chemikálie a kontrolné látky:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— mnohozložková látka, UVCB a zmes: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívny výskyt a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe,

— podmienky skladovania.

Pokusné zvieratá:

— kmeň a pohlavie,

— vek zvierat, ak sú použité ako darcovské zvieratá,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— podrobnosti o príprave kože.

Podmienky testovania:

— kalibračné krivky testovacej aparatúry,

— kalibračné krivky na vykonanie testu viazania farbiva, pásmový filter použitý na meranie hodnôt optickej hustoty a rozsah linearity optickej hustoty meracieho zariadenia (napr. spektrofotometer), ak je to relevantné,

— podrobnosti o použitom testovacom postupe na meranie TER,

— podrobnosti o testovacom postupe použitom na posúdenie viazania farbiva, ak je to relevantné,

— použité testovacie dávky, trvanie expozičného(-ých) času(-ov) a teplota(-y) expozície,

— podrobnosti o použitých postupoch umývania po expozičnom čase,

— počet replikátov kožných terčíkov použitých pri každej testovanej chemikálii a kontrole (pozitívna aj negatívna kontrola),

— opis každej zmeny testovacieho postupu,

— odkaz na historické údaje o modeli. K nim by mali okrem iného patriť:

i) prijateľnosť hodnôt TER pozitívnej a negatívnej kontroly (v kΩ) s odkazom na rozsahy odporu pozitívnych a negatívnych kontrol;

ii) prijateľnosť hodnôt obsahu farbiva pozitívnej a negatívnej kontroly (v μg/terčík) s odkazom na rozsahy obsahu farbiva pozitívnych a negatívnych kontrol;

iii) prijateľnosť výsledkov testu s odkazom na historickú variabilitu medzi replikátmi kožných terčíkov;

— opis uplatnených rozhodovacích kritérií/prognostických modelov.

Výsledky:

— uvedenie (v podobe tabuliek) údajov zo skúšok TER a skúšok viazania farbiva (v prípade potreby) pre jednotlivé testované chemikálie a kontroly, každý testovací cyklus (pokus) a každý replikát kožného terčíka (jednotlivé zvieratá a jednotlivé vzorky kože), stredné hodnoty, štandardné odchýlky (SD) a variačné koeficienty (CV),

— opis všetkých pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia v súvislosti s prognostickým modelom/rozhodovacími kritériami, ktoré sa používajú.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

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

(2) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie, poleptanie kože.

(3) Kapitola B.40a tejto prílohy, Model kože *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 tejto prílohy, Metóda na testovanie s využitím membránovej bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 tejto prílohy, Podráždenie kože *in vitro*: Test na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky.

(6) OECD (2014). *Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, (No 203), Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

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

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

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

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

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

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

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

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

(15) OECD (2015). *Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218*. Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

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

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

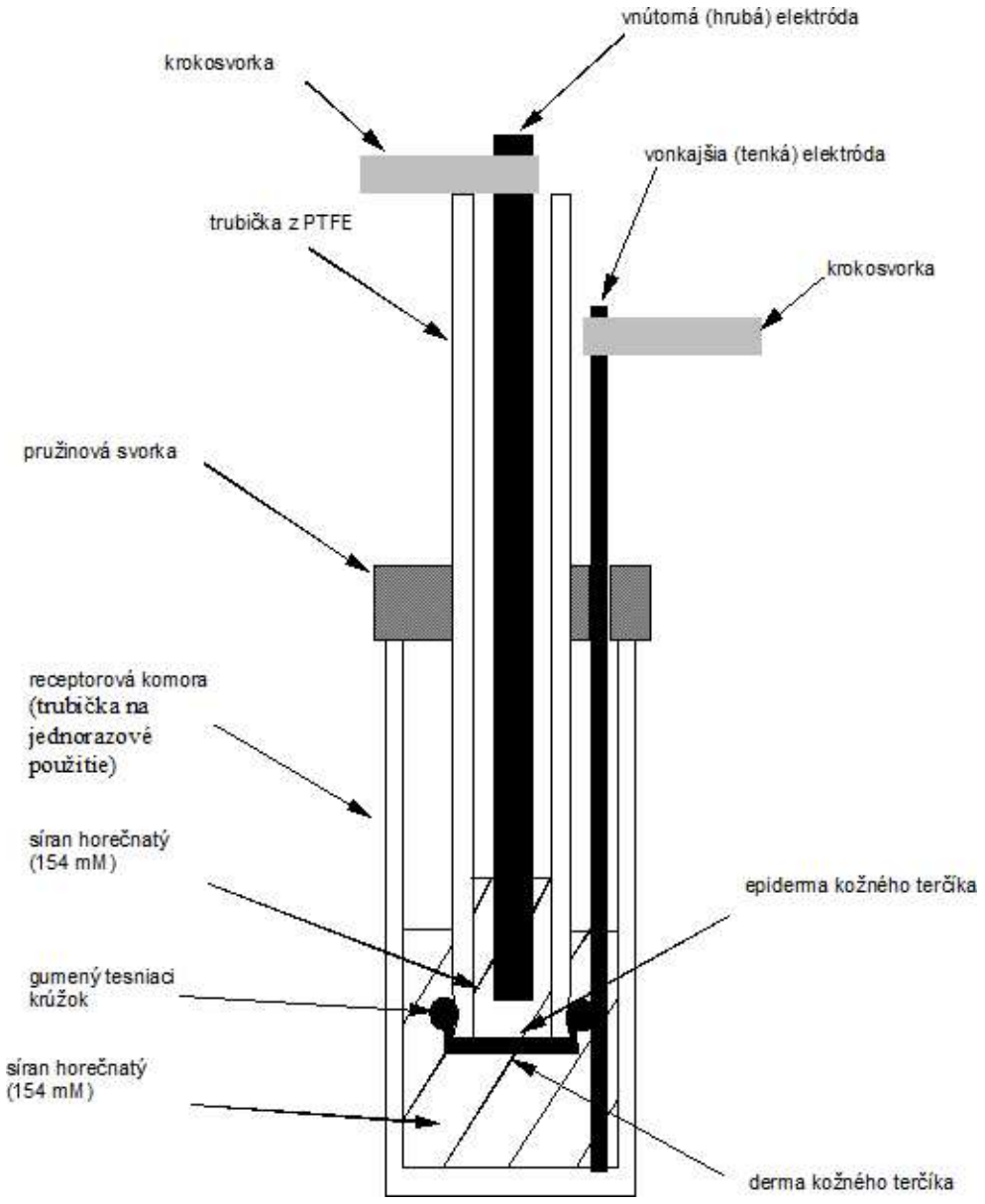
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher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

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

(20) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, (No 34), Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

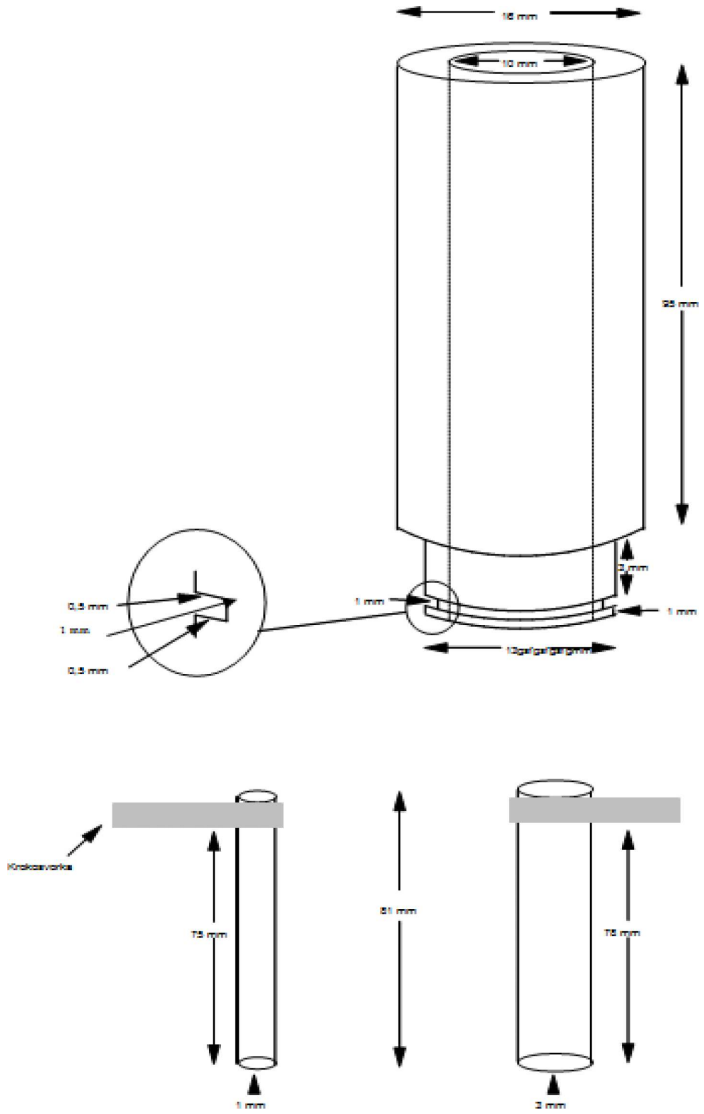
Obrázok 1

Aparatúra na Meranie ter Potkanej Kože



Obrázok 2

Rozmery Polytetrafluóretylénovej Trubice (PTFE) a Trubice Receptora a Použitých Elektród



Rozhodujúce faktory zobrazenej aparatúry:

— vnútorný priemer trubice z PTFE,

— dĺžka elektród v pomere k trubici z PTFE a trubici receptora by mala byť taká, že elektródy nedosahujú ku kožnému terčíku a elektróda so štandardnou dĺžkou je v kontakte s roztokom $MgSO_4$,

— množstvom roztoku $MgSO_4$ v trubici receptora by sa mala vzhľadom na úroveň hladiny v trubici z PFTE zabezpečiť taká hĺbka tekutiny, ako je znázornené na obrázku 1,

— kožný terčík by mal byť k trubici z PFTE pripevnený tak, aby elektrický odpor predstavoval skutočnú mieru vlastností kože.

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy a akceptovaných referenčných hodnôt. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jedno z rozhodujúcich hľadísk. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (20).

C: Žieravina.

Chemikália: látka alebo zmes.

Zhoda: miera výkonnosti testovacej metódy v rámci skúšobných metód, ktoré poskytujú jednoznačný výsledok, a tiež jedno z rozhodujúcich hľadísk. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a vymedzuje sa ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo vysokej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch testovaných chemikálií, ktoré sa skúmajú (20).

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (OSN)]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

Zmes: zmes alebo roztok, ktoré sú zložené z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo ku chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NC: nežieravá látka.

OD: optická hustota.

PC: pozitívna kontrola, replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému, ošetrený látkou, o ktorej sa vie, že vyvoláva pozitívnu odozvu. Aby sa zabezpečila možnosť hodnotenia variability odozvy pozitívnej kontroly v priebehu času, rozsah pozitívnej odozvy by nemal byť nadmerný.

Výkonnostné normy (Performance standards – PS): normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy; a iii) podobné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií.

Relevantnosť: opis vzťahu testovacej metódy k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej testovacia metóda správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (20).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda v priebehu času reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, ak sa pri nej používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (20).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, pričom ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (20).

Poleptanie kože *in vivo*: vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez pokožku až do kože po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch zmena farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (20).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie stability látky a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ale s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo bez zmeny jej zloženia.

(Testovací) cyklus: jedna testovaná chemikália, ktorá sa testuje súbežne minimálne v troch paralelných kožných terčíkoch.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

Transkutánny elektrický odpor (TER): je miera elektrickej impedancie kože vyjadrená ako hodnota odporu v kiloohmoch. Jednoduchá a spoľahlivá metóda posúdenia bariérovej funkcie spočíva v zaznamenávaní prechodu iónov cez kožu s použitím aparatúry s Wheatstonovým mostíkom.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.“

6. V časti B sa kapitola B.40a nahrádza takto:

„B.40a **POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA S POUŽITÍM REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY (RhE)**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 431 (2016). Poleptanie kože je vznik nevratného poškodenia kože, ktoré sa prejavuje ako viditeľná nekróza cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie [v znení definície podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadenia Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1])]. Touto aktualizovanou testovacou metódou B.40a sa zabezpečuje postup *in vitro*, ktorý umožňuje identifikáciu nežieravých a žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN a CLP. Umožňuje sa ňou aj čiastočné zaradenie žieravých látok do podkategórií.

2. Posudzovanie žieravých vlastností chemikálií pre kožu sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách (TM B.4, rovnocenná s usmernením OECD TG 404, ktoré bolo pôvodne prijaté v roku 1981 a revidované v rokoch 1992, 2002 a 2015) (2). Okrem súčasnej testovacej metódy B.40a sa validovali a prijali dve ďalšie testovacie metódy *in vitro* na testovanie žieravých vlastností chemikálií – TM B.40 (rovnocenná s usmernením OECD TG 430) (3) a TM B.65 (rovnocenná s usmernením OECD TG 435) (4). Okrem toho sa na testovanie vlastností dráždivosti pre kožu prijala metóda*in vitro* TM B.46 (rovnocenná s usmernením OECD TG 439) (5). V usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade poleptania a podráždenia kože sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, pričom sa v ňom uvádza usmernenie o tom, i) ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie dráždivých a žieravých vlastností chemikálií pre kožu a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (6).

3. Táto testovacia metóda sa týka podráždenia kože ako sledovaného parametra ľudského zdravia. Využíva sa pri nej rekonštruovaná ľudská pokožka (RhE) (získaná z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky), ktorá dôkladne napodobňuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti vrchných častí ľudskej kože, t. j. pokožky. Príslušné usmernenie OECD na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2004, pričom v roku 2013 sa aktualizovalo s cieľom začleniť doň dodatočné testovacie metódy, pri ktorých sa používa model RhE, ako aj možnosť používať metódy umožňujúce zaradenie žieravých chemikálií do podkategórií, a v roku 2015 sa aktualizovalo s cieľom odkázať na usmerňovací dokument IATA a zaviesť používanie alternatívneho postupu na meranie životaschopnosti.

4. V tejto testovacej metóde sú začlenené štyri validované komerčne dostupné modely RhE. V prípade dvoch z týchto komerčne dostupných modelov testovania – EpiSkin™ Standard Model (SM) a EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (na ktoré sa ďalej v texte odkazuje ako na validované referenčné metódy alebo VRM) sa vykonali predvalidačné štúdie (7), po ktorých nasledovala riadna validačná štúdia na posúdenie poleptania kože (8)(9)(10)(11) (12). Výsledky týchto štúdií viedli k odporúčaniu, že dve uvedené validované referenčné metódy by sa mohli používať na regulačné účely na odlíšenie žieravých (C) a nežieravých (NC) látok a že model EpiSkin™ by sa navyše mohol používať na podporu zaradenia žieravých látok do podkategórií (13)(14)(15). Dvoma ďalšími komerčne dostupnými modelmi RhE testovania poleptania kože *in vitro* sa dospelo k podobným výsledkom ako v prípade EpiDerm™ VRM podľa validácie na základe výkonnostných noriem (16)(17)(18). Ide o modely SkinEthic™ RHE ([2]) a epiCS® (predtým nazvaný EST-1000), ktoré sa takisto môžu používať na regulačné účely na odlíšenie žieravých a nežieravých látok (19)(20). Postvalidačnými štúdiami, ktoré vykonali výrobcovia modelu RhE v rokoch 2012 až 2014 s prepracovaným protokolom s korekciou na interferencie nešpecifickej redukcie MTT prostredníctvom testovaných chemikálií, sa zlepšila výkonnosť odlišovania žieravých a nežieravých látok, ako aj podpora zaraďovania žieravých látok do podkategórií (21)(22). Ďalšie štatistické analýzy postvalidačných údajov, ktoré boli získané pomocou EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a EpiCS® sa vykonali s cieľom identifikovať alternatívne prediktívne modely, ktorými sa zlepšila prediktívna schopnosť na účely podkategorizácie (23).

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008).

([2]) Skratka RhE (rekonštruovaná ľudská pokožka) sa používa pre všetky modely založené na technológii RhE. Skratka RHE používaná v spojitosti s modelom SkinEthic™ znamená to isté, ale ako súčasť názvu tejto špecifickej testovacej metódy v podobe uvádzanej na trh sa píše celá veľkými písmenami.

5. Pred tým, ako sa môže na regulačné účely použiť navrhovaná podobná alebo upravená metóda RhE *in vitro* na testovanie poleptania kože, ktorá je iná ako validované referenčné metódy, by sa mala stanoviť jej spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jej navrhovaného používania, aby sa zabezpečila podobnosť s validovanými referenčnými metódami v súlade s požiadavkami výkonnostných noriem (PS) (24) stanovenými v súlade so zásadami usmerňovacieho dokumentu OECD č. 34 (25). Vzájomné uznávanie údajov je možné zaručiť len po tom, ako sa každá navrhovaná nová alebo aktualizovaná testovacia metóda na základe výkonnostných noriem preskúma a zaradí do príslušného usmernenia na vykonávanie testov. Modely testovania zaradené do uvedeného usmernenia na vykonávanie testov možno využívať na riešenie požiadaviek krajín, ktoré sa týkajú výsledkov testov v súvislosti s metódou testovania poleptania kože *in vitro*, a to pri súčasnom využívaní prínosov plynúcich zo vzájomného uznávania údajov.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

7. Touto testovacou metódou sa umožňuje identifikácia nežieravých a žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN a CLP. Touto testovacou metódou sa okrem toho podporuje podkategorizácia žieravých látok a zmesí do nepovinnej podkategórie 1A v súlade s GHS OSN (1), ako aj kombinácia podkategórií 1B a 1C (21)(22)(23). Obmedzením tejto metódy je skutočnosť, že neumožňuje rozlišovanie medzi podkategóriami poleptania kože 1B a 1C v súlade s GHS OSN a CLP v dôsledku obmedzeného súboru známych žieravých chemikálií *in vivo* podkategórie 1C. Na základe modelov testovania EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS® je možné zaraďovanie do podkategórií (t. j. 1A verzus 1B a 1C verzus NC).

8. Pri validácii podporujúcej modely testovania zahrnuté do tejto testovacej metódy, ak sa používajú na identifikáciu nežieravých a žieravých látok, sa testovala široká škála chemikálií predstavujúcich predovšetkým individuálne látky. empirická databáza validačnej štúdie obsahovala celkovo 60 chemikálií, ktoré sa vzťahujú na širokú škálu tried chemikálií (8)(9)(10). Autori testovacej metódy vykonali testovanie na preukázanie citlivosti, špecifickosti, presnosti a vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti skúšky na účely podkategorizácie a výsledky preskúmala organizácia OECD (21) (22) (23). Na základe celkových dostupných údajov je daná testovacia metóda uplatniteľná na širokú škálu tried chemikálií a fyzikálnych stavov vrátane kvapalín, polotuhých látok, tuhých látok a voskov. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Tuhé materiály by sa mali podľa možnosti pred aplikáciou zomlieť na jemný prášok; žiadne iné predchádzajúce ošetrenie vzorky sa nevyžaduje. V prípadoch, keď je možné preukázať dôkazy o nepoužiteľnosti testovacích modelov zahrnutých do tejto testovacej metódy v prípade iných špecifických kategórií testovaných chemikálií, by sa tieto modely nemali použiť pri uvedenej špecifickej kategórii testovaných chemikálií. Táto testovacia metóda sa okrem toho považuje za použiteľnú v prípade zmesí ako rozšírenie jej použiteľnosti pri látkach. Vzhľadom na skutočnosť, že zmesi zahŕňajú široké spektrum kategórií a zloženia, a na skutočnosť, že v súčasnosti sú dostupné iba obmedzené informácie o testovaní zmesí, v prípadoch, keď možno preukázať dôkazy o nepoužiteľnosti testovacej metódy pri špecifickej kategórii zmesí (napr. na základe stratégie navrhovanej v odseku 26), by sa však daná testovacia metóda nemala používať pri uvedenej špecifickej kategórii zmesí. Pred použitím danej testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na daný účel, a ak áno, prečo. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie danej zmesi. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačných štúdiách (8)(9)(10). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať použitím technológie RhE, aktuálna testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

9. Testované chemikálie absorbujúce svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT a testované chemikálie so schopnosťou priamo redukovať vitálne farbivo MTT (na formazán MTT) môžu interferovať s výsledkami merania životaschopnosti tkaniva a môžu si vyžadovať použitie upravených kontrol na korekcie. Typ prispôsobených kontrol, ktoré môžu byť potrebné, sa bude rôzniť v závislosti od typu interferencie produkovanej testovanou chemikáliou a postupu použitého na meranie formazánu MTT (pozri odseky 25–31).

10. Keďže táto testovacia metóda neposkytuje dostatočné informácie o podráždení kože, treba poznamenať, že TM B.46 sa špecificky zameriava na zdravotný účinok podráždenia kože *in vitro* a je založená na tom istom systéme testovania na modeli RhE, hoci sa pri nej používa iný protokol (5). Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii kože by sa mal použiť usmerňovací dokument OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (6). Tento prístup IATA zahŕňa vykonanie *in vitro* testov poleptania kože (opísaných v tejto testovacej metóde) a podráždenia kože pred zvážením testovania na živých zvieratách. Je známe, že použitie ľudskej kože podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zásadám a podmienkam.

PRINCÍP TESTU

11. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model RhE pozostávajúci z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky, ktoré sa vykultivovali tak, aby vytvorili viacvrstvový, vysoko diferencovaný model ľudskej pokožky. Pozostáva z organizovanej bazálnej vrstvy, vrstvy ostnitých buniek a vrstvy zrnitých buniek a viacvrstvovej rohovitej vrstvy (*stratum corneum*) obsahujúcej medzibunkové lipidové lamelové vrstvy predstavujúce hlavné triedy lipidov, ktoré sú analogické s vrstvami nachádzajúcimi sa *in vivo*.

12. Testovacia metóda RhE sa zakladá na predpoklade, že žieravé chemikálie sú schopné preniknúť rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difúziou alebo eróziou a sú cytotoxické pre bunky v hlbších vrstvách. Životaschopnosť buniek sa meria enzymatickou premenou vitálneho farbiva MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid, tiazolylová modrá; CAS číslo 298-93-1] na modrú formazánovú soľ, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (27). Žieravé chemikálie sa identifikujú na základe ich schopnosti spôsobiť pokles životaschopnosti buniek pod vymedzené prahové úrovne (pozri odseky 35 a 36). Ukázalo sa, že testovacia metóda poleptania kože s použitím RhE umožňuje predvídať výsledky zisťovania poleptania kože *in vivo* pri králikoch podľa TM B.4 (2).

PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI

13. Pred bežným použitím ktoréhokoľvek zo štyroch validovaných testovacích modelov RhE, ktoré zodpovedajú požiadavkám tejto testovacej metódy, by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť správnou klasifikáciou dvanástich chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 1. V prípade použitia metódy podklasifikácie by sa zároveň mala preukázať správnosť daného zaradenia do podkategórie. V prípadoch, keď uvedená látka nie je k dispozícii alebo keď je to odôvodniteľné, možno použiť inú látku, pri ktorej sú k dispozícii primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napríklad zo zoznamu referenčných chemikálií (24)], za predpokladu, že sa uplatnia rovnaké kritériá výberu, ktoré sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti [1]

Látka	CAS č.	Chemická trieda [2]	Kat. GHS OSN/CLP založená na výsledkoch *In Vivo* (testov) [3]	VRM kat. založená na výsledkoch *In Vitro* [4]	MTT redukcia [5]	Fyzikálny stav
Žieraviny *in vivo*, podkategória 1A						
kyselina brómoctová	79-08-3	organická kyselina	1A	(3) 1A	—	tuhá látka
dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganická kyselina	1A	(3) 1A	—	kvapalina
fenol	108-95-2	fenol	1A	(3) 1A	—	tuhá látka
dichlóracetyl chlorid	79-36-7	elektrofil	1A	(3) 1A	—	kvapalina
Žieraviny *in vivo*, kombinácia podkategórií 1B a 1C						
monohydrát kyseliny glyoxylovej	563-96-2	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	tuhá látka

Látka	CAS č.	Chemická trieda ([2])	Kat. GHS OSN/CLP založená na výsledkoch *In Vivo* (testov) ([3])	VRM kat. založená na výsledkoch *In Vitro* ([4])	MTT redukcia ([5])	Fyzikálny stav
Žieraviny *in vivo*, podkategória 1A						
kyselina mliečna	598-82-3	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	kvapalina
etanolamín	141-43-5	organická báza	1B	(3) 1B a 1C	áno	viskózna látka
kyselina chlorovodíková (14,4 %)	7647-01-0	anorganická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	kvapalina
Nežieravé látky *In Vivo*						
fenetylbromid	103-63-9	elektrofil	nežier. (NC)	(3) nežier. (NC)	áno	kvapalina
4H-1,2,4-triazolylamín	584-13-4	organická báza	nežier. (NC)	(3) nežier. (NC)	—	tuhá látka
4-(metylsulfanyl) benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	nežier. (NC)	(3) nežier. (NC)	áno	kvapalina
kyselina laurová	143-07-7	organická kyselina	nežier. (NC)	(3) nežier. (NC)	—	tuhá látka

Skratky: CASRN = registračné číslo CAS (CAS číslo, Chemical Abstracts Service Registry Number) VRM = validovaná referenčná metóda; NC = nežieravá chemikália.

([1]) Látky na preukázanie spôsobilosti, rozdelené najprv podľa toho, či ide o žieravé alebo nežieravé látky, potom podľa podkategórie žieravých látok a následne podľa chemickej triedy, boli vybraté spomedzi látok použitých vo validačných štúdiách centra ECVAM týkajúcich sa modelov EpiSkin™ a EpiDerm™ (8) (9) (10) a z postvalidačných štúdií na základe údajov poskytnutých autormi EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ a epiCS® (23). Pokiaľ to nebolo uvedené inak, látky boli testované na úrovni čistoty získanej pri nákupe z komerčného zdroja (8) (10). Výber v najvyššej možnej miere zahŕňa látky, ktoré: i) sú reprezentatívne z hľadiska rozsahu poleptania (napr. nežieravé látky; slabé až silné žieraviny), ktoré možno zmerať alebo predpovedať prostredníctvom validovaných referenčných metód; ii) sú reprezentatívne z hľadiska chemických tried použitých vo validačných štúdiách; iii) majú dobre definované chemické štruktúry; iv) pri validovanej referenčnej metóde vyvolávajú reprodukovateľné výsledky; v) pri referenčnej testovacej metóde *in vivo* vyvolávajú konečné výsledky; vi) sú komerčne dostupné a vii) nesúvisia s neúmernými nákladmi na zneškodnenie.

([2]) Chemická trieda pridelená prostredníctvom Barratt *et al.* (8).

([3]) Zodpovedajúce skupiny obalov OSN sú I, II a III (v danom poradí), pre GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C.

([4]) Predpoklady validovanej referenčnej metódy *in vitro* uvedené v tejto tabuľke boli získané prostredníctvom testovacích modelov EpiSkin™ a EpiDerm™ počas postvalidačného testovania, ktoré vykonali autori testovacej metódy.

([5]) Hodnoty životaschopnosti získané pri validačných štúdiách centra ECVAM zameraných na poleptanie kože neboli upravené vzhľadom na priamu redukciu MTT (usmrtené kontroly sa vo validačných štúdiách nevykonávali). Postvalidačné údaje generované autormi testovacej metódy, ktoré sú uvedené v tejto tabuľke (23), sa však získali na základe prispôsobených kontrol.

14. Ako súčasť postupu overovania spôsobilosti sa odporúča, aby používateľ overil bariérové vlastnosti tkanív po ich prijatí, ako to stanovuje výrobca modelu RhE. To je osobitne dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhých časových období. Po úspešnom stanovení testovacej metódy a preukázaní spôsobilosti na jej použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri bežnom používaní testovacej metódy sa však odporúča naďalej v pravidelných intervaloch posudzovať bariérové vlastnosti.

POSTUP

15. Nasleduje všeobecný opis zložiek a postupov testovacích modelov RhE určených na posúdenie poleptania kože, na ktoré sa táto metóda vzťahuje. Modely RhE schválené ako vedecky platné na použitie v rámci tejto testovacej metódy, *t. j.* modely EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE a epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), možno získať z komerčných zdrojov. Pre tieto štyri modely RhE sú k dispozícii štandardné operačné postupy (SOP) (34) (35) (36) (37) a hlavné zložky testovacej metódy sú zhrnuté v dodatku 2. Pri uplatňovaní a používaní jedného z týchto modelov v laboratóriu sa odporúča použitie príslušných štandardných operačných postupov. Testovanie so štyrmi testovacími modelmi RhE, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda, by malo byť v súlade s týmto:

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY S POUŽITÍM RHE

Všeobecné podmienky

16. Na rekonštrukciu epitelu by sa mali použiť netransformované ľudské keratinocyty. Pod funkčnou vrstvou *stratum corneum* by sa malo nachádzať viacero vrstiev životaschopných epitelových buniek (bazálna vrstva, *stratum spinosum, stratum granulosum*). Rohovitá vrstva *stratum corneum* by mala byť viacvrstvová a obsahovať základný lipidový profil, aby sa vytvorila silná funkčná bariéra, ktorá odolá rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných chemikálií, ku ktorým patrí napríklad dodecylsulfát sodný (SDS) alebo Triton X-100. Mala by sa preukázať bariérová funkcia, ktorá sa môže posudzovať buď stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, alebo stanovením expozičného času, ktorý je potrebný na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET_{50}) po aplikácii referenčnej chemikálie v určenej pevne stanovenej koncentrácii (pozri odsek 18). Izolačné vlastnosti modelu RhE by mali zabrániť prieniku materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva, čo by viedlo k chybnému modelovaniu expozície kože. Model RhE by nemal byť kontaminovaný baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

17. Skúška použitá na kvantifikovanie životaschopnosti tkaniva je skúška MTT (27). Životaschopné bunky RhE modelu tkaniva redukujú vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT, ktorý sa potom z tkaniva extrahuje pomocou izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla). Optická hustota (OD) samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne nízka, t. j. OD < 0,1. Extrahovaný formazán MTT môže byť kvantifikovaný buď meraním absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (38). Používatelia modelu RhE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre hodnoty optickej hustoty negatívnej kontroly by mal stanoviť autor/dodávateľ modelu RhE. V tabuľke 2 sú uvedené rozsahy prijateľnosti pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole v prípade štyroch validovaných testovacích modelov RhE zahrnutých v tejto testovacej metóde. Používateľ spektrofotometrie HPLC/UPLC by mal pri negatívnej kontrole ako akceptačné kritérium použiť rozsahy optickej hustoty pri negatívnej kontrole stanovené v tabuľke 2. Malo by sa zaznamenať, že tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou sú počas času expozície stabilné v kultúre (zabezpečujú podobné výsledky merania optickej hustoty).

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti hodnôt optickej hustoty pri negatívnej kontrole na kontrolu kvality šarže

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
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

Bariérová funkcia

18. Rohovitá vrstva *stratum corneum* a jej lipidové zloženie by mali byť dostačujúce na zabránenie rýchlemu prieniku určitých cytotoxických referenčných chemikálií (napr. SDS alebo Triton X-100), a to podľa odhadu pomocou IC_{50} alebo ET_{50} (tabuľka 3). Autor/predajca modelu RhE by mal pri dodaní tkanív konečnému používateľovi predviesť bariérovú funkciu každej šarže použitého modelu RhE (pozri odsek 21).

Morfológia

19. Model RhE by sa mal histologicky preskúmať, pričom by sa mala preukázať viacvrstvová štruktúra podobná ľudskej pokožke, ktorá obsahuje *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* a *stratum corneum* a ktorá vykazuje lipidový profil podobný lipidovému profilu ľudskej pokožky. Autor/predajca modelu RhE by mal pri dodaní tkanív konečnému používateľovi zabezpečiť histologické preskúmanie každej šarže použitého modelu RhE, pričom by sa mala preukázať vhodná morfológia tkanív (pozri odsek 21).

Reprodukovateľnosť

20. Používatelia testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť testovacích metód v priebehu času s pozitívnymi a negatívnymi kontrolami. Daná testovacia metóda by sa navyše mala používať len v prípade, ak autor/dodávateľ modelu RhE poskytne údaje preukazujúce reprodukovateľnosť v priebehu času so žieravými a nežieravými chemikáliami, napríklad chemikáliami zo zoznamu chemikálií na preukázanie spôsobilosti (tabuľka 1). V prípade použitia testovacej metódy na účely zaraďovania do podkategórií by sa mala preukázať aj reprodukovateľnosť s ohľadom na zaraďovanie do podkategórií.

Kontrola kvality (QC)

21. Model RhE by sa mal používať len v prípade, ak autor/dodávateľ preukáže, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšie kritériá *životaschopnosti* (odsek 17), *bariérovej funkcie* (odsek 18) a *morfológie* (odsek 19). Tieto údaje sa poskytujú používateľom testovacej metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. V záujme spoľahlivej prognózy klasifikácie žieravín sú akceptovateľné len výsledky, ktoré sa získali zo šarží tkaniva prijateľných v rámci kontroly kvality. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre IC50 alebo ET50 stanovuje autor/dodávateľ modelu RhE. Rozsahy prijateľnosti pre dané štyri validované testovacie modely sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Kritériá kontroly kvality na uvoľnenie šarží do obehu

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM) (18-hodinové ošetrenie 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 hodiny	ET50 = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 10,0 hodiny
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 hodiny	ET50 = 7,0 hodiny

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií

22. Pri každej testovanej chemikálii a kontrolách by sa mali použiť aspoň dve replikáty tkaniva na každý expozičný čas. V prípade kvapalných aj tuhých chemikálií je potrebné na povrch pokožky rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovanej chemikálie, pričom je nutné vyhýbať sa nekonečnej dávke, t. j. malo by sa použiť minimálne 70 µL/cm^2 alebo 30 mg/cm^2. V závislosti od modelov by sa mal pred aplikáciou tuhých chemikálií povrch pokožky zvlhčiť deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby sa tak zlepšil kontakt testovanej chemikálie s povrchom pokožky (34)(35)(36)(37). Tuhé látky by sa mali podľa možnosti testovať vo forme jemného prášku. Metóda aplikácie by mala byť vhodná pre testovanú chemikáliu (pozri napr. odkazy 34 – 37). Na konci

expozičného obdobia by sa testovaná chemikália mala z pokožky dôkladne zmyť tlmivým roztokom alebo 0,9 % roztokom NaCl. V závislosti od toho, ktorý zo štyroch validovaných testovacích modelov RhE sa použije, sa pri každej testovanej chemikálii použijú dva alebo tri expozičné časy (v prípade všetkých štyroch validovaných modelov RhE: 3 minúty a 1 hodina; v prípade EpiSkin™ dodatočný expozičný čas v trvaní 4 hodín). V závislosti od použitého testovacieho modelu RhE a posudzovaného expozičného času sa môže inkubačná teplota počas expozície pohybovať v rozmedzí izbovej teploty a 37 °C.

23. V každom testovacom cykle by sa mali súbežne použiť negatívne a pozitívne kontroly (PC), aby sa preukázalo, že životaschopnosť (s negatívnymi kontrolami), bariérová funkcia a výsledná tkanivová citlivosť (s pozitívnou kontrolou) tkanív sa nachádzajú v rámci stanoveného historického rozsahu prijateľnosti. Navrhovanými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú ľadová kyselina octová alebo 8N KOH, a to v závislosti od použitého modelu RhE. Je potrebné poznamenať, že 8N KOH je priamym reduktantom MTT a môže si vyžadovať prispôsobené kontroly podľa opisu v odsekoch 25 a 26. Odporúčanými látkami pre negatívnu kontrolu sú 0,9 % roztok NaCl (vyjadrené v hm./obj. %) alebo voda.

Merania bunkovej životaschopnosti

24. V rámci tejto testovacej metódy by sa na meranie životaschopnosti buniek mala používať skúška MTT, ktorá je kvantitatívnou skúškou (27). Vzorka tkaniva sa na 3 hodiny vloží do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (0,3 alebo 1 mg/ml). Pomocou rozpúšťadla (napr. izopropanol, kyslý izopropanol) sa potom z tkaniva extrahuje vyzrážaný modrý formazánový produkt, pričom koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením optickej hustoty pri 570 nm pomocou filtra pásma priepustnosti pásmového filtra maximálne ±30 nm alebo prostredníctvom postupu spektrofotometrie HPLC/UPLC (pozri odseky 30 a 31) (38).

25. Testované chemikálie môžu interferovať so skúškou MTT, a to buď priamou redukciou MTT na modrý formazán, a/alebo prostredníctvom farebnej interferencie, ak testovaná chemikália prirodzene alebo v dôsledku postupov ošetrenia absorbuje v rovnakom rozsahu optickej hustoty (OD) ako formazán (570 ±30 nm, najmä modré a purpurové chemikálie). Na zistenie a korekciu potenciálnej interferencie vyplývajúcej z týchto testovaných chemikálií by sa mali použiť dodatočné kontroly, ako je kontrola nešpecifickej redukcie MTT (NSMTT) a kontrola nešpecifickej farby (NSC) (pozri odseky 26 až 30). To je obzvlášť dôležité vtedy, keď sa špecifická testovaná chemikália úplne neodstráni z tkaniva oplachovaním alebo keď prenikne cez pokožku, a preto je prítomná v tkanivách pri vykonávaní testu životaschopnosti MTT. Podrobný opis úpravy priamej redukcie MTT a interferencií farebnými činidlami sa nachádza v štandardných pracovných postupoch (SOP) pre testovacie modely (34)(35)(36)(37).

26. Na určenie priamych reduktantov MTT by sa mala každá testovaná chemikália pridať do čerstvo pripraveného média MTT (34) (35) (36) (37). Ak sa zmes MTT obsahujúca testovanú chemikáliu sfarbí do modra/purpurova, predpokladá sa, že daná testovaná chemikália priamo redukuje MTT, a mala by sa vykonať ďalšia funkčná kontrola neživotaschopnej pokožky, a to nezávisle od použitia merania absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometrie HPLC/UPLC. Pri tejto dodatočnej funkčnej kontrole sa využívajú usmrtené tkanivá, ktoré majú len zvyškovú metabolickú aktivitu, ale absorbujú testovanú chemikáliu v podobnom množstve ako životaschopné tkanivá. Každá chemikália, ktorá redukuje MTT, sa aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva na každý expozičný čas, ktoré sa potom podrobia celému testu poleptania kože. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív vystavených chemikálii redukujúcej MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej redukcie MTT získaný z usmrtených tkanív vystavených tej istej chemikálii redukujúcej MTT, počítané v porovnaní testovacím cyklom negatívnej kontroly vykonávaným súbežne s upravovaným testom (% NSMTT).

27. Na zistenie interferenčného potenciálu sfarbenými testovanými chemikáliami alebo testovanými chemikáliami, ktoré sa sfarbili pri kontakte s vodou alebo izopropanolom, a aj s cieľom rozhodnúť o potrebe dodatočných kontrol by sa mala vykonať spektrálna analýza testovanej chemikálie vo vode (prostredie počas expozície) a/alebo v izopropanole (extrakčný roztok). Ak testovaná chemikália vo vode a/alebo v izopropanole absorbuje svetlo v rozsahu 570 ±30 nm, mali by sa vykonať ďalšie kontroly s použitím farbiaceho činidla, alebo, ako alternatíva by sa mala použiť spektrofotometria HPLC/UPLC, a v tom prípade sa tieto kontroly nevyžadujú (pozri odseky 30 a 31). Pri meraní absorbancie štandardu (OD) sa každá interferujúca sfarbená testovaná chemikália

aplikuje najmenej na dva životaschopné replikáty tkaniva na každý čas expozície, ktoré sa potom podrobia celému testu kožnej leptavosti (žieravosti), ale počas kroku inkubácie sa namiesto roztoku MTT inkubujú s médiom s cieľom vygenerovať kontrolu nešpecifickej farby (NSC_{living}). Kontrola NSC_{living} sa musí vykonávať súbežne na každý čas expozície a na každú sfarbenú testovanú chemikáliu (v každom cykle) z dôvodu inherentnej biologickej variability živých tkanív. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s roztokom MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej zo živých tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom (% NSC_{living}).

28. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú identifikované ako chemikálie produkujúce tak priamu redukciu MTT (pozri odsek 26), ako aj farebnú interferenciu (pozri odsek 27), sa bude pri štandardnom meraní absorbancie (OD) vyžadovať aj tretí súbor kontrol, okrem kontrol NSMTT a NSC_{living}, ktoré sú opísané v predchádzajúcich odsekoch. Býva to tak zvyčajne v prípade tmavo sfarbených testovaných chemikálií, ktoré interferujú so skúškou MTT (napr. modré, purpurové, čierne), pretože ich prirodzená farba bráni hodnoteniu ich kapacity priamo redukovať MTT, ako sa opisuje v odseku 26. Tieto testované chemikálie sa môžu viazať tak na živé, ako aj na usmrtené tkanivá, a preto kontrola NSMTT môže nielen korigovať potenciálnu priamu redukciu MTT testovanou chemikáliou, ale aj farebnú interferenciu, ktorá vyplýva z väzby testovanej chemikálie na usmrtené tkanivá. To by mohlo viesť k dvojitej korekcii pri farebnej interferencii, keďže kontrola NSC_{living} už koriguje farebnú interferenciu, ktorá vyplýva z väzby testovanej chemikálie na živé tkanivá. S cieľom vyhnúť sa dvojitej korekcii pri farebnej interferencii je potrebné vykonať tretiu kontrolu pre nešpecifickú farbu v usmrtených tkanivách (NSCkilled). V tejto dodatočnej kontrole sa testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva na každý expozičný čas, ktoré sa podrobia celému postupu testovania, ale počas kroku inkubácie MTT sa inkubujú s médiom, a nie s roztokom MTT. Na každú testovanú chemikáliu postačuje jediná kontrola NSC_{killed}, a to bez ohľadu na počet vykonaných nezávislých testov/testovacích cyklov, ale mala by sa vykonať súbežne s kontrolou NSMTT a podľa možnosti s tou istou šaržou tkaniva. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív, ktoré boli vystavené testovanej chemikálii, mínus % NSMTT mínus % NSC_{living} plus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej z usmrtených tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, počítané vo vzťahu k negatívnej kontrole, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom (% NSC_{killed}).

29. Je dôležité poznamenať, že nešpecifická redukcia MTT a nešpecifické farebné interferencie môžu mať za následok zvýšenie hodnôt tkanivového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometra. Na tomto základe by malo každé laboratórium pred začatím testovania testovanej chemikálie na regulačné účely určiť rozsah linearity svojho spektrofotometra s formazánom MTT (CAS č. 57360-69-7) z komerčného zdroja. Meranie absorbancie štandardu (OD) s použitím spektrofotometra je obzvlášť vhodné na posúdenie chemikálií priamo redukujúcich MTT a farebne interferujúcich testovaných chemikálií, keď sa optické hustoty tkanivových extraktov, získaných s testovanou chemikáliou bez akejkoľvek korekcie v prípade priamej redukcie MTT a/alebo farebnej interferencie, nachádzajú v rámci rozsahu linearity spektrofotometra alebo keď nekorigovaný percentný podiel životaschopnosti získaný s testovanou chemikáliou už danú chemikáliu definoval ako žieravú (pozri odseky 35 a 36). K výsledkom v prípade testovaných chemikálií produkujúcich % NSMTT a/alebo % NSC_{liVing} > 50 % negatívnej kontroly by sa však malo pristupovať opatrne.

30. V prípade zafarbených testovaných chemikálií, ktoré nie sú kompatibilné s meraním absorbancie štandardu (OD) z dôvodu príliš silnej interferencie so skúškou MTT, sa môže ako alternatíva na meranie formazánu MTT použiť spektrofotometria HPLC/UPLC (pozri odseky 31 a 37). Systém spektrofotometrie HPLC/UPLC umožňuje oddelenie formazánu MTT od testovanej chemikálie pred jej kvantifikáciou (38). Z tohto dôvodu sa kontroly NSC_{liVing} alebo NSC_{killed} pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nikdy nevyžadujú, nezávisle od chemikálie, ktorá sa testuje. Kontroly NSMTT by sa však predsa len mali použiť, ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT alebo má farbu, ktorá bráni v hodnotení kapacity priamo redukovať MTT (ako sa opisuje v odseku 26). Pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na meranie formazánu MTT sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným zo súbežnej negatívnej kontroly.// V prípade testovaných chemikálií, ktoré majú schopnosť priamo redukovať MTT, sa skutočná životaschopnosť tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých

tkanív vystavených testovanej chemikálii mínus % NSMTT. Takisto je potrebné poznamenať, že chemikálie, ktoré priamo redukujú MTT, ktoré by takisto mohli farebne interferovať a ktoré po ošetrení zostávajú v tkanivách a redukujú MTT tak silno, že to má za následok optické hustoty (pri použití štandardného merania OD) alebo plochy píku (pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC) testovaných tkanivových extraktov, ktoré presahujú rozsah linearity spektrofotometra, takže ich nemožno hodnotiť, hoci tieto javy sa vyskytujú iba veľmi zriedkavo.

31. Spektrofotometria HPLC/UPLC sa môže takisto používať so všetkými druhmi testovaných chemikálií (zafarbené, nezafarbené, chemikálie redukujúce MTT a chemikálie neredukujúce MTT) na meranie formazánu MTT (38). Z dôvodu rozmanitosti systémov spektrofotometrie HPLC/UPLC by sa mala kvalifikácia systému spektrofotometrie HPLC/UPLC preukázať pred jeho použitím na kvantifikáciu formazánu MTT z tkanivových extraktov prostredníctvom splnenia kritérií prijateľnosti v prípade série štandardných kvalifikačných parametrov na základe odvetvového usmernenia Amerického úradu pre potraviny a lieky (*U.S. Food and Drug Administration*) týkajúceho sa validácie bioanalytickej metódy (38)(39). Tieto kľúčové parametre a ich kritériá prijateľnosti sú uvedené v dodatku 4. Po splnení kritérií prijateľnosti vymedzených v dodatku 4 sa systém spektrofotometrie HPLC/UPLC považuje za kvalifikovaný a pripravený na meranie formazánu MTT za experimentálnych podmienok opísaných v tejto testovanej metóde.

Kritériá prijateľnosti

32. Pri každej testovacej metóde, pri ktorej sa používajú validované modely RhE, by tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou mali vykazovať hodnoty optickej hustoty, ktoré odrážajú kvalitu tkanív podľa opisu v tabuľke 2, a nemali by sa nachádzať nižšie než historicky stanovené hranice. Tkanivá ošetrené pozitívnou kontrolou, t. j. ľadovou kyselinou octovou alebo 8N KOH, by mali odrážať schopnosť tkanív reagovať na žieravú chemikáliu za podmienok testovacieho modelu (pozri dodatok 2). Variabilita medzi tkanivovými replikátmi testovanej chemikálie a/alebo kontrolných chemikálií by mala spadať do prijateľných limitov pre každú platnú požiadavku modelu RhE (pozri dodatok 2) (napr. rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva by nemal presiahnuť 30 %). Ak sa buď negatívna kontrola alebo pozitívna kontrola, ktoré sú zahrnuté v testovacom cykle, vymykajú z akceptovaných rozmedzí, testovací cyklus sa nepovažuje za kvalifikovaný a mal by sa zopakovať. Ak je variabilita testovaných chemikálií mimo definovaného rozsahu, jej testovanie by sa malo zopakovať.

Interpretácia výsledkov a prognostický model

33. Hodnoty OD získané pre každú testovanú chemikáliu by sa mali použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti vzhľadom na výsledok negatívnej kontroly, ktorý je stanovený na úroveň 100 %. V prípade použitia spektrofotometrie HPLC/UPLC sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným na základe súbežnej negatívnej kontroly. Referenčné prahové hodnoty percentuálneho podielu životaschopnosti buniek, ktoré umožňujú rozlišovanie žieravých a nežieravých testovaných chemikálií (alebo rozlišovanie medzi rôznymi podkategóriami žieravín), sú vymedzené ďalej v odsekoch 35 a 36 pre každý z testovacích modelov, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda, a mali by sa použiť na interpretáciu výsledkov.

34. V prípade testovanej chemikálie s jednoznačnou výslednou klasifikáciou by mal postačovať jeden testovací cyklus, ktorý zahŕňa použitie aspoň dvoch replikátov tkaniva. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replikátov, sa môže zvážiť vykonanie druhého testovacieho cyklu, ako aj tretieho testovacieho cyklu, ak sa výsledky z prvých dvoch cyklov nezhodujú.

35. Prognostický model testovacieho modelu poleptania kože EpiSkin™ (9)(34)(22), spojený s klasifikačným systémom UN GHS/CLP, je uvedený v tabuľke 4:

Tabuľka 4

Prognostický model EpiSkin™

Životaschopnosť meraná v časových bodoch expozície (t = 3, 60 a 240 minút)	Prognóza na zváženie
< 35 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	**Žieravina:** •Nepovinná podkategória 1A (*)
≥ 35 % po expozícii trvajúcej 3 minúty **A** < 35 % po expozícii trvajúcej 60 minút **ALEBO** ≥ 35 % po expozícii trvajúcej 60 minút **A** < 35 % po expozícii trvajúcej 240 minút	**Žieravina:** •Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C
≥ 35 % po expozícii trvajúcej 240 minút	**Nežieravá chemikália**

(*) Podľa údajov vygenerovaných vzhľadom na posúdenie užitočnosti testovacích modelov RhE na podporu zaraďovania do podkategórií sa preukázalo, že približne 22 % výsledkov testovacieho modelu EpiSkin™ v rámci podkategórie 1A môže skutočne predstavovať látky/zmesi podkategórie 1B alebo podkategórie 1C (t. j. prípady zaradenia do vyššej kategórie) (pozri dodatok 3).

36. Prognostické modely na testovacie modely poleptania kože EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36) a epiCS® (16)(23)(37), spojené s klasifikačným systémom GHS OSN/CLP, sú uvedené v tabuľke 5:

Tabuľka 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®

Životaschopnosť meraná po časových bodoch expozície (t = 3 minúty a 60 minút)	Prognóza na zváženie
KROK 1 v prípade EpiDerm™ SCT, v prípade SkinEthic™ RHE a epiCS®	
< 50 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	**Žieravina**
≥ 50 % po expozícii trvajúcej 3 minúty **A** < 15 % po expozícii trvajúcej 60 minút	**Žieravina**
≥ 50 % po expozícii trvajúcej 3 minúty **A** ≥ 15 % po expozícii trvajúcej 60 minút	**Nežieravá chemikália**
KROK 2 v prípade EpiDerm™ SCT – v prípade látok/zmesí, ktoré sa v kroku 1 identifikujú ako žieraviny	
< 25 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Nepovinná podkategória 1A*

Životaschopnosť meraná po časových bodoch expozície (t = 3 minúty a 60 minút)	Prognóza na zváženie
KROK 1 v prípade EpiDerm™ SCT, v prípade SkinEthic™ RHE a epiCS®	
≥ 25 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C
KROK 2 v prípade SkinEthic™ RHE – v prípade látok/zmesí, ktoré sa v kroku 1 identifikujú ako žieraviny	
< 18 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Nepovinná podkategória 1A*
≥ 18 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C
KROK 2 v prípade epiCS® – v prípade látok/zmesí, ktoré sa v kroku 1 identifikujú ako žieraviny	
< 15 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Nepovinná podkategória 1A*
≥ 15 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

37. Pri každom teste by sa mali do tabuľky zaznamenať údaje z jednotlivých replikátov tkaniva (napr. hodnoty optickej hustoty a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie), a to podľa vhodnosti aj vrátane údajov o opakovaných pokusoch. Okrem toho by sa pri každom teste mali oznámiť stredné hodnoty a rozpätia životaschopnosti a variačných koeficientov (CV) medzi replikátmi tkaniva. Pri každej testovanej chemikálii by sa mali oznámiť pozorované interakcie s reakčným činidlom MTT prostredníctvom priamych reduktantov MTT alebo zafarbených testovaných chemikálií.

Správa o teste

38. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované chemikálie a kontrolné chemikálie:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to vhodné a prakticky uskutočniteľné atď.,

— viaczložková látka, UVCB a zmes: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak je známy,

— podmienky skladovania.

Použitý model RhE a protokol a jeho odôvodnenie (ak je to uplatniteľné)

Podmienky testovania:

— použitý model RhE (vrátane čísla šarže),

— údaje o kalibrácii zariadenia na meranie (napr. spektrofotometer), vlnová dĺžka a pásmový filter (ak je to uplatniteľné) použitý na kvantifikáciu formazánu MTT, a rozsah linearity zariadenia na meranie,

— opis metódy použitej na kvantifikáciu formazánu MTT,

— opis kvalifikácie systému spektrofotometrie HPLC/UPLC, ak je to uplatniteľné,

— úplné podporné údaje o konkrétnom použitom modeli RhE vrátane jeho výkonnosti. K nim by mali patriť okrem iného:

i) životaschopnosť,

ii) bariérová funkcia,

iii) morfológia,

iv) reprodukovateľnosť a prediktívna schopnosť,

v) kontroly kvality modelu (QC),

— odkaz na historické údaje o modeli. K nim by mala okrem iného patriť prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach,

— preukázanie spôsobilosti vykonávať testovaciu metódu pred bežným použitím prostredníctvom testovania chemikálií na preukázanie spôsobilosti.

Testovací postup:

— podrobné údaje o použitom testovacom postupe (vrátane postupov umývania použitých po expozičnom období);

— dávky použitej testovanej chemikálie a použitých kontrolných chemikálií,

— trvanie expozičného(-ých) času(-ov) a teplota(-y) expozície,

— indikácia kontrol použitých v prípade priamych reduktantov MTT a/alebo sfarbených testovaných chemikálií, ak je to uplatniteľné,

— počet replikátov tkaniva použitých pri každej testovanej chemikálii a kontrolách (PC, negatívna kontrola, NSMTT, NSCliving a NSCkilled, ak je to uplatniteľné), na každý čas expozície,

— opis rozhodovacích kritérií/prognostického modelu, ktoré sa uplatňujú vzhľadom na použitý model RhE,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu (vrátane postupov umývania).

Testovací cyklus a kritériá prijateľnosti testu

— pozitívnu a negatívnu kontrolu predstavujú stredné hodnoty a rozsahy prijateľnosti založené na historických údajoch,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade pozitívnych a negatívnych kontrol,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade testovanej chemikálie.

Výsledky:

— tabuľkový zápis údajov týkajúcich sa jednotlivých testovaných chemikálií a kontrol pri každom expozičnom čase, každom testovacom cykle a každom meraní replikátu, a to vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva, stredného percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva, rozdielov medzi replikátmi, SD a/alebo CV, ak je to uplatniteľné,

— ak je to uplatniteľné, výsledky kontrol použitých v prípade chemikálií priamo redukujúcich MTT a/alebo zafarbených testovaných chemikálií, a to vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, % NSMTT, % NSCliving, % NSCkilled, rozdielov medzi replikátmi tkaniva, SD a/alebo CV (ak je to uplatniteľné), a konečný správny percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva,

— výsledky získané s testovanou(-ými) chemikáliou(-ami) a kontrolnými chemikáliami vo vzťahu k definovanému testovaciemu cyklu a kritériám prijateľnosti testu,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia v súvislosti s prognostickým modelom/rozhodovacími kritériami, ktoré sa používajú.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

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

(2) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie, poleptanie kože.

(3) Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 tejto prílohy, Metóda na testovanie s využitím membránovej bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 tejto prílohy, Podráždenie kože *in vitro*: Test na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy a akceptovaných referenčných hodnôt. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jedno z rozhodujúcich hľadísk. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (25).

Životaschopnosť buniek: Parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie, ako je napríklad schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá)], ktorý v závislosti od posledného meraného koncového bodu a od použitého plánu testovania zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Chemikália: látka alebo zmes.

Zhoda: Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy pri testovacích metódach, ktoré poskytujú jednoznačný výsledok, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a vymedzuje sa ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo vysokej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch testovaných chemikálií, ktoré sa skúmajú (25).

ET_{50}: Môže sa odhadnúť stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % pri použití referenčnej chemikálie v určenej pevne stanovenej koncentrácii (pozri takisto IC_{50}).

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálneho, zdravotného a environmentálneho nebezpečenstva a označovanie pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné výrazy, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o ich nežiaducich účinkoch v záujme ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia (1).

HPLC: vysoko účinná kvapalinová chromatografia.

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

IC_{50}: Môže sa odhadnúť stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase (pozri takisto ET_{50}).

Nekonečná dávka: Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na pokožku, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu pokožky.

Zmes: zmes alebo roztok, ktoré sú zložené z dvoch alebo viacerých látok, ktoré spolu nereagujú.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid; tiazolylová modrá tetrazólium-bromid.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii > 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo ku chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NC: nežieravá.

Kontrola NSC_{kille}d: nešpecifická farebná kontrola v usmrtených tkanivách.

Kontrola NSC_{living}: nešpecifická farebná kontrola v živých tkanivách.

NSMTT: nešpecifická redukcia MTT.

OD: optická hustota.

PC: pozitívna kontrola, replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému, ktorý je ošetrený chemikáliou so známou schopnosťou vyvolať pozitívnu odozvu. Aby sa zabezpečila možnosť hodnotenia variability odozvy pozitívnej kontroly v priebehu času, rozsah pozitívnej odozvy by nemal byť nadmerný.

Výkonnostné normy (Performance standards – PS): normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy; a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (25).

Relevantnosť: opis vzťahu testovacej metódy k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej testovacia metóda správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (25).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda v priebehu času reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, ak sa pri nej používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (25).

Testovací cyklus: Testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovacích chemikálií, ktoré sa testujú súbežne s negatívnou kontrolou a s PC.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, pričom ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (25).

Poleptanie kože *in vivo*: vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez pokožku až do kože po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch zmena farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (25).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie stability látky a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ale s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo bez zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

UPLC: ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Dodatok 2

HLAVNÉ ZLOŽKY TESTOVACÍCH MODELOV RHE, KTORÉ SÚ VALIDOVANÉ NA TESTOVANIE POLEPTANIA KOŽE

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Povrch modelu	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Počet replikátov tkaniva	Prinajmenšom 2 na expozičný čas	2 – 3 na expozičný čas	Prinajmenšom 2 na expozičný čas	Prinajmenšom 2 na expozičný čas
Dávky a aplikácia pri ošetrení	Kvapaliny a viskózne: 50 µl ±3 µl (131,6 µl/cm^2) Tuhé: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ±5µl NaCl solution (9 g/l) Voskovité/lepivé: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) s nylonovým sitkom	Kvapaliny: 50 µl (79,4 µl/cm^2) s nylonovým sitkom alebo bez neho *Kompatibilita testovanej chemikálie s nylonovým sitkom pred testom* Polotuhé: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Tuhé: 25 µl H_2O (alebo viac, ak je to potrebné) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vosky: plochá diskovitá platnička s priemerom cca 8 mm umiestnená na povrch tkaniva zvlhčeného15 µl H_2O.	Kvapaliny a viskózne: 40 µl ±3µl (80 µl/cm^2) s použitím s nylonového sitka *Kompatibilita testovanej chemikálie s nylonovým sitkom pred testom* Tuhé: 20 µl ±2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Voskovité/lepivé: 20 ±3 mg (40 mg/cm^2) s použitím s nylonového sitka	Kvapaliny: 50 µl (83,3 µl/cm^2) s použitím s nylonového sitka *Kompatibilita testovanej chemikálie s nylonovým sitkom pred testom* Polotuhé: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Tuhé: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (alebo viac, ak je to potrebné) Voskovité: ploché teliesko podobné sušienke s priemerom cca 8 mm umiestnené na povrchu tkaniva, ktoré bolo zvlhčené 15 µl H_2O

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Predbežná kontrola v prípade priamej redukcie MTT	50 µl (kvapalina) alebo 20 mg (tuhá) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml roztoku na 180 ± 5 min. pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené vodou	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku na 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením	40 µl (kvapalina) alebo 20 mg (tuhá) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku na 180± 15 min. pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku na 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením
Predbežná kontrola v prípade farebnej interferencie	10 µl (kvapalina) alebo 10 mg (tuhá látka) + 90 µl H_2O sa miešajú počas 15 min. pri teplote miestnosti → ak sa roztok sfarbí, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 300 µl H_2O počas 60 min. pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly	40 µl (kvapalina) alebo 20 mg (tuhá forma) + 300 µl H_2O miešané 60 min. pri izbovej teplote (RT) → ak je testovacia chemikália farebná, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 300 µl H_2O počas 60 min. pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly
Expozícia čas a teplota	3 min., 60 min. (± 5 min.) a 240 min. (± 10 min.) vo vetranej skrini izbová teplota (RT, 18 – 28°C)	3 min. pri RT a 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. pri RT a 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. pri RT a 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Oplachovanie	25 ml 1x PBS (2 ml/ponorenie)	20 krát stálym jemným prúdom 1x PBS	20 krát stálym jemným prúdom 1x PBS	20 krát stálym jemným prúdom 1x PBS

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negatívna kontrola	50 µl roztoku NaCl (9 g/l) testuje sa pri každom expozičnom čase	50 µl H_2O testuje sa pri každom expozičnom čase	40 µl H_2O testuje sa pri každom expozičnom čase	50 µl H_2O testuje sa pri každom expozičnom čase
Pozitívna kontrola	50 µl ľadovej kyseliny octovej testuje sa iba 4 hodiny	50 µl 8N KOH testuje sa pri každom expozičnom čase	40 µl 8N KOH testuje sa iba 1 hodinu	50 µl 8N KOH testuje sa pri každom expozičnom čase
Roztok MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Inkubácia MTT čas a teplota	180 min. (± 15 min.) pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. (±15 min.) pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Extrakčné rozpúšťadlo	500 µl acidifikovaného izopropanolu (0,04 N HCl v izopropanole) (úplne ponorené izolované tkanivo)	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)	1,5 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)
Čas a teplota pri extrakcii	Cez noc pri RT, chránené pred svetlom	Cez noc bez trepania pri RT alebo počas 120 min. s trepaním (~120 rpm) pri RT	Cez noc bez trepania pri RT alebo počas 120 min. s trepaním (~120 rpm) pri RT	Cez noc bez trepania pri RT alebo počas 120 min. s trepaním (~120 rpm) pri RT

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Merané hodnoty OD	570 nm (545 – 595 nm) bez referenčného filtra	570 nm (alebo 540 nm) bez referenčného filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez referenčného filtra	540 – 570 nm bez referenčného filtra
Kontrola kvality tkaniva	18-hodinové ošetrenie SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	ošetrenie 1 % Triton X-100 4,08 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 8,7 hodiny	ošetrenie 1 % Triton X-100 4,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 10,0 hodiny	ošetrenie 1 % Triton X-100 2,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 7,0 hodiny
Kritériá prijateľnosti	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou by mala byť ≥ 0,6 a ≤ 1,5 pri každom čase expozície 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 4 hodiny s pozitívnou kontrolou (ľadová kyselina octová), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť ≤ 20 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti a v prípade hodnôt OD ≥ 0,3 by rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva nemal presiahnuť 30 %).	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou (H_2O) by mala byť ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pri každom expozičnom čase 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 1 hodinu s pozitívnou kontrolou (8N KOH), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť < 15 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti by variačný koeficient (CV) medzi replikátmi tkaniva mal byť ≤ 30 %	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou (H_2O) by mala byť ≥ 0,8 a ≤ 3,0 pri každom expozičnom čase 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 1 hodinu (a 4 hodiny, ak je to uplatniteľné) s pozitívnou kontrolou (8N KOH), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť < 15 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti a v prípade hodnôt OD ≥ 0,3 by rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva nemal presiahnuť 30 %).	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou (H_2O) by mala byť ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pri každom expozičnom čase 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 1 hodinu s pozitívnou kontrolou (8N KOH), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť < 20 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti a v prípade hodnôt OD ≥ 0,3 by rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva nemal presiahnuť 30 %).

Dodatok 3

VÝKONNOSŤ TESTOVACÍCH MODELOV NA ÚČELY ZARAĎOVANIA DO PODKATEGÓRIÍ

V ďalej uvedenej tabuľke sa uvádza výkonnosť štyroch testovacích modelov vypočítaná na základe súboru 80 chemikálií testovaných štyrmi autormi testov. Výpočty vykonal sekretariát OECD a podskupina odborníkov ich preskúmala a odsúhlasila (21) (23).

Na základe modelov testovania EpiSkin™, EpiDerm™ , SkinEthic™ a epiCS® je možné ďalej kategorizovať (t. j. 1A verzus 1B a 1C verzus NC).

Výkonnosť, miera zaraďovania do vyšších kategórií, miera zaraďovania do nižších kategórií a presnosť (prediktívna schopnosť) štyroch testovacích modelov na základe súboru 80 chemikálií, z ktorých sa všetky testujú v 2 alebo 3 testovacích cykloch pri každom testovacom modeli:

ŠTATISTICKÉ ÚDAJE TÝKAJÚCE SA PROGNÓZ, KTORÉ SA ZÍSKALI V SÚVISLOSTI S CELÝM SÚBOROM CHEMIKÁLIÍ

[n = 80 chemikálií testovaných v 2 nezávislých testovacích cykloch v prípade epiCS® (159 (*) klasifikácií) alebo v 3 nezávislých testovacích cykloch v prípade EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ a SkinEthic™ RHE (240 klasifikácií)].

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Prípady zaradenia do vyšších kategórií:				
1B a 1C zaradené do vyššej kategórie 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC zaradená do vyššej kategórie 1B a 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC zaradená do vyššej kategórie 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
zaradená do vyššej kategórie žieravín	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Celková miera zaradenia do vyšších kategórií (všetky kategórie)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Prípady zaradenia do nižších kategórií:				
1A zaradená do nižšej kategórie 1B a 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A zaradená do nižšej kategórie NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B a 1C zaradená do nižšej kategórie NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Celková miera zaradenia do nižších kategórií (všetky kategórie)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Správne klasifikácie:				
1A klasifikovaná správne	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B a/1C klasifikovaná správne	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC klasifikovaná správne	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Celková presnosť	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Nežieravá chemikália

(*) jedna chemikália bola v prípade epiCS® testovaná len raz z dôvodu nedostupnosti (23)

Dodatok 4

Kľúčové parametre a kritériá prijateľnosti na kvalifikáciu systému spektrofotometrie HPLC/UPLC na meranie formazánu MTT extrahovaného z tkaniva RhE

Parameter	Protokol vyvodený z usmernenia FDA (37) (38)	Akceptačné kritériá
Selektívnosť	analýza izopropanolu, living blank = životnosť neovplyvnených RhE tkanív (izopropanolový extrakt zo živých tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia), dead blank = životnosť mŕtvych neovplyvnených RhE tkanív (izopropanolový extrakt z usmrtených tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia)	Plocha interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % plochy LLOQ ($Area_{LLOQ}$) ([1])
Exaktnosť	kontroly kvality (t. j. formazán MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v izopropanole (n = 5)	CV ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Presnosť	kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	% Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Matricový efekt	kontroly kvality v living blank (n = 5)	85 % ≤ matricový efekt % ≤ 115 %
Prenos	analýza izopropanolu po štandarde ULOQ ([2])	$Plocha_{interferencia}$ ≤ 20 % $plochy_{LLOQ}$
Reprodukovateľnosť (počas dňa)	3 nezávislé kalibračné krivky (založené na 6 za sebou nasledujúcich 1/3 zriedeniach formazánu MTT v izopropanole so začiatkom na ULOQ, t. j. 200 µg/ml); kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	kalibračné krivky: % Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ kontroly kvality: % Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovateľnosť (medzidňová)	Deň 1: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 2: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 3: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazánu MTT v tkanivovom extrakte RhE	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzované v deň prípravy a po 24 hodinách skladovania pri izbovej teplote	% Dev ≤ 15 %
Dlhodobá stabilita formazánu MTT v tkanivovom extrakte RhE, ak sa vyžaduje	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzované v deň prípravy a po niekoľkých dňoch skladovania pri stanovenej teplote (napr. 4 °C, – 20 °C, – 80 °C)	% Dev ≤ 15 %“

([1]) LLOQ: dolný kvantifikačný limit, vymedzený na pokrytie 1 – 2 % životaschopnosti tkaniva, t. j. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: horný kvantifikačný limit, vymedzený tak, aby bol prinajmenšom dvakrát vyšší ako najvyššia očakávaná koncentrácia formazánu MTT v izopropanolových extraktoch z negatívnych kontrol, t. j. 200 µg/ml.

7. V časti B sa kapitola B.46 nahrádza takto:

„B.46 **PODRÁŽDENIE KOŽE *IN VITRO*: TEST NA MODELI REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 439 (2015). Podráždenie kože je vznik vratného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie v trvaní do 4 hodín [v znení definície podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadenia Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1])]. Touto testovacou metódou sa zabezpečuje postup *in vitro*, ktorý možno použiť na identifikáciu nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látok a zmesí) v súlade s kategóriou 2 GHS OSN a CLP (2). V regiónoch, ktoré neprijali nepovinnú kategóriu 3 GHS OSN (látky spôsobujúce mierne podráždenie), túto testovaciu metódu možno použiť aj na identifikáciu chemikálií, ktoré nie sú klasifikované. Táto testovacia metóda sa preto smie v závislosti od regulačného rámca a používaného klasifikačného systému použiť na určenie podráždenia kože chemikáliami buď ako nezávislý test, ktorý slúži ako náhrada za testy podráždenia kože *in vivo*, alebo ako čiastočný náhradný test v rámci stratégie testovania (3).

2. Posudzovanie podráždenia kože zvyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat [TM B.4, rovnocenná s OECD TG 404, pôvodne prijatá v roku 1981 a revidovaná v rokoch 1992, 2002 a 2015] (4). Na testovanie žieravosti sa prijali tri validované testovacie metódy *in vitro* – ako EÚ TM B.40 (rovnocenná s OECD TG 430), TM B.40a (rovnocenná s OECD TG 431) a TM B.65 (rovnocenná s OECD TG 435) (5) (6) (7). V usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade poleptania a podráždenia kože sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, a poskytuje sa usmernenie o tom, i) ako integrovať a využívať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie žieravých a dráždivých vlastností chemikálií pre kožu, a ii) navrhuje sa v ňom prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (3).

3. Táto testovacia metóda sa týka podráždenia kože ako sledovaného parametra ľudského zdravia. Je založená na systéme *in vitro* testovania rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE), ktorý dôkladne napodobňuje biochemické a fyziologické vlastnosti vrchnej časti ľudskej kože, t. j. pokožky. Systém testovania RhE používa netransformované ľudské keratinocyty získané z ľudskej pokožky ako bunkový zdroj na rekonštrukciu modelu pokožky s reprezentatívnou histológiou a cytoarchitektúrou. Výkonnostné normy (PS) sú k dispozícii na umožnenie validácie a posudzovania podobných a upravených testovacích metód založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE) v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (8) (9). Príslušné usmernenie na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2010, pričom v roku 2013 sa aktualizovalo s cieľom začleniť dodatočné modely RhE, a v roku 2015 sa aktualizovalo s cieľom odkázať na usmerňovací dokument IATA a zaviesť používanie alternatívneho postupu na meranie životaschopnosti.

4. V prípade štyroch komerčne dostupných modelov testovania *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), ktoré sú založené na systéme testovania RhE, sa ukončili predvalidačné, optimalizačné a validačné štúdie (citlivosť 80 %, špecifickosť 70 %, a presnosť 75 %). Tieto štyri modely sú zahrnuté v tejto TM a sú uvedené v dodatku 2, kde sa uvádzajú aj informácie o type validačnej štúdie použitej na validovanie príslušných testovacích metód. Ako sa uvádza v dodatku 2, na vývoj súčasnej testovacej metódy a výkonnostných noriem (8) sa použila validovaná referenčná metóda (VRM).

5. Vzájomné uznávanie údajov podľa dohody OECD bude možné zaručiť len v prípade modelov testovania validovaných podľa výkonnostných noriem (8), ak tieto modely testovania preskúmala a prijala organizácia OECD. Modely testovania zaradené do tejto testovacej metódy a do príslušného TG OECD možno bez rozlišovania využívať na riešenie požiadaviek krajín, ktoré sa týkajú výsledkov testov v súvislosti s metódami testovania podráždenia kože *in vitro*, a to pri súčasnom využívaní prínosov plynúcich zo vzájomného uznávania údajov.

6. Vymedzenie pojmov použitých v tomto dokumente sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

7. Ako sa preukazuje v úplnej výhľadovej validačnej štúdii posudzujúcej a opisujúcej testovacie metódy RhE (16), obmedzením danej testovacej metódy je, že neumožňuje klasifikáciu chemikálií do nepovinnej kategórie 3 (látky spôsobujúce mierne podráždenie) v zmysle GHS OSN (1). Preto sa o spôsobe používania tejto testovacej metódy rozhodne prostredníctvom regulačného rámca v členských krajinách. V prípade EÚ sa v CLP nezohľadnila kategória 3. Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii kože by sa mal použiť usmerňovací dokument OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (3). Je známe, že použitie ľudskej kože podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zásadám a podmienkam.

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008).

8. Táto testovacia metóda sa týka podráždenia kože ako sledovaného parametra ľudského zdravia. Hoci táto testovacia metóda neposkytuje dostatok informácií o poleptaní kože, treba poznamenať, že TM B.40a (ekvivalentná s OECD TG 431) týkajúca sa poleptania kože je založená na tom istom systéme testovania na modeli RhE, aj keď sa pri nej používa iný protokol (6). Táto testovacia metóda je založená na modeloch RhE a využívajú sa pri nej ľudské keratinocyty, ktoré preto predstavujú *in vitro* cieľový orgán druhu, ktorý je predmetom záujmu. Okrem toho sa priamo vzťahuje na počiatočný krok zápalovej kaskády/akčného mechanizmu (poškodenie buniek a tkanív vedúce k lokálnej traume), ku ktorým dochádza počas podráždenia *in vivo*. V rámci validácie, ktoré je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií, a databáza validačnej štúdie obsahuje celkovo 58 chemikálií (16) (18) (23). Táto testovacia metóda je uplatniteľná pre tuhé látky, kvapaliny, polotuhé látky a vosky. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Tuhé materiály by sa mali podľa možnosti pred aplikáciou zomlieť na jemný prášok; žiadne iné predchádzajúce ošetrenie vzorky sa nevyžaduje. Plyny a aerosóly ešte neboli vo validačnej štúdii posúdené (29). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať použitím technológie RhE, aktuálna testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

9. Pred použitím danej testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na daný účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie danej zmesi. Vzhľadom na skutočnosť, že zmesi zahŕňajú široké spektrum kategórií a zloženia, a na skutočnosť, že v súčasnosti sú dostupné iba obmedzené informácie o testovaní zmesí, by sa však v prípadoch, keď možno preukázať nepoužiteľnosť testovacej metódy pri špecifickej kategórii zmesí (napr. na základe stratégie navrhovanej Eskesom *et al.*, 2012) (30), daná testovacia metóda nemala používať pri uvedenej špecifickej kategórii zmesí. Podobne opatrne by sa malo postupovať v prípade, ak sa zistí, že špecifické chemické triedy alebo fyzikálno-chemické vlastnosti nie sú uplatniteľné na aktuálnu testovaciu metódu.

10. Testované chemikálie absorbujúce svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT a testované chemikálie so schopnosťou priamo redukovať vitálne farbivo MTT (na formazán MTT) môžu interferovať s výsledkami merania životaschopnosti buniek a môžu si vyžadovať použitie prispôsobených kontrol korekcie (pozri odseky 28 – 34).

11. Jeden testovací cyklus, ktorý sa skladá z troch replikátov tkaniva, by mal pri testovanej chemikálii postačovať, ak je jej klasifikácia jednoznačná. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replikátov/alebo ak sa stredný percentuálny podiel životaschopnosti rovná 50 ±5 %, je však potrebné zvážiť vykonanie druhého testovacieho cyklu, ako aj tretieho testovacieho cyklu, ak sa výsledky z prvých dvoch testovacích cyklov nezhodujú.

PRINCÍP TESTU

12. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model RhE pozostávajúci z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky, ktoré sa vykultivovali tak, aby vytvorili viacvrstvový, vysoko diferencovaný model ľudskej pokožky. Pozostáva z organizovanej bazálnej vrstvy, vrstvy ostnitých buniek a vrstvy zrnitých buniek a viacvrstvovej rohovitej vrstvy (*stratum corneum*) obsahujúcej medzibunkové lipidové lamelové vrstvy predstavujúce hlavné triedy lipidov, ktoré sú analogické vrstvám nachádzajúcim sa *in vivo*.

13. Podráždenie kože vyvolané chemikáliou, ktoré sa prejavuje hlavne erytémom a edémom, je výsledkom kaskády udalostí, ktoré sa začínajú prienikom chemikálií do *stratum corneum*, kde môžu poškodiť hlbšie ležiace vrstvy keratinocytov a ďalších kožných buniek. Poškodené bunky môžu buď uvoľniť zápalové mediátory alebo spustiť zápalovú kaskádu, ktorá takisto pôsobí na bunky v koži, najmä na stromálne a endotelové bunky a krvné cievy. Dilatácia a zvýšená permeabilita endotelových buniek spôsobuje príznaky erytému a edému (29). Ak sa v systéme testovania *in vitro* nevyskytne žiadna vaskularizácia, metódami testovania na základe RhE sa predovšetkým meria spustenie javov v ich postupnosti, napr. poškodenie buniek/tkaniva (16) (17), pričom sa ako výstup použije životaschopnosť buniek.

14. Životaschopnosť buniek sa meria enzymatickou premenou vitálneho farbiva MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid, tiazolylová modrá; CAS číslo 298-93-1] na modrú formazánovú soľ, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (31). Dráždivé chemikálie sa identifikujú na základe ich schopnosti spôsobiť pokles životaschopnosti buniek pod vymedzené prahové úrovne (t. j. ≤ 50 % pre kategóriu 2 GHS OSN/CLP). V závislosti od regulačného rámca a uplatniteľnosti testovacej metódy sa môžu testované chemikálie, ktoré spôsobujú zvýšenie životaschopnosti buniek nad vymedzenú prahovú úroveň, považovať za nedráždivé látky (t. j. > 50 %, bez kategórie).

PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI

15. Pred bežným použitím ktoréhokoľvek zo štyroch validovaných testovacích modelov, ktoré zodpovedajú požiadavkám tejto testovacej metódy (dodatok 2), by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť na základe použitia desiatich chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 1. V prípadoch, keď napríklad uvedená látka nie je k dispozícii, možno použiť inú látku, pri ktorej sú k dispozícii primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napríklad zo zoznamu referenčných chemikálií (8)], za predpokladu, že sa uplatnia rovnaké kritériá výberu, ktoré sú opísané v tabuľke 1. Použitie alternatívnej látky na preukázanie spôsobilosti by malo byť odôvodnené.

16. Ako súčasť testovania spôsobilosti sa odporúča, aby používatelia overili bariérové vlastnosti tkanív po ich prijatí, ako to stanovuje tvorca modelu RhE. To je osobitne dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhých časových období. Po úspešnom stanovení testovacej metódy a po získaní a preukázaní spôsobilosti na jej použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri pravidelnom používaní testovacej metódy sa však odporúča naďalej v pravidelných intervaloch posudzovať bariérové vlastnosti.

Tabuľka 1

Látky na preukázanie spôsobilosti ([1])

Látka	Číslo CAS	*In vivo* hodnota ([2])	Fyzikálny stav	Kategória GHS OSN
NEKLASIFIKOVANÉ LÁTKY (zaradenie bez kategórie podľa GHS OSN)				
kyselina naftalénoctová	86-87-3	0	tuhá	bez kategórie
izopropanol	67-63-0	0,3	kvapalná	bez kategórie
metyl-stearát	112-61-8	1	tuhá	bez kategórie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	kvapalná	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) ([3])
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	kvapalná	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) ([3])
KLASIFIKOVANÉ LÁTKY (kategória GHS OSN č. 2)				
3-p-kumenyl-2-metylpropanál	103-95-7	2,3	kvapalná	kat. 2
1-brómhexán	111-25-1	2,7	kvapalná	kat. 2
hydroxid draselný (5 % roztok)	1310-58-3	3	kvapalná	kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazín	5271-27-2	3,3	tuhá	kat. 2
heptanál	111-71-7	3,4	kvapalná	kat. 2

([1]) Látky na preukázanie spôsobilosti sú podskupinou látok, ktoré sa používajú vo validačnej štúdii, a ich výber je založený na týchto kritériách: i) chemické látky sú komerčne dostupné; ii) zastupujú celý rad výsledkov dráždivosti Draizovho testu (od nedráždivých až po silne dráždivé); iii) majú dobre definovanú chemickú štruktúru; iv) sú reprezentatívne z hľadiska chemickej funkčnosti použitej v rámci validačného postupu; v) dosiahli sa nimi reprodukovateľné výsledky *in vitro* v rámci mnohonásobného testovania a v početných laboratóriách; vi) uskutočnila sa ich správna prognóza *in vitro* a vii) nie je s nimi spojený extrémne toxický profil (napr. karcinogénny alebo toxický pre reprodukčný systém) a nie sú s nimi spojené neúmerné náklady na zneškodnenie.

([2]) *In vivo* hodnotenie v súlade s TM B.4 (4).

([3]) V rámci tejto testovacej metódy sa nepovinná kategória 3 v zmysle GHS OSN (látky spôsobujúce mierne podráždenie) (1) považuje za zaradenie „bez kategórie“.

POSTUP

17. Ďalej nasleduje opis zložiek a postupov testovacej metódy RhE na posúdenie podráždenia kože (pozri aj dodatok 3 v súvislosti s parametrami spojenými s každým modelom testovania). K dispozícii sú štandardné operačné postupy (SOP) pre dané štyri modely, ktoré sú v súlade s touto testovacou metódou (32) (33) (34) (35).

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY RHE

Všeobecné podmienky

18. Na rekonštrukciu epitelu by sa mali použiť netransformované ľudské keratinocyty. Pod funkčnou vrstvou *stratum corneum* by sa malo nachádzať viacero vrstiev životaschopných epitelových buniek (bazálna vrstva, *stratum spinosum, stratum granulosum*). Rohovitá vrstva *stratum corneum* by mala byť viacvrstvová a obsahovať potrebný lipidový profil, aby sa vytvorila silná funkčná bariéra, ktorá odolá rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných chemikálií, ku ktorým patrí napríklad dodecylsulfát sodný (SDS) alebo Triton X-100. Mala by sa preukázať bariérová funkcia, ktorá sa môže posudzovať buď stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, alebo stanovením expozičného času, ktorý je potrebný na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET_{50}) po aplikácii referenčnej chemikálie v určenej pevne stanovenej koncentrácii. Izolačné vlastnosti modelu RhE by mali zabrániť prieniku materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva, čo by viedlo k chybnému modelovaniu expozície kože. Model RhE by nemal byť kontaminovaný baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

19. Skúška použitá na kvantifikovanie životaschopnosti je skúška MTT (31). Životaschopné bunky RhE modelu tkaniva môžu redukovať vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT, ktorý sa potom z tkaniva extrahuje pomocou izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla). Optická hustota (OD) samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne nízka, t. j. OD < 0,1. Extrahovaný formazán MTT môže byť kvantifikovaný buď meraním absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (36). Používatelia modelu RhE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre hodnoty optickej hustoty negatívnej kontroly (v podmienkach testovacej metódy kožnej dráždivosti) stanovuje autor/dodávateľ modelu RhE. V tabuľke 2 sú uvedené rozsahy prijateľnosti v prípade štyroch validovaných modelov RhE zahrnutých v tejto testovacej metóde. Používateľ spektrofotometrie HPLC/UPLC by mal pri negatívnej kontrole ako akceptačné kritérium použiť rozsahy optickej hustoty pri negatívnej kontrole stanovené v tabuľke 2. Malo by sa zaznamenať, že tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou sú počas času expozície testu v kultúre stabilné (zabezpečujú podobné výsledky merania životaschopnosti).

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole v prípade testovacích modelov zahrnutých v tejto TM

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
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

Bariérová funkcia

20. Vrstva *stratum corneum* a jej lipidové zloženie by mali byť dostačujúce na zabránenie rýchlemu prieniku cytotoxických referenčných chemikálií (napr. SDS alebo Triton X-100), a to podľa odhadu pomocou IC_{50} alebo ET_{50} (tabuľka 3).

Morfológia

21. Model RhE by sa mal histologicky preskúmať, aby sa preukázalo, že má štruktúru podobnú ľudskej pokožke (vrátane viacvrstvovej *stratum corneum*).

Reprodukovateľnosť

22. Výsledky pozitívnych a negatívnych kontrol danej testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť v priebehu čase.

Kontrola kvality (QC)

23. Model RhE by sa mal používať len v prípade, ak autor/dodávateľ preukáže, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšie kritériá *životaschopnosti* (odsek 19), *bariérovej funkcie* (odsek 20) a *morfológie* (odsek 21). Tieto údaje by sa mali poskytnúť používateľom testovacej metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre IC_{50} alebo ET_{50} by mal stanoviť autor/dodávateľ modelu RhE. Na spoľahlivú prognózu klasifikácie podráždenia sú prijateľné len tie výsledky, ktoré sa získali z kvalifikovaných tkanív. V tabuľke 3 sú uvedené rozsahy prijateľnosti v prípade štyroch modelov zahrnutých v tejto TM.

Tabuľka 3

Kritériá kontroly kvality na uvoľnenie šarží do obehu v prípade testovacích modelov zahrnutých v tejto TM

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM) (18-hodinové ošetrenie 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 hodiny	ET_{50} = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 hodiny	ET_{50} = 10,0 hodiny
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-hodinové ošetrenie SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií

24. V každom testovacom cykle by sa mali použiť aspoň tri replikáty pri každej testovanej chemikálii a kontrolách. V prípade kvapalných aj tuhých chemikálií je potrebné na povrch pokožky rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovanej chemikálie, pričom je nutné vyhýbať sa nekonečnej dávke, t. j. v rozsahu od 26 do 83 µl/cm^2 alebo mg/cm^2 (pozri dodatok 3). V prípade tuhých chemikálií by sa mal pred aplikáciou povrch pokožky zvlhčiť deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby sa tak zlepšil kontakt testovanej chemikálie s povrchom pokožky. Tuhé látky by sa mali podľa možnosti testovať vo forme jemného prášku. V niektorých prípadoch sa ako pomôcka na rozotrenie môže použiť nylonové sitko (pozri dodatok 3). Na konci expozičného času by sa testovaná chemikália mala dôkladne zmyť z povrchu pokožky tlmivým roztokom alebo 0,9 % roztokom NaCl. V závislosti od použitých testovacích modelov RhE sa čas expozície pohybuje v rozmedzí od 15 do 60 minút a inkubačná teplota v rozmedzí od 20 °C do 37 °C. Tieto expozičné časy a teploty sa optimalizujú pre každú jednotlivú testovaciu metódu RhE a vyjadrujú rôzne prirodzené vlastnosti testovacích modelov (napr. bariérová funkcia) (pozri dodatok 3).

25. V každom testovacom cykle by sa mala súbežne použiť negatívna kontrola (NC) a pozitívna kontrola (PC), aby sa preukázalo, že životaschopnosť (s použitím NC), bariérová funkcia a výsledná tkanivová citlivosť tkanív (s použitím PC) sa nachádzajú v rámci stanoveného historického rozsahu prijateľnosti. Navrhovanou chemikáliou na pozitívnu kontrolu je 5 % vodný dodecylsulfát sodný (SDS). Navrhovanými chemikáliami na negatívnu kontrolu je buď voda alebo fosfátom tlmený fyziologický roztok (PBS).

Merania bunkovej životaschopnosti

26. Podľa testovacieho postupu je dôležité, aby sa meranie životaschopnosti nevykonávalo ihneď po expozícii testovanej chemikálii, ale až po dostatočne dlhom inkubačnom čase po ošetrení opláchnutého tkaniva v čerstvom médiu. Tento čas umožňuje regeneráciu po slabých cytotoxických účinkoch, ako aj výskyt jasných cytotoxických účinkov. Počas testu optimalizácie dvoch testovacích modelov založených na RhE, z ktorých vychádza táto testovacia metóda (11) (12) (13) (14) (15), sa ako optimálny ukázal 42-hodinový inkubačný čas po ošetrení.

27. Skúška MTT je štandardizovaná kvantitatívna metóda, ktorá by sa mala používať na meranie životaschopnosti buniek v rámci tejto testovacej metódy. Je vhodná na použitie v trojrozmernom modeli tkaniva. Vzorka tkaniva sa na 3 hodiny vloží do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (napr. 0,3 – 1 mg/ml). MTT sa prostredníctvom životaschopných buniek premení na modrý formazán. Pomocou rozpúšťadla (napr. izopropanol, kyslý izopropanol) sa potom z tkaniva extrahuje vyzrážaný modrý formazánový produkt, pričom koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením optickej hustoty pri 570 nm pomocou filtra pásma priepustnosti (pásmového filtra) s maximálnou odchýlkou ±30 nm alebo spektrofotometricky HPLC/UPLC (pozri odseky 34 a 36).

28. Optické vlastnosti testovanej chemikálie alebo jej chemický účinok na MTT (napr. chemikálie môžu zabraňovať procesu tvorby sfarbenia alebo ho zvrátiť, ale rovnako ho môžu aj spôsobovať) môžu interferovať so skúškou, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti. K tomu môže dôjsť, keď sa špecifická testovaná chemikália úplne neodstráni z tkaniva pri oplachovaní alebo keď prenikne cez pokožku. Ak testovaná chemikália pôsobí priamo na MTT (napr. redukcia MTT), je prirodzene sfarbená alebo sa sfarbí počas ošetrovania tkaniva, mali by sa použiť ďalšie kontroly, aby sa zistilo, či nedochádza k interferencii testovanej chemikálie s technikou merania životaschopnosti, a aby sa táto prípadná interferencia upravila (pozri odseky 29 a 33). Podrobný opis úpravy priamej redukcie MTT a interferencií farebnými činidlami sa nachádza v štandardných pracovných postupoch (SOP) v prípade štyroch validovaných modelov zahrnutých v tejto testovacej metóde (32) (33) (34) (35).

29. Na určenie priamych reduktantov MTT by sa mala každá testovaná chemikália pridať do čerstvo pripraveného roztoku MTT. Ak sa zmes MTT obsahujúca testovanú chemikáliu sfarbí do modra/purpurova, predpokladá sa, že daná testovaná chemikália priamo redukuje MTT, a mala by sa vykonať ďalšia funkčná kontrola neživotaschopných tkanív RhE, a to nezávisle od použitia merania absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometrie HPLC/UPLC. Pri tejto dodatočnej funkčnej kontrole sa využívajú usmrtené tkanivá, ktoré sa vyznačujú len reziduálnou metabolickou aktivitou, ale absorbujú testovanú chemikáliu podobným spôsobom ako životaschopné tkanivá. Každá testovaná chemikália redukujúca MTT sa aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, ktoré sa podrobujú celému postupu testovania s cieľom vygenerovať nešpecifickú redukciu MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Na každú testovanú chemikáliu postačuje jediná kontrola NSMTT, a to bez ohľadu na počet vykonaných nezávislých testov/testovacích cyklov. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených chemikálii redukujúcej MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej redukcie MTT získaný z usmrtených tkanív vystavených tej istej chemikálii redukujúcej MTT, počítané v porovnaní s testovacím cyklom negatívnej kontroly vykonávaným súbežne s upravovaným testom (% NSMTT).

30. S cieľom zistiť potenciálnu interferenciu sfarbenými testovanými chemikáliami alebo testovanými chemikáliami, ktoré sa sfarbili pri kontakte s vodou alebo izopropanolom, a aj s cieľom rozhodnúť o potrebe dodatočných kontrol by sa mala vykonať spektrálna analýza testovanej chemikálie vo vode (prostredie počas expozície) a/alebo v izopropanole (extrakčný roztok). Ak testovaná chemikália vo vode a/alebo izopropanole absorbuje svetlo v rozsahu 570 ±30 nm, mali by sa vykonať ďalšie kontroly s použitím farbiaceho činidla, alebo, ako alternatíva, by sa mal použiť postup spektrofotometrie HPLC/UPLC, a v tom prípade sa tieto kontroly nevyžadujú (pozri odseky 33 a 34). Pri vykonávaní merania absorbancie štandardu (OD) sa každá testovaná zafarbená chemikália, ktorá interferuje, aplikuje najmenej na dva životaschopné replikáty tkaniva, ktoré sa potom podrobia celému postupu testovania, ale počas kroku inkubácie MTT sa inkubujú s médiom namiesto inkubácie s roztokom MTT, a to s cieľom vygenerovať kontrolu nešpecifickej farby (NSC_{living}). Je potrebné, aby sa kontrola NSC_{living} vykonávala súbežne s testovaním zafarbenej testovanej chemikálie, a v prípade mnohonásobného testovania je potrebné vykonať nezávislú kontrolu NSC_{living} pri každom vykonanom teste (v každom testovacom cykle) z dôvodu inherentnej biologickej variability živých tkanív. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív vystavených interferujúcej testovanej chemikálii a inkubovaných s roztokom MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej zo živých tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom(% NSC_{living}).

31. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú identifikované ako chemikálie produkujúce tak priamu redukciu MTT (pozri odsek 29), ako aj farebnú interferenciu (pozri odsek 30), sa bude pri vykonávaní merania absorbancie štandardu (OD) takisto vyžadovať tretí súbor kontrol, a to popri kontrolách NSMTT a NSC_{living}, ktoré sú opísané v predchádzajúcich odsekoch. Býva to tak zvyčajne v prípade tmavo sfarbených testovaných chemikálií, ktoré interferujú so skúškou MTT (napr. modré, purpurové, čierne), pretože ich prirodzená farba bráni hodnoteniu ich kapacity priamo redukovať MTT, ako sa opisuje v odseku 29. Tieto testované chemikálie sa môžu viazať tak na živé, ako aj na usmrtené tkanivá, a preto kontrola NSMTT môže nielen korigovať potenciálnu priamu redukciu

MTT testovanou chemikáliou, ale aj farebnú interferenciu, ktorá vyplýva z väzby testovanej chemikálie na usmrtené tkanivá. To by mohlo viesť k dvojitej korekcii farebnej interferencie, keďže kontrola NSC_{living} už koriguje farebnú interferenciu vyplývajúcu z väzby testovanej chemikálie na živé tkanivá. S cieľom vyhnúť sa dvojitej korekcii pri farebnej interferencii je potrebné vykonať tretiu kontrolu pre nešpecifickú farbu v usmrtených tkanivách (NSC_{killed}). V tejto dodatočnej kontrole sa testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, ktoré sa podrobia celému postupu testovania, ale počas kroku inkubácie MTT sa inkubujú s médiom, a nie s roztokom MTT. Na každú testovanú chemikáliu postačuje jediná kontrola NSC_{killed}, a to bez ohľadu na počet vykonaných nezávislých testov/testovacích cyklov, ale mala by sa vykonať súbežne s kontrolou NSMTT, a ak je to možné, s tou istou šaržou tkaniva. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív, ktoré boli vystavené testovanej chemikálii, mínus % NSMTT mínus % NSC_{living} plus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej z usmrtených tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, počítané vo vzťahu k negatívnej kontrole, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom (% NSC_{killed}).

32. Je dôležité poznamenať, že nešpecifická redukcia MTT a nešpecifické farebné interferencie môžu mať za následok zvýšenie hodnôt tkanivového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometra. Na tomto základe by malo každé laboratórium pred začatím testovania testovanej chemikálie na regulačné účely určiť rozsah linearity svojho spektrofotometra s formazánom MTT (CAS č. 57360-69-7) z komerčného zdroja. Meranie absorbancie štandardu (OD) s použitím spektrofotometra je vhodné na posúdenie chemikálií priamo redukujúcich MTT a farebne interferujúcich testovaných chemikálií, keď sa optické hustoty tkanivových extraktov, získaných s testovanou chemikáliou bez akejkoľvek korekcie v prípade priamej redukcie MTT a/alebo farebnej interferencie, nachádzajú v rámci rozsahu linearity spektrofotometra alebo keď nekorigovaný percentuálny podiel životaschopnosti získaný s testovanou chemikáliou je už ≤ 50 %. K výsledkom v prípade testovaných chemikálií produkujúcich % NSMTT a/alebo % NSC_{living} ≥ 50 % negatívnej kontroly by sa však malo pristupovať opatrne, keďže ide o prah používaný na odlíšenie klasifikovaných chemikálií od neklasifikovaných chemikálií (pozri odsek 36).

33. V prípade zafarbených testovaných chemikálií, ktoré nie sú kompatibilné s meraním absorbancie štandardu (OD) z dôvodu príliš silnej intereferencie so skúškou MTT, sa môže ako alternatíva na meranie formazánu MTT použiť postup spektrofotometrie HPLC/UPLC (pozri odseky 34 a 36). Systém spektrofotometrie HPLC/UPLC umožňuje oddelenie formazánu MTT od testovanej chemikálie pred jej kvantifikáciou (36). Z tohto dôvodu sa kontroly NSC_{living} alebo NSC_{killed} pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nikdy nevyžadujú, nezávisle od chemikálie, ktorá sa testuje. Kontroly NSMTT by sa však predsa len mali použiť, ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT alebo má farbu, ktorá bráni v hodnotení kapacity priamo redukovať MTT (ako sa opisuje v odseku 29). Pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na meranie formazánu MTT sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným na základe súbežnej negatívnej kontroly. V prípade testovaných chemikálií, ktoré majú schopnosť priamo redukovať MTT, sa skutočná životaschopnosť tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii mínus % NSMTT. Takisto je potrebné poznamenať, že chemikálie, ktoré priamo redukujú MTT, ktoré by takisto mohli farebne interferovať a ktoré po ošetrení zostávajú v tkanivách a redukujú MTT tak silno, že to má za následok optické hustoty (pri použití štandardného merania OD) alebo plochy píku (pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC) testovaných tkanivových extraktov, ktoré presahujú rozsah linearity spektrofotometra, takže ich nemožno hodnotiť, hoci tieto javy sa vyskytujú iba veľmi zriedkavo.

34. Spektrofotometria HPLC/UPLC sa môže takisto používať so všetkými typmi testovaných chemikálií (sfarbené, nesfarbené, reduktanty MTT a chemikálie neredukujúce MTT) na meranie formazánu MTT (36). Z dôvodu rozmanitosti systémov spektrofotometrie HPLC/UPLC by sa mala kvalifikácia systému spektrofotometrie HPLC/UPLC preukázať pred jeho použitím na kvantifikáciu formazánu MTT z tkanivových extraktov prostredníctvom splnenia kritérií prijateľnosti v prípade súboru štandardných parametrov kvalifikácie založených na parametroch opísaných v odvetvovom usmernení Amerického úradu pre potraviny a lieky (*U.S. Food and Drug Administration*) týkajúcom sa validácie bioanalytickej metódy (36)(37). Tieto kľúčové parametre a ich kritériá prijateľnosti sú uvedené v dodatku 4. Po splnení kritérií prijateľnosti vymedzených v dodatku 4 sa systém spektrofotometrie HPLC/UPLC považuje za kvalifikovaný a pripravený na meranie formazánu MTT za experimentálnych podmienok opísaných v tejto testovanej metóde.

Kritériá prijateľnosti

35. Pri každej testovacej metóde, pri ktorej sa používajú validované šarže modelu RhE (pozri odsek 23), by tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou mali vykazovať optickú hustotu, ktorá odráža kvalitu tkanív po krokoch zaslania a prijatia a po všetkých postupoch podľa protokolu. Hodnoty optickej hustoty pri kontrole by nemali byť nižšie ako historicky stanovené hranice. Tkanivá ošetrené PC, t. j. 5 % vodným dodecylsulfátom sodným (SDS), by podobne mali odrážať svoju schopnosť reagovať na dráždivé chemikálie za podmienok testovacej metódy [pozri dodatok 3, a v prípade potreby ďalších informácií sú SOP pre štyri testovacie modely zahrnuté v tomto TG (32) (33) (34) (35)]. Súvisiace a vhodné opatrenia variability medzi replikátmi tkaniva, t. j. štandardné odchýlky (SD), by mali spadať do hraníc prijateľnosti stanovených pre použitý testovací model (pozri dodatok 3).

Interpretácia výsledkov a prognostický model

36. Hodnoty optickej hustoty zaznamenané pri každej testovanej chemikálii sa môžu použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti normalizovanej na negatívnu kontrolu, ktorá je stanovená na 100 %. V prípade použitia spektrofotometrie HPLC/UPLC sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným na základe súbežnej negatívnej kontroly. Je potrebné jasne definovať, zdokumentovať a preukázať hraničnú percentuálnu hodnotu životaschopnosti buniek, ktorá rozlišuje medzi dráždivými testovanými chemikáliami a neklasifikovanými testovanými chemikáliami, a štatistický(-é) postup(-y) použitý(-é) pri hodnotení výsledkov a identifikácii dráždivých chemikálií (informácie sú uvedené v SOP v prípade testovacích modelov). Hraničné hodnoty prognózy podráždenia sú uvedené ďalej v texte:

— Testovaná chemikália sa identifikuje ako chemikália, ktorá si vyžaduje klasifikáciu a označenie v súlade s GHS OSN/CLP (kategória 2 alebo kategória 1), ak je stredný percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení menší alebo sa rovná (≤) 50 %. Keďže testovacie modely RhE, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda, neumožňujú rozlišovanie medzi kategóriami 1 a 2 podľa GHS OSN/CLP, na prijatie rozhodnutia o konečnej klasifikácii sa budú vyžadovať ďalšie informácie o poleptaní kože [pozri aj usmerňovací dokument OECD týkajúci sa IATA (3)]. V prípade zistenia, že testovaná chemikália je nežieravá (napr. na základe TM.40, B.40a alebo B.65) a vykazuje životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení, ktorá je nižšia alebo sa rovná (≤) 50 %, sa testovaná chemikália pokladá za dráždivú pre kožu v súlade s kategóriou 2 GHS OSN/CLP.

— V závislosti od regulačného rámca v členských krajinách možno testovanú chemikáliu považovať za nedráždivú pre kožu v súlade so zaradením „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP, ak je životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení vyššia ako (>) 50 %.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

37. Pri každom testovacom cykle je potrebné vo forme tabuľky zaznamenať údaje z jednotlivých replikátov tkanív (napr. hodnoty optickej hustoty a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie) vrátane údajov o opakovaných pokusoch, ak je to vhodné. Okrem toho by sa mali pri každom testovacom cykle uvádzať aj stredné hodnoty ± štandardnej odchýlky (SD). Pozorované interakcie s reakčným činidlom MTT a zafarbenými testovanými chemikáliami by sa mali oznamovať pre každú testovanú chemikáliu.

Správa o teste

38. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované chemikálie a kontrolné chemikálie:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to vhodné a prakticky uskutočniteľné atď.,

— viaczložková látka, UVCB a zmes: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej chemikálie pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak je známy,

— podmienky skladovania.

Použitý model RhE a protokol (a odôvodnenie danej voľby, ak je to uplatniteľné)

Podmienky testovania:

— použitý model RhE (vrátane čísla šarže),

— údaje o kalibrácii zariadenia na meranie (napr. spektrofotometer), vlnová dĺžka a pásmový filter (ak je to uplatniteľné) použitý na kvantifikáciu formazánu MTT, a rozsah linearity zariadenia na meranie, opis metódy použitej na kvantifikáciu formazánu MTT,

— opis kvalifikácie systému spektrofotometrie HPLC/UPLC, ak je to uplatniteľné, úplné podporné údaje o konkrétnom použitom modeli RhE vrátane jeho výkonnosti. K nim by mali patriť okrem iného:

  i) životaschopnosť;

  ii) bariérová funkcia;

  iii) morfológia;

  iv) reprodukovateľnosť a predvídateľnosť;

  v) kontroly kvality modelu (QC),

— odkaz na historické údaje o modeli. Mala by sem okrem iného patriť prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach.

— preukázanie spôsobilosti vykonávať testovaciu metódu pred bežným použitím prostredníctvom testovania chemikálií na preukázanie spôsobilosti.

Testovací postup:

— podrobné údaje o použitom testovacom postupe (vrátane postupov umývania použitých po expozičnom období); dávka testovanej chemikálie a použitých kontrol,

— trvanie expozičného času a inkubačného času po expozícii a teplota počas nich,

— indikácia kontrol použitých v prípade priamych reduktantov MTT a/alebo sfarbených testovaných chemikálií, ak je to uplatniteľné,

— počet replikátov tkaniva použitých pri každej z testovaných chemikálií a kontrol (PC, negatívna kontrola a NSMTT, NSC_{living} a NSC_{killed}, ak je to uplatniteľné),

— opis rozhodovacích kritérií/prognostického modelu, ktoré sa uplatňujú vzhľadom na použitý model RhE,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu (vrátane postupov umývania).

Testovací cyklus a kritériá prijateľnosti testu

— pozitívnu a negatívnu kontrolu predstavujú stredné hodnoty a rozsahy prijateľnosti založené na historických údajoch, prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade pozitívnych a negatívnych kontrol,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade testovanej chemikálie.

Výsledky:

— tabuľkový zápis údajov týkajúcich sa jednotlivých testovaných chemikálií pri každom testovacom cykle a každom meraní replikátu, a to vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva, stredného percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva a SD,

— ak je to uplatniteľné, výsledky kontrol použitých v prípade chemikálií priamo redukujúcich MTT a/alebo zafarbených testovaných chemikálií vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, SD, konečného správneho percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva,

— výsledky získané s testovanou(-ými) chemikáliou(-ami) a kontrolami vo vzťahu k definovanému testovaciemu cyklu a kritériám prijateľnosti testu,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia v súvislosti s prognostickým modelom/rozhodovacími kritériami, ktoré sa používajú.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

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

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the „Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards“, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

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

(4) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie, poleptanie kože.

(5) Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Testovacia metóda pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER).

(6) Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Testovacia metóda s použitím rekonštruovanej ľudskej pokožky (RHE).

(7) Kapitola B.65 tejto prílohy, Metóda na testovanie s využitím membránovej bariéry *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(20) EURL-ECVAM (2007). *Statement on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation*, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing. N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(41) EC (2001). Smernica Komisie 2001/59/EC zo 6. augusta 2001, ktorou sa po 28-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označenia nebezpečných látok, Úradný vestník Európskej únie L 225, s. 1-333.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (9).

Životaschopnosť buniek: parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie, ako napríklad schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá)], ktorý v závislosti od meraného sledovaného parametra a od použitej koncepcie testu zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Chemikália: je látka alebo zmes.

Zhoda: ide o mieru výkonnosti pre testovacie modely, ktoré poskytujú kategorizačné výsledky, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a je vymedzený ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo veľkej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch skúmaných testovaných chemikálií (9).

ET_{50}: môže sa odhadnúť stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % pri použití referenčnej chemikálie v špecifickej pevne určenej koncentrácii, pozri takisto IC_{50}.

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií Organizácie Spojených národov (OSN)]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

HPLC: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

IC_{50}: môže sa odhadnúť stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, pozri takisto ET_{50}.

Nekonečná dávka: množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na epidermu, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu epidermy.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm %.

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá tetrazóliumbromid.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NSC_{killed}: nešpecifická farba v usmrtených tkanivách.

NSC_{living}: nešpecifická farba v živých tkanivách.

NSMTT: nešpecifická redukcia MTT.

Normy výkonnosti (PS): normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (9).

PC: pozitívna kontrola, replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený chemikáliou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, rozsah pozitívnej reakcie by nemal byť nadmerný.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (9).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (9).

Náhradný test: test navrhnutý ako náhrada za test, ktorý sa bežne používa a je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zvýšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testované situácie a chemikálie (9).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s negatívnou kontrolou a s PC.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Podráždenie kože *in vivo*: vznik vratného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie v trvaní do štyroch hodín. Podráždenie kože je lokálne vzniknutá reakcia ovplyvneného kožného tkaniva a objaví sa krátko po stimulácii (38). Je spôsobené lokálnou zápalovou reakciou spojenou s vrodeným (nešpecifickým) imunitným systémom kožného tkaniva. Jeho charakteristickou vlastnosťou je vratný proces zahŕňajúci zápalové reakcie a väčšinu klinických prejavov podráždenia charakteristických pre zápalový proces (erytém, edém, svrbenie a bolesť).

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UPLC: ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Dodatok 2

TESTOVACIE MODELY ZAHRNUTÉ DO TEJTO TESTOVACEJ METÓDY

Č.	Názov testovacieho modelu	Typ validačnej štúdie	Odkazy
1	EpiSkin™	Úplná prospektívna validačná štúdia (2003 – 2007). Zložky tohto modelu boli použité na určenie nevyhnutných zložiek testovacej metódy v rámci pôvodných a aktualizovaných PS ECVAM (39) (40) (21) (*) . Okrem toho údaje o metóde týkajúce sa identifikácie neklasifikovaných a klasifikovaných látok tvorili základné východisko na vymedzenie hodnôt špecifickosti a citlivosti pôvodných PS (*) .	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*pôvodný*): Testovací model najprv podstúpil úplnú prospektívnu validáciu spolu s č. 1 z rokov 2003 – 2007. Zložky tohto modelu boli použité na určenie nevyhnutných zložiek testovacej metódy v rámci pôvodných a aktualizovaných PS ECVAM (39) (40) (21) (*).	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)
		EpiDerm™ SIT (EPI-200): Zmena pôvodného EpiDerm™ bola validovaná pomocou pôvodných PS ECVAM (21) v roku 2008 (*)	(2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validačná štúdia založená na pôvodných normách výkonnosti ECVAM (21) v roku 2008 (*) .	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validačná štúdia (2011 – 2012) založená na normách výkonnosti (PS) usmernenia OECD TG 439 (8), ktoré sú založené na aktualizovaných PS ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) a PS tohto TG (8) (*)

(*) Pôvodné normy výkonnosti (PS) ECVAM (21) boli vypracované v roku 2007 po dokončení prospektívnej validačnej štúdie (16), v ktorej sa posudzovala výkonnosť testovacích modelov č. 1 a 2 v súvislosti so systémom klasifikácie, ako sa uvádza v 28. zmene smernice EÚ o nebezpečných látkach (41). V roku 2008 sa zaviedol GHS OSN (1) a nadobudlo účinnosť nariadenie CLP EÚ, ktoré fakticky posunuli hraničnú hodnotu na rozlišovanie neklasifikovaných a klasifikovaných látok z hodnoty *in vivo* 2.0 na 2.3. S cieľom prispôsobiť sa tejto zmenenej regulačnej požiadavke sa v roku 2009 aktualizovali hodnoty presnosti a zoznam referenčných chemikálií v rámci PS ECVAM (2) (39) (40). Tak ako pôvodné PS aj aktualizované PS boli z veľkej časti založené na údajoch z modelov č. 1 a 2 (16), ale navyše sa v nich použili údaje o referenčných chemikáliách z modelu č. 3. V roku 2010 sa aktualizované PS ECVAM použili na určenie PS súvisiacich s týmto TG (8). Na účely tejto testovacej metódy sa EpiSkin™ považuje za validovanú referenčnú metódu (VRM) vzhľadom na skutočnosť, že bol použitý na vypracovanie všetkých kritérií PS. Podrobné informácie o validačných štúdiách, súbor získaných údajov, ako aj odôvodnenie nevyhnutných zmien v PS v dôsledku vykonávania GHS OSN/nariadenia CLP možno nájsť vo vysvetľujúcom podkladovom dokumente ECVAM/BfR k príslušnému usmerneniu OECD TG 439 (23).

SIT: test podráždenia kože

RHE: zrekonštruovaná ľudská epiderma

Dodatok 3

PARAMETRE PROTOKOLU ŠPECIFICKÉ PRE KAŽDÝ Z TESTOVACÍCH MODELOV ZAHRNUTÝCH DO TEJTO TESTOVACEJ METÓDY

Modely RhE vykazujú veľmi podobné protokoly a predovšetkým sa vo všetkých z nich používa postinkubačné obdobie 42 hodín (32) (33) (34) (35). Variácie sa týkajú hlavne troch parametrov týkajúcich sa rôznych bariérových funkcií testovacích modelov a sú uvedené tu: A) predinkubačný čas a objem; B) aplikácia testovaných chemikálií a C) postinkubačný objem.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Predinkubácia				
Inkubačný čas	18 – 24 hodín	18 – 24 hodín	< 2 hodiny	15 – 30 hodín
Stredný objem	2 ml	0,9 ml	0,3 alebo 1 ml	0,5 ml
B) Aplikácia testovaných chemikálií				
Pri kvapalinách	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Pri tuhých látkach	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Použitie nylonového sitka	Nepoužíva sa	Podľa potreby	Používa sa	Nepoužíva sa
Celkový čas aplikácie	15 minút	60 minút	42 minút	15 minút
Teplota pri aplikácii	RT	a) pri RT na 25 minút b) pri 37 °C na 35 minút	RT	RT
C) Postinkubačný objem				
Stredný objem	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximálna prijateľná variabilita				
Štandardná odchýlka (SD) medzi replikátmi tkaniva	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: izbová teplota
DW: destilovaná voda
DPBS: Dulbeccov fosfátový tlmivý fyziologický roztok

Dodatok 4

KĽÚČOVÉ PARAMETRE A KRITÉRIÁ PRIJATEĽNOSTI NA KVALIFIKÁCIU SYSTÉMU HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIE NA MERANIE FORMAZÁNU MTT ZÍSKANÉHO Z TKANÍV RHE

Parameter	Protokol odvodený z usmernenia FDA (36) (37)	Kritériá prijateľnosti
Selektívnosť	Analýza izopropanolu, living blank (izopropanolový extrakt zo živých tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia), dead blank (izopropanolový extrakt z usmrtených tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia)	Oblasť interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % oblasti LLOQ ($Area_{LLOQ}$) (1)
Exaktnosť	Kontroly kvality (t. j. formazán MTT v objeme 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v izopropanole (n = 5)	CV ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Presnosť	Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	% Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Matricový efekt	Kontroly kvality v living blank (n = 5)	85 % ≤ % matricového efektu ≤ 115 %
Prenos	Analýza izopropanolu podľa normy ULOQ (2)	Oblasť interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % oblasti LLOQ ($Area_{LLOQ}$)
Reprodukovateľnosť (v priebehu dňa)	3 nezávislé kalibračné krivky (na základe 6 po sebe nasledujúcich riedení formazánu MTT v izopropanole v pomere 1:3, začínajúc pri ULOQ, t. j. 200 µg/ml); Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	Kalibračné krivky: % Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ Kontroly kvality: % Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovateľnosť (v priebehu dní)	Deň 1: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 2: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 3: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhE	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanom v deň prípravy a po 24 hodinách skladovania pri izbovej teplote	% Dev ≤ 15 %
Dlhodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhE, ak je to potrebné	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanom v deň prípravy a po niekoľkých dňoch skladovania pri stanovenej teplote (napr. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	% Dev ≤ 15 %“

(1) LLOQ: nižší limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby zahŕňal životaschopnosť tkaniva 1 – 2 %, teda 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: vyšší limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby bol najmenej dvojnásobne vyšší než najvyššia očakávaná koncentrácia formazánu MTT v izopropanolových extraktoch z negatívnych kontrol, teda 200 µg/ml.

8. V časti B sa dopĺňajú tieto kapitoly:

„B.63 **SKRÍNINGOVÝ TEST REPRODUKČNEJ/VÝVOJOVEJ TOXICITY**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 421 (2016). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok. Pôvodné usmernenie 421 na vykonávanie skríningových testov bolo prijaté v roku 1995 na základe protokolu pre „Predbežný skríningový test reprodukčnej toxicity", o ktorom sa diskutovalo na dvoch stretnutiach odborníkov, a to v Londýne v roku 1990 (1) a v Tokiu v roku 1992 (2).

2. Táto testovacia metóda bola doplnená o príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, a to v nadväznosti na činnosť s vysokou prioritou, ktorú začala OECD v roku 1998 s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia na vykonávanie testov a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov (3). Napríklad usmernenie OECD TG 407 (28-dňová štúdia orálnej toxicity po opakovaných dávkach pri hlodavcoch, kapitola B.7 tejto prílohy) bolo v roku 2008 rozšírené o parametre vhodné na zistenie endokrinného pôsobenia testovaných chemikálií. Cieľom aktualizácie TG 421 bolo zahrnúť niektoré príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov do TG týkajúcich sa skríningu, kde časy expozície zahŕňajú niektoré z citlivých období počas vývoja (prenatálne alebo skoré postnatálne obdobie).

3. Tieto vybrané dodatočné príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, ktoré sú zároveň súčasťou TG 443 (Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity, kapitola B.56 tejto prílohy) boli zahrnuté do TG 421 na základe štúdie uskutočniteľnosti, ktorá sa týkala vedeckých a technických otázok súvisiacich s ich zaradením, ako aj možných úprav koncepcie testu potrebných na ich zaradenie (4).

4. Táto testovacia metóda je navrhnutá tak, aby sa v nej generovali obmedzené informácie týkajúce sa účinkov testovanej chemikálie na samčiu a samičiu reprodukčnú schopnosť, ako sú funkcie pohlavných žliaz, rozmnožovacie správanie, počatie, vývoj zárodku a pôrod. Nie je alternatívou k existujúcim testovacím metódam B.31, B.34, B.35 alebo B.56, ani ich nenahrádza.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

5. Táto skríningová testovacia metóda sa môže použiť na poskytnutie počiatočných informácií o možných účinkoch na reprodukciu a/alebo vývoj v skorom štádiu posudzovania toxikologických vlastností chemikálií, alebo informácií o predmetných chemikáliách. Môže sa použiť aj ako súčasť súboru počiatočných skríningových testov pri existujúcich chemikáliách, o ktorých je k dispozícii len málo toxikologických informácií alebo nie sú k dispozícii žiadne toxikologické informácie, ako štúdia na zistenie rozsahu dávok pri rozsiahlejších štúdiách o reprodukcii/vývoji, alebo ak sa to inak považuje za relevantné. Pri vykonávaní štúdie je potrebné sa riadiť zásadami a hľadiskami uvedenými v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o uznávaní, posudzovaní a používaní klinických príznakov ako sledovaných parametrov u ľudí v prípade pokusných zvierat používaných pri hodnotení bezpečnosti (5).

6. Táto testovacia metóda neposkytuje úplné informácie o všetkých aspektoch reprodukcie a vývoja. Predovšetkým ponúka len obmedzené prostriedky na zistenie postnatálnych prejavov prenatálnej expozície alebo na zistenie účinkov, ktoré môžu byť vyvolané počas postnatálnej expozície. V dôsledku (okrem iných dôvodov) pomerne malého počtu zvierat v dávkových skupinách, selektívnosti sledovaných parametrov a krátkeho trvania štúdie táto metóda neposkytuje dôkazy na podloženie konečných záverov o neexistencii účinkov. Okrem toho, ak neexistujú údaje z iných testov reprodukčnej/vývojovej toxicity, pozitívne výsledky sú užitočné pri počiatočnom posúdení nebezpečnosti a prispievajú k rozhodnutiam, pokiaľ ide o potrebu a načasovanie ďalšieho testovania.

7. Výsledky získané pomocou parametrov súvisiacich s endokrinným systémom by sa mali posudzovať v kontexte „Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií poškodzujúcich endokrinný systém" (6). V tomto koncepčnom rámci je rozšírené usmernenie OECD TG 421 obsiahnuté na úrovni 4 ako skúška *in vivo* poskytujúca údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému. Signál endokrinného systému sa však sám osebe nemusí považovať za dostatočný dôkaz, že testovaná chemikália je endokrinným disruptorom.

8. Pri tejto testovacej metóde sa testovaná chemikália podáva orálne. Ak sa použijú iné spôsoby expozície, môžu sa vyžadovať úpravy.

9. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

10. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

11. Testovaná chemikália sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom by sa mali dávky podávať najmenej štyri týždne a až do dňa pred naplánovaným usmrtením vrátane tohto dňa (to znamená minimálne dva týždne pred párením, počas obdobia párenia a približne dva týždne po párení). Vzhľadom na obmedzené obdobie podávania dávok pred párením pri samcoch nemôže plodnosť predstavovať osobitný citlivý ukazovateľ testikulárnej toxicity. Z toho dôvodu je dôležité podrobné histologické vyšetrenie semenníkov. Na zistenie väčšiny účinkov na samčiu plodnosť a spermatogenézu sa za dostatočnú kombináciu považuje spojenie dvojtýždňového obdobia podávania dávok pred párením a následných pozorovaní párenia/plodnosti s najmenej štvortýždňovým celkovým obdobím podávania dávok, po ktorom nasleduje podrobná histopatológia samčích pohlavných žliaz.

12. Samiciam by sa mali podávať dávky počas celej štúdie. To zahŕňa dva týždne pred párením (s cieľom pokryť aspoň dva úplné estrálne cykly), variabilný čas do počatia, trvanie gravidity a najmenej trinásť dní po pôrode až do dňa pred naplánovaným usmrtením vrátane tohto dňa.

13. Trvanie štúdie – po aklimatizácii a vyhodnotení estrálneho cyklu pred začatím podávania dávok – závisí od stavu samice a má dĺžku približne 63 dní [najmenej 14 dní pred obdobím párenia, (do) 14 dní obdobia párenia, 22 dní gravidity, 13 dní laktácie].

14. Počas obdobia podávania sa zvieratá dôkladne pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť toxických príznakov. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas obdobia testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

15. Táto testovacia metóda je určená na použitie s potkanmi. Ak sa parametre uvedené v rámci tejto testovacej metódy skúmajú pri inom druhu hlodavcov, je potrebné uviesť podrobné odôvodnenie. V rámci medzinárodného programu overovania na zistenie endokrinných disruptorov v usmernení OECD TG 407 (ktoré zodpovedá kapitole B.7 tejto prílohy) sa použili iba potkany. Kmene s nízkou plodnosťou alebo kmene, o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, by sa nemali používať. Mali by byť použité zdravé panenské zvieratá, ktoré dosiaľ neboli predmetom žiadnych testov. Pokusné zvieratá by mali byť charakterizované, pokiaľ ide o druh, kmeň, pohlavie, hmotnosť a vek. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita použitých zvierat minimálna a nemala by presiahnuť 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná štúdia k dlhodobej alebo celogeneračnej štúdii, je lepšie v oboch štúdiách použiť zvieratá toho istého druhu a z toho istého zdroja.

Umiestnenie a kŕmenie

16. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala prevyšovať 70 %, cieľová relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom.

17. Zvieratá by mali byť umiestnené spolu v malých skupinách rovnakého pohlavia. Ak je to vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne. Pokiaľ ide o umiestnenie skupín do klietok, v jednej klietke by nemalo byť viac ako päť zvierat. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Gravidné samice by mali byť jednotlivo umiestnené do klietok a mal by sa im poskytnúť materiál na tvorbu hniezda. Samice v laktácii sa jednotlivo umiestnia do klietok so svojím potomstvom.

18. Krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty. Vzorka krmiva by sa mala zachovať až do dokončenia správy.

Príprava zvierat

19. Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa v klietkach aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

Príprava dávok

20. Odporúča sa, aby sa testovaná chemikália podávala orálne, pokiaľ sa iná cesta podania nepokladá za vhodnejšiu. Keď sa zvolí orálna cesta, testovaná chemikália sa obvykle podáva sondou. Alternatívne sa však testované chemikálie môžu podávať v krmive alebo pitnej vode.

21. V prípade potreby sa testovaná chemikália rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. v kukuričnom oleji) a nakoniec použitie prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre iné nosiče ako voda majú byť známe toxické vlastnosti nosiča. Mala by sa určiť stabilita a homogenita testovanej chemikálie v nosiči.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

22. Odporúča sa, aby každá skupina začala najmenej s 10 samcami a 12 – 13 samicami. Pri samiciach sa pred expozíciou vyhodnotí estrálny cyklus a zvieratá, ktoré nevykazujú príznačné 4 – 5-dňové cykly, nebudú zaradené do štúdie. Preto sa odporúča viac samíc, aby na skupinu pripadalo 10 samíc. Očakáva sa, s výnimkou prípadov výrazných toxických účinkov, že takto sa dosiahne počet najmenej 8 gravidných samíc na skupinu, čo je obvykle minimálny prijateľný počet gravidných samíc na skupinu. Cieľom je dosiahnuť dostatočný počet gravidných samíc a potomkov, aby sa zabezpečilo zmysluplné hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie pôsobiť na plodnosť, graviditu, materské a dojčenské správanie, ako aj na rast a vývoj potomstva generácie F_1 od počatia po 13. deň po pôrode.

Dávkovanie

23. Bežne sa používajú tri testované skupiny a jedna kontrolná skupina. Úrovne dávok môžu vychádzať z informácií z testov akútnej toxicity alebo z výsledkov štúdií s opakovanou dávkou. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

24. Pri výbere úrovní dávok by sa mali brať do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike. Okrem toho by sa malo vziať do úvahy, že môžu existovať rozdiely v citlivosti medzi gravidnými a negravidnými samicami. Najvyššia úroveň dávky sa vyberie tak, aby vyvolala toxické účinky, ale nespôsobila uhynutie zvierat ani vážne utrpenie. Potom sa klesajúca postupnosť úrovní dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá odozva na dávku a stanovila sa hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) pri najnižšej úrovni dávky. Pri stanovení klesajúcich úrovní dávok sú často optimálne intervaly predstavujúce dvoj- až štvornásobok, pričom pridanie štvrtej testovanej skupiny je často vhodnejšie než použitie veľmi veľkých intervalov medzi dávkami (napr. viac než 10-násobku).

25. Ak sa pozoruje všeobecná toxicita (napr. zníženie telesnej hmotnosti, účinky na pečeň, srdce, pľúca alebo obličky atď.) alebo iné zmeny, ktoré nemusia byť toxikologickou reakciou (napr. nižší príjem potravy, zväčšenie pečene), pri interpretácii pozorovaných účinkov na endokrinné citlivé sledované parametre je potrebné postupovať obozretne.

Limitný test

26. Ak sa v orálnej štúdii s jednou úrovňou dávky dosahujúcou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo, v prípade podávania v krmive alebo pitnej vode, pri rovnakom percentuálnom podiele v krmive alebo pitnej vode s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu neprejavia žiadne pozorovateľné toxické účinky a ak sa vzhľadom na údaje o štrukturálne príbuzných látkach toxicita neočakáva, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie zahŕňajúcej viaceré úrovne dávok. Limitný test sa neuplatňuje vtedy, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu orálnu dávku. V prípade iných ciest podania, napr. pri inhalácii alebo dermálnej aplikácii, môžu maximálnu dosiahnuteľnú koncentráciu často určovať fyzikálno-chemické vlastnosti testovaných chemikálií.

Podávanie dávok

27. Zvieratám sa podáva testovaná chemikália každý deň, 7 dní v týždni. Ak je testovaná chemikália podávaná cez sondu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť objem 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých testovaných chemikálií, ktoré pri vyšších koncentráciách zvyčajne spôsobujú zhoršenie účinkov, by sa variabilita v aplikovanom objeme mala minimalizovať tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem pri všetkých úrovniach dávok.

28. V prípade podávania testovanej chemikálie v krmive alebo pitnej vode je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej chemikálie nenarúšalo normálnu nutričnú alebo vodnú rovnováhu. Keď sa testovaná chemikália podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm), alebo stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; iné možnosti by sa mali špecifikovať. V prípade podávania testovanej chemikálie pomocou sondy sa má príslušná dávka podávať každý deň približne v rovnakom čase a aspoň raz za týždeň sa upraví, aby sa zachovala stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat.

Harmonogram testu

29. Podávanie dávky obom pohlaviam by sa malo začať najmenej 2 týždne pred párením, pričom najskôr sa zvieratá najmenej päť dní aklimatizujú a vykoná sa skríning samíc na účely zistenia normálnych estrálnych cyklov (v 2-týždňovom období pred aplikáciou chemikálie). Štúdia by sa mala naplánovať tak, aby sa hodnotenie estrálneho cyklu začalo tesne po dosiahnutí úplnej pohlavnej zrelosti zvierat. To sa v prípade rôznych kmeňov potkanov v rôznych laboratóriách môže mierne líšiť, napr. pri potkanoch z kmeňa Sprague Dawley je to vo veku 10 týždňov a pri potkanoch z kmeňa Wistar približne vo veku 12 týždňov. Matky s potomstvom by mali byť usmrtené 13. deň po pôrode alebo krátko po tomto dni. Deň narodenia (t. j. deň ukončenia pôrodu) sa označuje ako deň 0 po pôrode. Samice, pri ktorých sa nezaznamená kopulácia, sú usmrtené 24 – 26 dní od posledného dňa obdobia párenia. Podávanie dávky pokračuje pri oboch pohlaviach počas obdobia párenia. Samcom sa dávka ďalej podáva po období párenia aspoň do skončenia minimálneho 28-dňového celkového obdobia podávania dávok. Potom sa usmrtia, prípadne sa uchovajú a naďalej sa im podáva dávka na účely možného druhého párenia, ak sa to považuje za vhodné.

30. Denné podávanie dávok rodičovským samiciam by malo pokračovať v priebehu gravidity a najmenej do 13. dňa (vrátane) po pôrode alebo do dňa pred usmrtením. V prípade štúdií, pri ktorých sa testovaná chemikália podáva inhaláciou alebo transdermálne, by podávanie dávky malo pokračovať najmenej do 19. dňa gravidity (vrátane) a podávanie dávky by sa malo čo najskôr obnoviť – najneskôr na 4. postnatálny deň.

31. Schéma harmonogramu testu je uvedená v dodatku 2.

Párenie

32. V tejto štúdii sa bežne používajú pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica). Výnimky sa môžu vyskytnúť v prípade príležitostných úmrtí samcov. Samica sa má nachádzať v prítomnosti toho istého samca, kým sa nezaznamená kopulácia alebo kým neuplynú dva týždne. Každé ráno sa samice vyšetria na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, keď sa potvrdí dôkaz o párení (zistí sa prítomnosť vaginálnej zátky alebo spermy). V prípade neúspešného párenia sa zváži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou.

Veľkosť vrhu

33. Na 4. deň po narodení možno upraviť veľkosť jednotlivých vrhov odstránením prebytočných mláďat náhodným výberom, aby sa v čo najväčšej miere dosiahli vrhy so štyrmi alebo piatimi mláďatami z každého pohlavia v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov. Z dvoch prebytočných mláďat sa odoberú vzorky krvi, ktoré sa zlúčia a použijú na určenie hladín hormónu T4 v sére. Nie je vhodné selektívne odstraňovanie mláďat, napríklad na základe telesnej hmotnosti alebo anogenitálnej vzdialenosti (AGD). Ak vzhľadom na počet samčích alebo samičích mláďat nemožno dospieť k tomu, aby každý vrh tvorilo štyri až päť mláďat z každého pohlavia, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad šesť samcov a štyri samice). Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod cieľovú hodnotu na utratenie (8 alebo 10 mláďat/vrh). Ak sa cieľová hodnota na utratenie prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

34. Ak sa veľkosť vrhu neupraví, 4. deň po narodení sa usmrtia dve mláďatá v každom vrhu a odoberú sa vzorky krvi na meranie koncentrácií hormónu štítnej žľazy v sére. Ak je to možné, uvedené dve mláďatá v každom vrhu by mali byť samice, aby bolo možné vyhradiť samčie mláďatá na vyhodnotenie vzniku retenčnej mliečnej cysty. Neplatí to však v prípade, keď by po odstránení týchto mláďat neostali žiadne samice na posúdenie po usmrtení. Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod 8 alebo 10 mláďat/vrh (v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov). Ak sa bežná veľkosť vrhu prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

Pozorovania počas života

Klinické pozorovania

35. Počas celého testovacieho obdobia sa najmenej raz denne vykonávajú všeobecné klinické pozorovania, pričom v prípade pozorovania toxických príznakov sa vykonávajú častejšie. Vykonávajú sa pokiaľ možno každý deň v rovnakom čase s prihliadnutím na obdobie, keď sa predpokladajú maximálne účinky po podaní dávky. Zaznamenávajú sa príslušné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky toxické príznaky vrátane úmrtnosti. Tieto záznamy by mali zahŕňať čas nástupu, stupeň a trvanie toxických príznakov.

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

36. Samce a samice sa odvážia v prvý deň podávania dávok, potom najmenej raz týždenne a následne pri usmrtení. Počas gravidity sa samice odvážia na 0., 7., 14. a 20. deň a do 24 hodín po pôrode (0. alebo 1. deň po pôrode) a najmenej na 4. a 13. deň po pôrode. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera.

37. Počas obdobia pred párením, obdobia gravidity a laktácie by sa mala aspoň raz za týždeň merať spotreba potravy. Meranie spotreby potravy počas párenia je voliteľné. Počas týchto období sa meria aj spotreba vody, ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode.

Estrálne cykly

38. Estrálne cykly sa monitorujú pred začatím ošetrenia s cieľom vybrať do štúdie samice s pravidelnými cyklami (pozri odsek 22). Od začiatku obdobia ošetrenia až do zaznamenania párenia sa denne monitorujú aj vaginálne stery. Ak existujú obavy z akútnych stresových účinkov, ktoré by mohli zmeniť estrálne cykly po začatí podávania dávok, laboratóriá môžu použiť expozíciu pokusných zvierat počas 2 týždňov, potom denne odoberať vaginálne stery na monitorovanie estrálneho cyklu najmenej dva týždne počas obdobia pred párením a pokračovať s monitorovaním až do obdobia párenia, až kým sa nezaznamená párenie. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné dbať na to, aby sa neporušila sliznica, čo by mohlo vyvolať pseudograviditu (7) (8).

Parametre potomstva

39. Trvanie gravidity sa zaznamená a počíta sa od jej 0. dňa. Každý vrh je potrebné čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť počet a pohlavie mláďat, mŕtvonarodených, živonarodených a nevyvinutých jedincov (mláďat, ktoré sú výrazne menšie než príslušné mláďatá z kontrolnej skupiny) a prítomnosť výrazných abnormalít.

40. Živé mláďatá sa spočítajú, určí sa ich pohlavie a do 24 hodín od pôrodu (na 0. alebo 1. deň po pôrode) a následne najmenej na 4. a 13. deň po pôrode sa určí ich telesná hmotnosť. Okrem pozorovaní uvedených v odseku 35 je potrebné zaznamenať akékoľvek abnormálne správanie potomstva.

41. V ten istý deň medzi 0. až 4. postnatálnym dňom sa zmeria anogenitálna vzdialenosť (AGD) každého mláďaťa. V deň merania AGD sa zisťuje aj telesná hmotnosť mláďaťa, pričom sa AGD štandardizuje na mieru veľkosti mláďaťa, najlepšie na tretiu odmocninu telesnej hmotnosti (9). Na 12. alebo 13. postnatálny deň sa určí počet bradaviek/areol pri samčích mláďatách, ako sa odporúča v usmerňovacom dokumente OECD č. 151 (10).

Klinická biochémia

42. Vzorky krvi sa odoberajú z určeného miesta na základe tohto harmonogramu:

— najmenej dvom mláďatám na vrh na 4. deň po narodení, ak to umožňuje počet mláďat (pozri odseky 33 – 34),

— všetkým matkám a najmenej dvom mláďatám na vrh pri usmrtení na 13. deň a

— všetkým dospelým samcom pri usmrtení.

Všetky vzorky krvi sa uchovávajú za vhodných podmienok. Vzorky krvi mláďat z 13. dňa a dospelých samcov sa posudzujú, pokiaľ ide o hladiny hormónov štítnej žľazy (T4) v sére. Ak je to relevantné, vykoná sa ďalšie posúdenie T4 vo vzorkách krvi matiek a mláďat zo 4. dňa. V relevantných prípadoch možno voliteľne vykonať meranie iných hormónov. Na účely analýzy hormónov štítnej žľazy možno krv mláďat zlúčiť v rámci vrhu. Hormóny štítnej žľazy (T4 a TSH) sa majú podľa možnosti merať ako celková hodnota.

43. Variabilitu a absolútne koncentrácie hormonálnych ukazovateľov môžu ovplyvniť tieto faktory:

— čas usmrtenia z dôvodu každodennej zmeny koncentrácií hormónov,

— metóda usmrtenia s cieľom zabrániť neprimeranému stresu pre zvieratá, ktorý môže ovplyvniť koncentrácie hormónov,

— súpravy na testovanie hormonálnych ukazovateľov, ktoré sa môžu líšiť štandardnými krivkami.

44. Vzorky plazmy osobitne určené na stanovenie hladiny hormónov sa odoberú počas porovnateľných denných časov. Číselné hodnoty získané analýzou koncentrácií hormónov sa v prípade použitia rozličných komerčne dostupných testovacích súprav líšia.

Patológia

Makroskopická pitva

45. V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa dospelé zvieratá vyšetria makroskopicky na všetky abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Je potrebné zaznamenať počet implantačných miest. Ráno v deň pitvy sa vyšetria vaginálne stery, aby sa určilo štádium estrálneho cyklu a umožnilo sa určenie korelácie s histopatológiou vaječníkov.

46. Semenníky a nadsemenníky, ako aj prostata a semenné mechúriky s koagulačnými žľazami ako celok všetkých dospelých zvierat sa podľa potreby zbavia priľahlých tkanív a čo najskôr po disekcii sa určí ich vlhká hmotnosť, kým orgány nevyschnú. Okrem toho možno voliteľne určiť hmotnosť orgánov, ako je komplex zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov, Cowperove žľazy a žaluď pri samcoch a párové vaječníky (vlhká hmotnosť) a maternica (vrátane krčka maternice) pri samiciach. V prípade zahrnutia týchto orgánov je potrebné určiť ich hmotnosť čo najskôr po disekcii.

47. Mŕtve mláďatá a mláďatá usmrtené na 13. deň po narodení alebo krátko po tomto dni je potrebné prinajmenšom dôkladne preskúmať zvonku na účely zistenia výrazných abnormalít. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť vonkajším reprodukčným pohlavným orgánom, ktoré by sa mali vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji. Na 13. deň sa uchová štítna žľaza z 1 samčieho a 1 samičieho mláďaťa z každého vrhu.

48. Uchovajú sa vaječníky, semenníky, akcesórne pohlavné orgány (maternica a krčok maternice, nadsemenníky, prostata, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami), štítna žľaza a všetky orgány, ktoré majú makroskopické lézie, všetkých dospelých zvierat. Na rutinné vyšetrenie semenníkov a nadsemenníkov sa neodporúča fixácia formalínom. Prijateľnou metódou pre tieto tkanivá je použitie Bouinovho fixačného prostriedku alebo modifikovaného Davidsonovho fixačného prostriedku (11). Obal *tunica albuginea* sa môže opatrne a plytko prepichnúť ihlou na oboch stranách orgánu, aby sa umožnilo rýchle napustenie fixačným prostriedkom.

Histopatológia

49. Vykoná sa podrobné histologické vyšetrenie vaječníkov, semenníkov a nadsemenníkov (s osobitným dôrazom na štádiá spermatogenézy a histopatológiu štruktúry intersticiálnych buniek semenníkov) zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Podľa potreby možno vyšetriť aj ostatné uchované orgány vrátane štítnej žľazy mláďat a dospelých zvierat. Hmotnosť štítnej žľazy sa môže určiť po fixácii. Orezanie je potrebné vykonať veľmi opatrne a až po fixácii, aby sa predišlo poškodeniu tkaniva. Poškodenie tkaniva by mohlo ohroziť histopatologickú analýzu. Ak sa zistia zmeny v skupine s najvyššou dávkou, tieto vyšetrenia sa aplikujú aj pri zvieratách zo skupín s odlišnou úrovňou dávok. V usmernení o histopatológii (11) sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o disekcii, fixácii, vykonávaní rezov a histopatológii endokrinných tkanív.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

50. Uvádzajú sa údaje o jednotlivých zvieratách. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v tabuľkovej podobe, kde sa pre každú pokusnú skupinu uvedie počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo usmrtenia, počet plodných zvierat, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich toxické príznaky, opis zistených príznakov toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy histopatologických zmien a všetky relevantné údaje, ktoré sa týkajú vrhu. Formát súhrnnej správy v tabuľkovej podobe, ktorý sa ukázal ako veľmi užitočný na hodnotenie reprodukčného/vývojového účinku, sa uvádza v dodatku 3.

51. Vzhľadom na obmedzené rozmery štúdie majú štatistické analýzy vo forme testov „významnosti“ obmedzenú hodnotu v prípade mnohých sledovaných parametrov, najmä reprodukčných sledovaných parametrov. Ak sa použijú štatistické analýzy, vybraná metóda by mala byť vhodná na distribúciu skúmanej premennej a mala by sa zvoliť pred začiatkom štúdie. Štatistická analýza AGD a retenčnej mliečnej cysty vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách, pričom sa zohľadňujú vplyvy spojené s vrhom. Ak je to vhodné, jednotkou analýzy je vrh. Štatistická analýza telesnej hmotnosti mláďaťa vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách s prihliadnutím na veľkosť vrhu. Vzhľadom na veľkosť malých skupín môže byť ako pomoc pri výklade štúdie užitočné aj použitie historických údajov z kontrolných skupín (napr. pokiaľ ide o veľkosť vrhu), ak sú k dispozícii.

Vyhodnotenie výsledkov

52. Zistenia z tejto štúdie toxicity by sa mali vyhodnotiť na základe zistených účinkov, pitvy a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahŕňať vzťah medzi dávkou testovanej chemikálie a prítomnosťou alebo absenciou abnormalít, početnosťou ich výskytu, ako aj ich závažnosťou, a to vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, neplodnosti, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a akýchkoľvek iných toxických účinkov.

53. Z dôvodu krátkeho obdobia ošetrovania samca je pri posudzovaní účinkov na reprodukčnú schopnosť samcov potrebné zvážiť histopatológiu semenníkov a nadsemenníkov spolu s údajmi o plodnosti. Ako pomôcka pri interpretácii štúdie môže byť užitočné aj použitie historických údajov o reprodukcii/vývoji z kontrolných skupín (napr. pokiaľ ide o veľkosť vrhu, AGD, retenčnú mliečnu cystu, hladiny T4 v sére), ak sú k dispozícii.

54. Na účely kontroly kvality sa navrhuje, aby sa zozbierali historické údaje z kontrolných skupín a aby sa vypočítali variačné koeficienty pre číselné údaje, najmä pre parametre spojené s detekciou endokrinného disruptora. Tieto údaje sa môžu použiť pre porovnanie, keď sa vyhodnocujú jednotlivé štúdie.

Správa o teste

55. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu,

— odôvodnenie výberu druhu, ak je iný ako potkan.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak sa uplatňuje,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis postupu randomizácie na výber mláďat na utratenie, ak boli utratené.

Výsledky:

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak sú údaje k dispozícii,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach a dávkach vrátane plodnosti, gravidity a akýchkoľvek iných toxických príznakov,

— dĺžka gravidity,

— toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (údaje o tom, či sú účinky vratné alebo nevratné),

— počet dospelých samíc s normálnym alebo abnormálnym estrálnym cyklom a trvanie cyklu,

— počet živonarodených zvierat a straty po implantácii,

— údaje o telesnej hmotnosti mláďat,

— AGD všetkých mláďat (a telesná hmotnosť v deň merania AGD),

— retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách,

— hladiny hormónov štítnej žľazy pri mláďatách na 13. deň a dospelých samcoch (a pri matkách a mláďatách na 4. deň, ak sa uskutočnilo meranie),

— počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, všeobecné hodnotenie vonkajších pohlavných orgánov, počet nevyvinutých jedincov,

— čas uhynutia počas štúdie alebo údaj, či zvieratá prežili do usmrtenia,

— počet implantátov, veľkosť vrhu a hmotnosť vrhu v čase zaznamenávania,

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o hmotnosti orgánov rodičov,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis histopatologických pozorovaní,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Rozbor výsledkov.

Závery.

Interpretácia výsledkov

56. Štúdia umožní hodnotenia reprodukčnej/vývojovej toxicity v súvislosti s podávaním opakovaných dávok (pozri odseky 5 a 6). Mohla by poskytnúť údaj o potrebe vykonať ďalšie skúmania a poskytuje usmernenia pri navrhovaní následných štúdií. Pri interpretácii výsledkov skúmania reprodukcie a vývoja by sa malo nahliadnuť do usmerňovacieho dokumentu OECD 43 (12). V usmerňovacom dokumente OECD č. 106 o histopatologickom hodnotení endokrinných a reprodukčných testov pri hlodavcoch (11) sa nachádzajú informácie o príprave a hodnotení (endokrinných) orgánov a vaginálnych sterov, ktoré môžu byť užitočné pre toto usmernenie na vykonávanie testov (TG).

LITERATÚRA

(1) OECD (1990). *Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee*. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). *Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods*, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (1998). *Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force*, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2015). *Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(6) OECD (2011). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies*, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). *Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights*, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV [POZRI AJ USMERŇOVACÍ DOKUMENT OECD Č. 150 (6)]

Androgénny účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený androgénny hormón (napr. testosterón).

Antiandrogénny účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného androgénneho hormónu (napr. testosterónu).

Antiestrogénový účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného estrogénového hormónu (napr. estradiolu 17ß).

Antityreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného hormónu štítnej žľazy (napr. T_3).

Chemikália je látka alebo zmes.

Vývojová toxicita je prejav reprodukčnej toxicity predstavujúci prenatálne, perinatálne, postnatálne, štrukturálne alebo funkčné poruchy potomstva.

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvieraťa za deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň) alebo ako konštantná koncentrácia v potrave.

Zjavná toxicita je všeobecný termín opisujúci jasné toxické príznaky po podaní testovanej chemikálie. Tieto príznaky by mali postačovať na posúdenie nebezpečnosti a pri zvýšení podanej dávky by podľa nich malo byť možné predpokladať výskyt závažných toxických príznakov a pravdepodobnej mortality.

Porucha plodnosti predstavuje poruchy samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

Toxicita v prípade matiek znamená nežiaduce účinky na gravidné samice, ktoré sa vyskytujú buď špecificky (priamy účinok), alebo nešpecificky (nepriamy účinok).

NOAEL je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku. Je to najvyššia úroveň dávky, pri ktorej po podaní testovanej chemikálie nie sú pozorované žiadne nepriaznivé nálezy.

Estrogénový účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený estrogénový hormón (napr. estradiol 17ß).

Reprodukčná toxicita predstavuje škodlivé účinky na potomstvo a/alebo poruchu samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

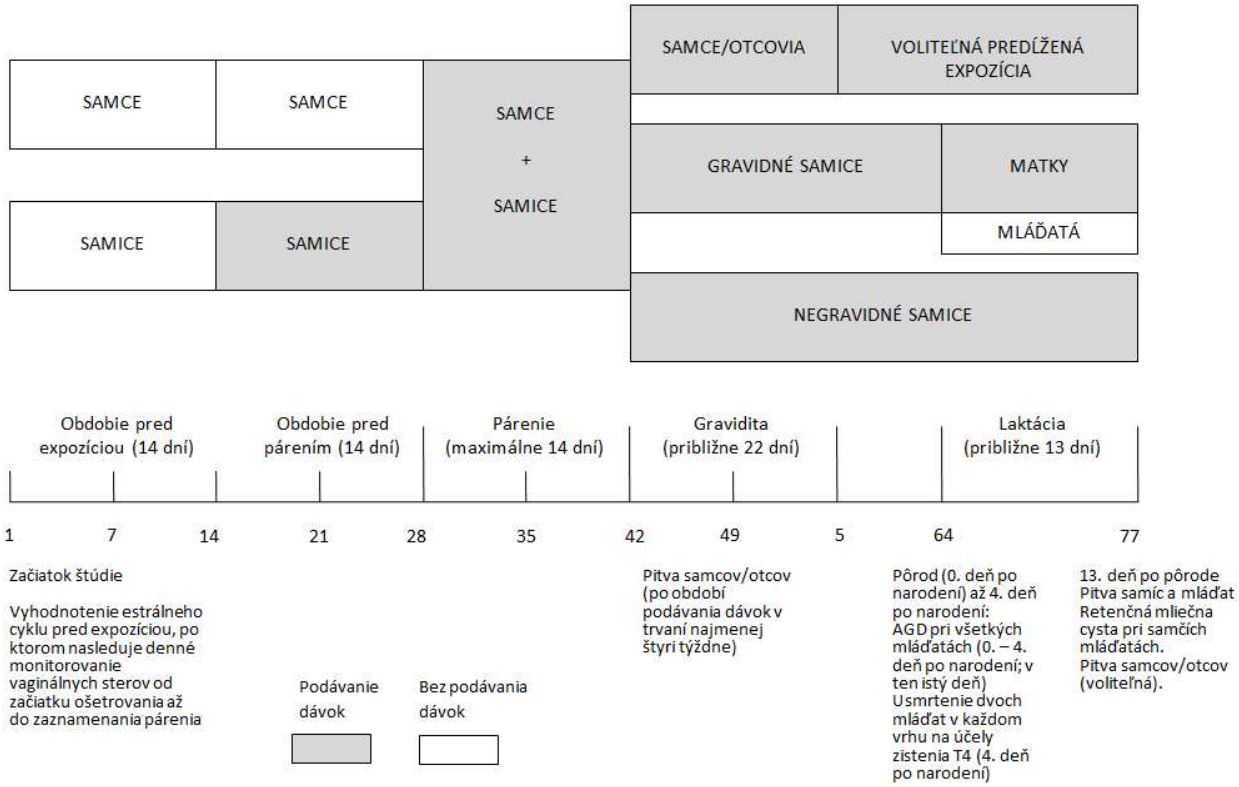
Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Tyreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený hormón štítnej žľazy (napr. T_3).

Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a relevantnosti pre konkrétny účel.

Dodatok 2

SCHÉMA HARMONOGRAMU TESTU ZNÁZORŇUJÚCA MAXIMÁLNE TRVANIE ŠTÚDIE NA ZÁKLADE ÚPLNÉHO 14-DŇOVÉHO OBDOBIA PÁRENIA



Dodatok 3

SÚHRNNÁ SPRÁVA V TABUĽKOVEJ PODOBE O ÚČINKOCH NA REPRODUKCIU/VÝVOJ

POZOROVANIA	HODNOTY				
Dávkovanie (jednotky)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Počet párov na začiatku (N)					
Estrálny cyklus (minimálne stredná dĺžka a frekvencia nepravidelných cyklov)					
Samice vykazujúce známky kopulácie (N)					
Samice, pri ktorých nastala gravidita (N)					
Dni počatia 1 – 5 (N)					
Dni počatia 6 –... ([1]) (N)					
Gravidita ≤ 21 dní (N)					
Gravidita = 22 dní (N)					
Gravidita ≥ 23 dní (N)					
Matky so živonarodenými mláďatami (N)					
Matky so živými mláďatami na 4. deň pp (N)					
Počet implantátov na matku (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku pri narodení (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku na 4. deň (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) pri narodení (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat v čase merania AGD (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach)					

POZOROVANIA	HODNOTY				
Dávkovanie (jednotky)	0 (kontrola)	…	…	…	…
AGD mláďat meraná v rovnaký postnatálny deň, medzi 0. až 4. PND (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach, zaznamenať PND)					
Hmotnosť mláďat na 4. deň (stredná hodnota)					
Retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách na 13. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat na 13. deň (stredná hodnota)					
ABNORMÁLNE MLÁĎATÁ					
Matky s počtom 0					
Matky s počtom 1					
Matky s počtom ≥ 2					
STRATA POTOMSTVA					
Prenatálna/postimplantačná (počet implantátov mínus živonarodené mláďatá)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					
Postnatálna (životnarodené mláďatá mínus živé mláďatá na 13. postnatálny deň)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					

([1]) posledný deň obdobia párenia

B.64 KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKACH SO SKRÍNINGOVÝM TESTOM REPRODUKČNEJ/VÝVOJOVEJ TOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 422 (2016). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok. Pôvodné usmernenie 422 na vykonávanie skríningových testov bolo prijaté v roku 1996 na základe protokolu pre „Kombinovaný skríningový test toxicity po opakovaných dávkach a reprodukčnej/vývojovej toxicity", o ktorom sa diskutovalo na dvoch stretnutiach odborníkov, a to v Londýne v roku 1990 (1) a v Tokiu v roku 1992 (2).

2. Táto testovacia metóda spája časť skríningu reprodukčnej/vývojovej toxicity, ktorá je založená na skúsenostiach získaných v členských krajinách pri používaní pôvodnej metódy v prípade existujúcich chemikálií s vysokým objemom výroby a v prieskumných testoch s látkami, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola (3) (4), a časť zameranú na toxicitu po opakovaných dávkach v súlade s usmernením OECD na vykonávanie testov 407 (28-dňová štúdia orálnej toxicity po opakovaných dávkach pri hlodavcoch; zodpovedá kapitole B.7 tejto prílohy).

3. Táto testovacia metóda bola doplnená o príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, a to v nadväznosti na činnosť s vysokou prioritou, ktorú začala OECD v roku 1998 s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia na vykonávanie testov a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov (5). V tomto kontexte bolo TG 407 (ktoré zodpovedá kapitole B.7 tejto prílohy) v roku 2008 rozšírené o parametre vhodné na určenie endokrinného pôsobenia testovaných chemikálií. Cieľom aktualizácie TG 422 bolo zahrnúť niektoré príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov do TG týkajúcich sa skríningu, kde časy expozície zahŕňajú niektoré z citlivých období počas vývoja (prenatálne alebo skoré postnatálne obdobie).

4. Tieto vybrané dodatočné príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, ktoré sú zároveň súčasťou TG 443 (Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity; zodpovedá kapitole B.56 tejto prílohy) boli zahrnuté do TG 422 na základe štúdie uskutočniteľnosti, ktorá sa týkala vedeckých a technických otázok súvisiacich s ich zaradením, ako aj možných úprav koncepcie testu potrebných na ich zaradenie (6).

5. Táto testovacia metóda je navrhnutá tak, aby sa v nej generovali obmedzené informácie týkajúce sa účinkov testovanej chemikálie na samčiu a samičiu reprodukčnú schopnosť, ako sú funkcie pohlavných žliaz, rozmnožovacie správanie, počatie, vývoj zárodku a pôrod. Nie je alternatívou k existujúcim testovacím metódam B.31, B.34, B.35 alebo B.56, ani ich nenahrádza.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

6. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní toxických charakteristík testovanej chemikálie možno orálnu toxicitu pomocou opakovaných dávok stanoviť po získaní prvotných informácií o toxicite prostredníctvom testovania akútnej toxicity. Táto štúdia poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá môže pravdepodobne vyplynúť z opakovanej expozície počas pomerne obmedzeného časového obdobia. Metóda zahŕňa základnú štúdiu toxicity po opakovaných dávkach, ktorú možno použiť v prípade chemikálií, pri ktorých nie je odôvodnené vykonať 90-dňovú štúdiu (napr. keď objem produkcie neprekračuje určité limity), alebo ju možno použiť ako predbežnú štúdiu k dlhodobej štúdii. Pri vykonávaní štúdie je potrebné sa riadiť zásadami a hľadiskami uvedenými v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o uznávaní, posudzovaní a používaní klinických príznakov ako sledovaných parametrov u ľudí v prípade pokusných zvierat používaných na hodnotenie bezpečnosti (7).

7. Ďalej zahŕňa skríningový test reprodukčnej/vývojovej toxicity, a preto sa môže použiť aj na poskytnutie počiatočných informácií o možných účinkoch na samčiu a samičiu reprodukčnú schopnosť, napríklad na funkciu pohlavných žliaz, rozmnožovacie správanie, počatie, vývoj zárodku a pôrod, a to buď v skorom štádiu posudzovania toxikologických vlastností testovaných chemikálií, alebo informácií o predmetných chemikáliách. Táto testovacia metóda neposkytuje úplné informácie o všetkých aspektoch reprodukcie a vývoja. Predovšetkým ponúka len obmedzené prostriedky na zistenie postnatálnych prejavov prenatálnej expozície alebo na zistenie účinkov, ktoré môžu byť vyvolané počas postnatálnej expozície. V dôsledku (okrem iných dôvodov) selektívnosti sledovaných parametrov a krátkeho trvania štúdie táto metóda neposkytne dôkazy na podloženie konečných záverov o neexistencii reprodukčných/vývojových účinkov. Okrem toho, ak neexistujú údaje z iných testov reprodukčnej/vývojovej toxicity, pozitívne výsledky sú užitočné pri počiatočnom posúdení nebezpečnosti a prispievajú k rozhodnutiam, pokiaľ ide o potrebu a načasovanie ďalšieho testovania.

8. Výsledky získané pomocou parametrov súvisiacich s endokrinným systémom by sa mali posudzovať v kontexte „koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií poškodzujúcich endokrinný systém“ (8). V tomto koncepčnom rámci je rozšírené usmernenie OECD TG 422 obsiahnuté na úrovni 4 ako skúška *in vivo* poskytujúca údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému. Signál endokrinného systému sa však sám osebe nemusí považovať za dostatočný dôkaz, že testovaná chemikália je endokrinným disruptorom.

9. Pri tejto testovacej metóde sa kladie dôraz aj na neurologické účinky ako na osobitný sledovaný parameter, pričom sa zdôrazňuje potreba venovať pozornosť dôsledným klinickým pozorovaniam zvierat, aby sa získalo čo najviac informácií. Pri tejto metóde by sa mal určiť neurotoxický potenciál chemikálií, na základe ktorého možno následne odôvodniť ďalšie podrobné preskúmanie tohto aspektu. Navyše môže táto metóda poskytnúť základné údaje o imunologických účinkoch.

10. Ak neexistujú údaje z iných štúdií systémovej toxicity, reprodukčnej/vývojovej toxicity, neurotoxicity a/alebo imunotoxicity, pozitívne výsledky sú užitočné pri počiatočnom posúdení nebezpečnosti a prispievajú k rozhodnutiam, pokiaľ ide o potrebu a načasovanie ďalšieho testovania. Test môže byť obzvlášť užitočný ako súčasť súboru dostupných údajov charakterizujúcich danú látku (SIDS) OECD na posúdenie existujúcich chemikálií, o ktorých je k dispozícii len málo toxikologických informácií alebo žiadne toxikologické informácie, a môže slúžiť ako alternatíva k vykonaniu dvoch samostatných testov na toxicitu po opakovaných dávkach (OECD TG 407, zodpovedajúce kapitole B.7 tejto prílohy) a na reprodukčnú/vývojovú toxicitu (OECD TG 421, zodpovedajúce kapitole B.63 tejto prílohy). Môže sa použiť aj ako štúdia na zistenie rozsahu dávok pre rozsiahlejšie štúdie o reprodukčnej/vývojovej toxicite, alebo ak sa to inak považuje za relevantné.

11. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že existujú rozdiely v citlivosti medzi gravidnými a negravidnými zvieratami. V dôsledku toho môže byť v tomto kombinovanom teste zložitejšie určiť úrovne dávok, ktoré sú primerané na hodnotenie všeobecnej systémovej toxicity aj špecifickej reprodukčnej/vývojovej toxicity, v porovnaní so situáciou, keď sa jednotlivé testy vykonávajú samostatne. Okrem toho výklad výsledkov testu, pokiaľ ide o všeobecnú systémovú toxicitu, môže byť náročnejší než vtedy, keď sa vykonáva samostatná štúdia toxicity po opakovaných dávkach, najmä keď sa sérové a histopatologické parametre nehodnotia v štúdii súčasne. Vzhľadom na uvedenú technickú zložitosť sú na vykonanie tohto kombinovaného skríningového testu potrebné značné skúsenosti v oblasti testovania toxicity. Na druhej strane môže tento kombinovaný test okrem menšieho počtu použitých zvierat ponúknuť lepšie prostriedky na rozlíšenie priamych účinkov na reprodukciu/vývoj od účinkov, ktoré sú sekundárne k iným (systémovým) účinkom.

12. V tomto teste je obdobie podávania dávok dlhšie než v bežnej 28-dňovej štúdii toxicity po opakovaných dávkach. V porovnaní so situáciou, keď sa popri skríningovom teste reprodukčnej/vývojovej toxicity uskutočňuje bežná 28-dňová štúdia toxicity po opakovaných dávkach, sa však použije menej zvierat z každého pohlavia na skupinu.

13. Pri tejto testovacej metóde sa testovaná chemikália podáva orálne. Ak sa použijú iné spôsoby expozície, môžu sa vyžadovať úpravy.

14. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

15. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

16. Testovaná chemikália sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom by sa mali dávky podávať najmenej štyri týždne až do dňa naplánovaného usmrtenia vrátane tohto dňa (to znamená minimálne dva týždne pred párením, počas obdobia párenia a približne dva týždne po párení). Vzhľadom na obmedzené obdobie podávania dávok pred párením pri samcoch nemôže plodnosť predstavovať osobitný citlivý ukazovateľ testikulárnej toxicity. Z toho dôvodu je dôležité podrobné histologické vyšetrenie

semenníkov. Na zistenie väčšiny účinkov na samčiu plodnosť a spermatogenézu sa za dostatočnú kombináciu považuje spojenie dvojtýždňového obdobia podávania dávok pred párením a následných pozorovaní párenia/plodnosti s najmenej štvortýždňovým celkovým obdobím podávania dávok, po ktorom nasleduje podrobná histopatológia samčích pohlavných žliaz.

17. Samiciam by sa mali podávať dávky počas celej štúdie. To zahŕňa dva týždne pred párením (s cieľom pokryť aspoň dva úplné estrálne cykly), variabilný čas do počatia, trvanie gravidity a najmenej trinásť dní po pôrode až do dňa pred naplánovaným usmrtením vrátane tohto dňa.

18. Trvanie štúdie – po aklimatizácii a vyhodnotení estrálneho cyklu pred začatím podávania dávok – závisí od stavu samice a má dĺžku približne 63 dní [najmenej 14 dní pred obdobím párenia, (do) 14 dní obdobia párenia, 22 dní gravidity, 13 dní laktácie].

19. Počas obdobia podávania sa zvieratá dôkladne pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť toxických príznakov. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

20. Táto testovacia metóda je určená na použitie s potkanmi. Ak sa parametre uvedené v rámci tohto TG 422 skúmajú pri inom druhu hlodavcov, je potrebné uviesť podrobné odôvodnenie. V rámci medzinárodného programu overovania na zistenie endokrinných disruptorov v TG 407 sa použili iba potkany. Kmene s nízkou plodnosťou alebo kmene, o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, by sa nemali používať. Mali by byť použité zdravé panenské zvieratá, ktoré dosiaľ neboli predmetom žiadnych testov. Pokusné zvieratá by mali byť charakterizované, pokiaľ ide o druh, kmeň, pohlavie, hmotnosť a vek. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita použitých zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ±20 % strednej hmotnosti každého pohlavia. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná štúdia k dlhodobej alebo celogeneračnej štúdii, je lepšie v oboch štúdiách použiť zvieratá toho istého druhu a z toho istého zdroja.

Umiestnenie a kŕmenie

21. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala dosahovať minimálne 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala presiahnuť 70 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom.

22. Zvieratá by mali byť umiestnené spolu v malých skupinách rovnakého pohlavia. Ak je to vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne. Pokiaľ ide o umiestnenie skupín do klietok, v jednej klietke by nemalo byť viac ako päť zvierat. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Gravidné samice by mali byť jednotlivo umiestnené do klietok a mal by sa im poskytnúť materiál na tvorbu hniezda. Samice v laktácii sa jednotlivo umiestnia do klietok so svojím potomstvom.

23. Krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty. Vzorka krmiva by sa mala zachovať až do dokončenia správy.

Príprava zvierat

24. Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia a priradia sa do pokusných skupín a jednotlivých klietok. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa v klietkach aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

Príprava dávok

25. Odporúča sa, aby sa testovaná chemikália podávala orálne, pokiaľ sa iná cesta podania nepokladá za vhodnejšiu. Keď sa zvolí orálna cesta, testovaná chemikália sa obvykle podáva sondou. Alternatívne sa však testované chemikálie môžu podávať aj v krmive alebo pitnej vode.

26. V prípade potreby sa testovaná chemikália rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričnom oleji) a nakoniec použitie prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre iné nosiče ako voda majú byť známe toxické vlastnosti nosiča. Mala by sa určiť stabilita a homogenita testovanej chemikálie v nosiči.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

27. Odporúča sa, aby každá skupina začala najmenej s 10 samcami a 12 – 13 samicami. Pri samiciach sa pred expozíciou vyhodnotí estrálny cyklus a zvieratá, ktoré nevykazujú príznačné 4 – 5-dňové cykly, nebudú zaradené do štúdie. Preto sa odporúča viac samíc, aby na skupinu pripadalo 10 samíc. Očakáva sa, s výnimkou prípadov výrazných toxických účinkov, že takto sa dosiahne počet najmenej 8 gravidných samíc na skupinu, čo je obvykle minimálny prijateľný počet gravidných samíc na skupinu. Cieľom je dosiahnuť dostatočný počet gravidných samíc a potomkov, aby sa zabezpečilo zmysluplné hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie pôsobiť na plodnosť, graviditu, materské a dojčenské správanie, ako aj na rast a vývoj potomstva generácie F_1 od počatia do 13. dňa po pôrode. Ak sa plánuje usmrtenie zvierat v priebehu štúdie, ich počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené pred kompletizáciou štúdie. Treba zvážiť použitie ďalšej satelitnej skupiny piatich zvierat z každého pohlavia ku kontrolnej skupine a k skupine vystavenej najvyššej dávke na účely pozorovania vratnosti, perzistencie alebo oneskorenia systémových toxických účinkov, a to najmenej počas 14 dní po ošetrení. Zvieratá zo satelitnej skupiny sa nebudú páriť, a teda nebudú použité na posúdenie reprodukčnej/vývojovej toxicity.

Dávkovanie

28. Bežne sa používajú tri testované skupiny a jedna kontrolná skupina. Ak nie sú k dispozícii vhodné všeobecné údaje o toxicite, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávok (zvieratá toho istého kmeňa a z toho istého zdroja), aby sa ľahšie stanovili dávky, ktoré sa použijú. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

29. Pri výbere úrovní dávok by sa mali brať do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike. Okrem toho by sa malo vziať do úvahy, že môžu existovať rozdiely v citlivosti medzi gravidnými a negravidnými samicami. Najvyššia úroveň dávky sa vyberie tak, aby vyvolala toxické účinky, ale nespôsobila uhynutie zvierat ani zjavné utrpenie. Potom sa klesajúca postupnosť úrovní dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá odozva na dávku a stanovila sa najnižšia úroveň dávky, pri ktorej nevznikajú žiadne nežiaduce účinky. Často sú na to optimálne intervaly predstavujúce dvoj- až štvornásobok, pričom pridanie štvrtej testovanej skupiny je často vhodnejšie než použitie veľmi veľkých intervalov medzi dávkami (napr. viac než 10-násobku).

30. Ak sa pozoruje všeobecná toxicita (napr. zníženie telesnej hmotnosti, účinky na pečeň, srdce, pľúca alebo obličky atď.) alebo iné zmeny, ktoré nemusia byť toxikologickou reakciou (napr. nižší príjem potravy, zväčšenie pečene), pri interpretácii pozorovaných účinkov na endokrinné citlivé sledované parametre je potrebné postupovať obozretne.

Limitný test

31. Ak sa v orálnej štúdii s jednou úrovňou dávky dosahujúcou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo, v prípade podávania v krmive, pri rovnakom percentuálnom podiele v krmive alebo pitnej vode (na základe hodnôt podľa telesnej hmotnosti) s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu neprejavia žiadne pozorovateľné toxické účinky a ak sa vzhľadom na údaje o štrukturálne príbuzných látkach toxicita neočakáva, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie zahŕňajúcej viaceré úrovne dávok. Limitný test sa neuplatňuje vtedy, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu dávku. V prípade iných ciest podania, napr. pri inhalácii alebo dermálnej aplikácii, môžu maximálnu dosiahnuteľnú expozíciu často určovať fyzikálno-chemické vlastnosti testovaných chemikálií.

Podávanie dávok

32. Zvieratám sa podáva testovaná chemikália každý deň, 7 dní v týždni. Ak je testovaná chemikália podávaná cez sondu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť objem

2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých testovaných chemikálií, ktoré pri vyšších koncentráciách zvyčajne spôsobujú zhoršenie účinkov, by sa variabilita v aplikovanom objeme mala minimalizovať tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem pri všetkých úrovniach dávok.

33. V prípade podávania testovaných chemikálií v krmive alebo pitnej vode je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej chemikálie nenarúšalo normálnu nutričnú alebo vodnú rovnováhu. Keď sa testovaná chemikália podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm), alebo stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; iné možnosti by sa mali špecifikovať. V prípade podávania testovanej chemikálie pomocou sondy sa príslušná dávka podáva každý deň približne v rovnakom čase a aspoň raz za týždeň sa upraví, aby sa zachovala stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat. Ak sa kombinovaná štúdia použije ako predbežná štúdia k dlhodobej štúdii alebo úplnej štúdii o reprodukčnej toxicite, v obidvoch štúdiách sa použije rovnaké krmivo.

Harmonogram testu

34. Podávanie dávky obom pohlaviam by sa malo začať dva týždne pred párením, pričom najskôr sa zvieratá najmenej päť dní aklimatizujú a vykoná sa skríning samíc na účely zistenia normálnych estrálnych cyklov (v 2-týždňovom období pred aplikáciou chemikálie). Štúdia by sa mala naplánovať tak, aby sa hodnotenie estrálneho cyklu začalo tesne po dosiahnutí úplnej pohlavnej zrelosti zvierat. To sa v prípade rôznych kmeňov potkanov v rôznych laboratóriách môže mierne líšiť, napr. pri potkanoch z kmeňa Sprague Dawley je to vo veku 10 týždňov a pri potkanoch z kmeňa Wistar približne vo veku 12 týždňov. Matky s potomstvom by mali byť usmrtené 13. deň po pôrode alebo krátko po tomto dni. V prípade, že je potrebné, aby sa matkám noc pred odberom krvi nepodávala potrava (ak sa uprednostňuje táto možnosť), nemusia byť matky a ich potomstvo nevyhnutne usmrtené v ten istý deň. Deň narodenia (t. j. deň ukončenia pôrodu) sa označuje ako 0. deň po pôrode. Samice, pri ktorých sa nezaznamená kopulácia, sú usmrtené 24 – 26 dní od posledného dňa obdobia párenia. Podávanie dávky pokračuje pri oboch pohlaviach počas obdobia párenia. Samcom sa dávka ďalej podáva po období párenia aspoň do skončenia minimálneho 28-dňového celkového obdobia podávania dávok. Potom sa usmrtia, prípadne sa uchovajú a naďalej sa im podáva dávka na účely možného druhého párenia, ak sa to považuje za vhodné.

35. Denné podávanie dávok rodičovským samiciam by malo pokračovať v priebehu gravidity a najmenej do 13. dňa (vrátane) po pôrode alebo do dňa pred usmrtením. V prípade štúdií, pri ktorých sa testovaná chemikália podáva inhaláciou alebo transdermálne, by podávanie dávky malo pokračovať najmenej do 19. dňa gravidity (vrátane) a podávanie dávky by sa malo čo najskôr obnoviť – najneskôr na 4. postnatálny deň (PND).

36. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, ak sú zahrnuté, sa nepária. Mali by sa uchovať najmenej ďalších 14 dní po prvom naplánovanom usmrtení matiek, bez expozície, aby bolo možné zistiť oneskorený výskyt, pretrvávanie toxických príznakov alebo zotavenie sa z nich.

37. Schéma harmonogramu testu je uvedená v dodatku 2.

Estrálne cykly

38. Estrálne cykly sa monitorujú pred začatím ošetrenia s cieľom vybrať do štúdie samice s pravidelnými cyklami (pozri odsek 27). Od začiatku obdobia ošetrenia až do zaznamenania párenia sa denne monitorujú aj vaginálne stery. Ak existujú obavy z akútnych stresových účinkov, ktoré by mohli zmeniť estrálne cykly po začatí podávania dávok, laboratóriá môžu použiť expozíciu pokusných zvierat počas 2 týždňov, potom denne odoberať vaginálne stery na monitorovanie estrálneho cyklu najmenej dva týždne počas obdobia pred párením a pokračovať s monitorovaním až do obdobia párenia, až kým sa nezaznamená párenie. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné dbať na to, aby sa neporušila sliznica, čo by mohlo vyvolať pseudograviditu (8) (9).

Párenie

39. V tejto štúdii sa bežne používajú pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica). Výnimky sa môžu vyskytnúť v prípade príležitostných úmrtí samcov. Samica sa má nachádzať v prítomnosti toho istého samca, kým sa nezaznamená kopulácia alebo kým neuplynú dva týždne. Každé ráno sa samice vyšetria na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, keď sa potvrdí dôkaz o párení (zistí sa prítomnosť vaginálnej zátky alebo spermy). V prípade neúspešného párenia sa zváži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou.

Veľkosť vrhu

40. Na 4. deň po narodení možno upraviť veľkosť jednotlivých vrhov odstránením prebytočných mláďat náhodným výberom, aby sa v čo najväčšej miere dosiahli vrhy so štyrmi alebo piatimi mláďatami z každého pohlavia v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov. Z dvoch prebytočných mláďat sa odoberú vzorky krvi, ktoré sa zlúčia a použijú na určenie hladín hormónu T4 v sére. Nie je vhodné selektívne odstraňovanie mláďat, napríklad na základe telesnej hmotnosti alebo anogenitálnej vzdialenosti (AGD). Ak vzhľadom na počet samčích alebo samičích mláďat nemožno dospieť k tomu, aby každý vrh tvorilo štyri až päť mláďat z každého pohlavia, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad šesť samcov a štyri samice). Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod cieľovú hodnotu na utratenie (8 alebo 10 mláďat/vrh). Ak sa cieľová hodnota na utratenie prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

41. Ak sa veľkosť vrhu neupraví, 4. deň po narodení sa usmrtia dve mláďatá v každom vrhu a odoberú sa vzorky krvi na meranie koncentrácií hormónu štítnej žľazy v sére. Ak je to možné, uvedené dve mláďatá v každom vrhu by mali byť samice, aby bolo možné vyhradiť samčie mláďatá na vyhodnotenie vzniku retenčnej mliečnej cysty. Neplatí to však v prípade, keď by po odstránení týchto mláďat neostali žiadne samice na posúdenie po usmrtení. Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod 8 alebo 10 mláďat/vrh (v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov). Ak sa bežná veľkosť vrhu prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

Pozorovania

42. Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania, najlepšie každý deň v rovnakom čase a so zreteľom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Zaznamenáva sa zdravotný stav zvierat. Je potrebné aspoň dvakrát denne sledovať chorobnosť a úmrtnosť zvierat.

43. Raz pred prvou expozíciou (aby bolo možné porovnanie jednotlivých zvierat medzi sebou) a potom najmenej raz týždenne sa uskutočňujú pri všetkých rodičovských zvieratách podrobné klinické pozorovania. Uskutočňujú sa mimo domovských klietok v štandardnom priestore, pokiaľ možno v jednotlivé dni vždy v tom istom čase. Musia byť pozorne zaznamenané, podľa možnosti s použitím hodnotiaceho systému explicitne definovaného testovacím laboratóriom. Je potrebné zaistiť čo najmenšie zmeny podmienok testovania a pozorovania má podľa možnosti viesť pozorovateľ, ktorý nie je oboznámený s postupom testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), pričom uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny chôdze, držania tela a reakcie na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť klonických alebo tonických pohybov, stereotypné správanie (napr. nadmerné čistenie sa, opakované točenie sa), náročný alebo dlhý pôrod alebo zvláštne správanie (napr. samozmrzačovanie, chôdza dozadu) sa takisto musia zaznamenať (10).

44. Jedenkrát počas štúdie sa na piatich samcov a piatich samiciach náhodne vybratých z každej skupiny uskutoční hodnotenie senzorickej reaktivity na rôznorodé podnety (napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety) (8) (9) (11), hodnotenie sily zovretia (12) a hodnotenie motorickej aktivity (13). Ďalšie podrobnosti o postupoch, podľa ktorých možno postupovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané. Pri samcoch sa tieto funkčné pozorovania majú uskutočniť ku koncu obdobia podávania dávok, krátko pred plánovaným usmrtením, avšak pred odberom vzoriek krvi na účely hematológie alebo klinickej chémie (pozri odseky 53 – 56 vrátane poznámky pod čiarou č. 1). Počas týchto funkčných testov majú byť samice vo fyziologicky podobnom stave a podľa možnosti sa majú testovať raz počas posledného týždňa laktácie (t. j. 6. – 13. deň laktácie), krátko pred plánovaným usmrtením. V čo najväčšej možnej miere je potrebné minimalizovať čas odlúčenia matiek a mláďat.

45. Funkčné pozorovania uskutočňované raz ku koncu štúdie možno vynechať, ak sa štúdia uskutočňuje ako predbežná štúdia k následnej (90-dňovej) štúdii subchronickej toxicity alebo dlhodobej štúdii. V tomto prípade sa funkčné pozorovania uskutočnia v nasledujúcej štúdii. Na druhej strane, dostupnosť údajov o funkčných pozorovaniach z tejto štúdie toxicity po opakovanej dávke môže zvýšiť možnosť výberu úrovní dávok v nasledujúcej štúdii subchronickej toxicity alebo dlhodobej štúdii.

46. Výnimočne sa nemusia uskutočniť funkčné pozorovania ani pri skupinách, v ktorých sa inak preukážu toxické príznaky v takom rozsahu, že by mohli významne interferovať s uskutočnením funkčných testov.

47. Trvanie gravidity sa zaznamená a počíta sa od jej 0. dňa. Každý vrh je potrebné čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť počet a pohlavie mláďat, mŕtvonarodených, živonarodených a nevyvinutých jedincov (mláďat, ktoré sú výrazne menšie než príslušné mláďatá z kontrolnej skupiny) a prítomnosť výrazných abnormalít.

48. Živé mláďatá sa spočítajú, určí sa ich pohlavie a do 24 hodín po narodení (0. alebo 1. deň po narodení) a následne najmenej na 4. a 13. deň po narodení sa určí ich telesná hmotnosť. Okrem pozorovaní rodičovských zvierat (pozri odseky 43 a 44) sa zaznamená aj akékoľvek abnormálne správanie potomstva.

49. V ten istý deň medzi 0. až 4. postnatálnym dňom sa zmeria anogenitálna vzdialenosť (AGD) každého mláďaťa. V deň merania AGD sa zisťuje aj telesná hmotnosť mláďaťa, pričom sa AGD štandardizuje na mieru veľkosti mláďaťa, najlepšie na tretiu odmocninu telesnej hmotnosti (14). Na 12. alebo 13. postnatálny deň sa určí počet bradaviek/areol pri samčích mláďatách, ako sa odporúča v usmerňovacom dokumente OECD č. 151 (15).

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

50. Samce a samice sa odvážia v prvý deň podávania dávok, potom najmenej raz týždenne a následne pri usmrtení. Počas gravidity sa samice odvážia na 0., 7., 14. a 20. deň a do 24 hodín po pôrode (0. alebo 1. deň po pôrode) a najmenej na 4. a 13. deň po pôrode. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera.

51. V období pred párením, počas gravidity a laktácie sa spotreba potravy meria najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy počas párenia je voliteľné. Počas týchto období sa meria aj spotreba vody, ak sa testovaná chemikália podáva prostredníctvom tohto média.

Hematológia

52. Jedenkrát počas štúdie sa pri piatich samcoch a piatich samiciach náhodne vybratých z každej skupiny uskutočňujú tieto hematologické vyšetrenia: hematokrit, koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, retikulocyty, celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet trombocytov a meranie času/potenciálu zrážanlivosti krvi. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré sa uskutočňujú, ak testovaná chemikália alebo jej predpokladané metabolity majú oxidačné vlastnosti alebo ak existuje podozrenie, že majú oxidačné vlastnosti, patrí koncentrácia methemoglobínu a Heinzove telieska.

53. Vzorky krvi sa odoberajú z označeného miesta. Počas odberu vzoriek majú byť samice vo fyziologicky podobnom stave. S cieľom predchádzať praktickým ťažkostiam spojeným s variabilitou začiatku gravidity sa môže odber krvi pri samiciach uskutočniť na konci obdobia pred párením ako alternatíva k odberu vzoriek tesne pred postupom usmrtenia zvierat alebo počas neho. Vzorky krvi samcov sa majú podľa možnosti odoberať tesne pred postupom usmrtenia zvierat alebo počas neho. Odber krvi pri samcoch sa môže prípadne uskutočniť aj na konci obdobia pred párením, ak sa tento čas uprednostnil v prípade samíc.

54. Vzorky krvi je potrebné uchovávať za vhodných podmienok.

Klinická biochémia

55. Na vzorkách krvi získaných od vybratých piatich samcov a piatich samíc z každej skupiny sa uskutočnia stanovenia v rámci klinickej biochémie s cieľom skúmať hlavné toxické účinky na tkanivá a osobitne účinky na pečeň a obličky. Odporúča sa, aby sa zvieratám cez noc pred odobratím vzoriek krvi nepodávala potrava ([1]). Vyšetrenie plazmy alebo séra zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkový obsah bielkovín a albumínu, najmenej dva enzýmy indikujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza a sorbitol-dehydrogenáza) a žlčové kyseliny. Meranie ďalších enzýmov (hepatálneho alebo iného pôvodu) a bilirubínu môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie.

56. Vzorky krvi sa odoberajú z určeného miesta na základe tohto harmonogramu:

— najmenej dvom mláďatám na vrh na 4. deň po narodení, ak to umožňuje počet mláďat (pozri odseky 40 – 41),

— všetkým matkám a najmenej dvom mláďatám na vrh pri usmrtení na 13. deň a

— všetkým dospelým samcom pri usmrtení.

Všetky vzorky krvi sa uchovávajú za vhodných podmienok. Vzorky krvi mláďat z 13. dňa a dospelých samcov sa posudzujú, pokiaľ ide o hladiny hormónov štítnej žľazy (T4) v sére. Ak je to relevantné, vykoná sa ďalšie posúdenie T4 vo vzorkách krvi matiek a mláďat zo 4. dňa. V relevantných prípadoch možno voliteľne vykonať meranie iných hormónov. Na účely analýzy hormónov štítnej žľazy možno krv mláďat zlúčiť v rámci vrhu. Hormóny štítnej žľazy (T4 a TSH) sa majú podľa možnosti merať ako celková hodnota.

([1]) Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä v prípade glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a k sťaženiu interpretácie. Na druhej strane však celonočné neprijímanie potravy môže interferovať so všeobecným metabolizmom (gravidných) zvierat, narúša laktáciu a správanie pri starostlivosti o mláďatá a predovšetkým v štúdiách, v ktorých sa dávky podávajú v krmive, môže narušiť denné pôsobenie testovanej chemikálie. Ak sa použije celonočné nepodávanie potravy, klinicko-biochemické stanovenia sa v prípade samcov uskutočňujú po funkčných pozorovaniach v štvrtom týždni štúdie. Matky sa zachovajú ešte jeden deň navyše po odobratí mláďat, napríklad na 13. postnatálny deň. Matkám sa medzi 13. a 14. dňom laktácie celonočne nepodáva potrava a krv odobratá pri usmrtení sa použije na určenie parametrov klinickej chémie.

57. Voliteľne možno počas posledného týždňa štúdie vykonať rozbor moču piatich náhodne vybratých samcov z každej skupiny, pričom sa použije časový zber objemu moču, na stanovenie týchto parametrov: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická hmotnosť, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

58. Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrovanie sérových markerov všeobecného poškodenia tkaniva. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré sa uskutočňujú, ak známe vlastnosti testovanej chemikálie môžu ovplyvňovať alebo existuje podozrenie, že ovplyvňujú príbuzné metabolické profily, patrí stanovenie vápnika, fosfátu, hladiny triglyceridov nalačno a glykémie nalačno, špecifických hormónov, methemoglobínu a cholínesterázy. Tieto prípady je potrebné identifikovať jednotlivo.

59. Variabilitu a absolútne koncentrácie hormonálnych ukazovateľov môžu ovplyvniť tieto faktory:

— čas usmrtenia z dôvodu každodennej zmeny koncentrácií hormónov,

— metóda usmrtenia s cieľom zabrániť neprimeranému stresu pre zvieratá, ktorý môže ovplyvniť koncentrácie hormónov,

— súpravy na testovanie hormonálnych ukazovateľov, ktoré sa môžu líšiť štandardnými krivkami.

60. Vzorky plazmy osobitne určené na stanovenie hladiny hormónov sa odoberú počas porovnateľných denných časov. Číselné hodnoty získané analýzou koncentrácií hormónov sa v prípade použitia rozličných komerčne dostupných testovacích súprav líšia.

61. Ak sú historické bazálne hodnoty nevhodné, zváži sa stanovenie premenných v oblasti hematológie a klinickej biochémie pred začatím dávkovania alebo podľa možnosti na skupine zvierat, ktoré neboli zaradené do pokusných skupín. V prípade samíc musia údaje pochádzať z dojčiacich zvierat.

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

62. Všetky dospelé zvieratá v štúdii budú predmetom úplnej detailnej makroskopickej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Je potrebné zaznamenať počet implantačných miest. V deň pitvy sa vyšetria vaginálne stery, aby sa určilo štádium estrálneho cyklu a umožnilo určenie korelácie s histopatológiou v reprodukčných orgánoch samíc.

63. Semenníky a nadsemenníky, ako aj prostata a semenné mechúriky s koagulačnými žľazami ako celok všetkých dospelých zvierat sa podľa potreby zbavia priľahlých tkanív a čo najskôr po disekcii sa určí ich vlhká hmotnosť, kým orgány nevyschnú. Okrem toho možno voliteľne určiť hmotnosť orgánov, ako je komplex zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov, Cowperove žľazy a žaluď pri samcoch a párové vaječníky (vlhká hmotnosť) a maternica (vrátane krčka maternice) pri samiciach. V prípade zahrnutia týchto orgánov je potrebné určiť ich hmotnosť čo najskôr po disekcii. Zachovať sa majú vaječníky, semenníky, nadsemenníky, akcesórne pohlavné orgány, ako aj všetky orgány vykazujúce makroskopické lézie zo všetkých dospelých zvierat.

64. Zo všetkých dospelých samcov a samíc a z jedného samčieho a jedného samičieho mláďaťa z 13. dňa z každého vrhu sa má zachovať štítna žľaza v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na neskoršie zamýšľané histopatologické vyšetrenie. Hmotnosť štítnej žľazy sa môže určiť po fixácii. Orezanie je potrebné vykonať veľmi opatrne a až po fixácii, aby sa predišlo poškodeniu tkaniva. Poškodenie tkaniva by mohlo ohroziť histopatologickú analýzu. Vzorky krvi sa odoberajú zo stanoveného miesta tesne pred postupom usmrtenia zvierat alebo počas tohto postupu a uchovávajú sa za vhodných podmienok (pozri odsek 56).

65. Okrem toho sa najmenej pri piatich dospelých samcoch a samiciach náhodne vybratých z každej skupiny (okrem moribundných a/alebo usmrtených pred ukončením štúdie) z pečene, obličiek, nadobličiek, týmusu, zo sleziny, z mozgu a zo srdca podľa možnosti odstráni všetko priľahlé tkanivo a ich vlhká hmotnosť sa zaznamená čo najskôr po disekcii, kým orgány nevyschnú. Tieto tkanivá sa uchovávajú v čo najvhodnejšom fixačnom médiu vzhľadom na typ tkanív a neskoršie zamýšľané histopatologické vyšetrenie: všetky makroskopické lézie, mozog (reprezentatívne oblasti vrátane veľkého mozgu, mozočka a mosta), miecha, oko, žalúdok, tenké a hrubé črevo (vrátane Peyerových plakov), pečeň, obličky, nadobličky, slezina, srdce, týmus, priedušnica a pľúca (uskladnené nafúknutím s fixačným prostriedkom a potom ponorením), gonády (semenníky a vaječníky), akcesórne pohlavné orgány (maternica a krčok maternice, nadsemenníky, prostata, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami), vagína, močový mechúr, lymfatické uzliny [okrem najbližšej odvodňovacej uzliny by sa mala odobrať ešte jedna lymfatická uzlina podľa praxe laboratória (16)], periférny nerv (sedací alebo tibiálny) podľa možnosti čo najbližšie k svalu, kostrový sval a kosť, s kostnou dreňou (prierez alebo čerstvo odobratá vzorka kostnej drene). Odporúča sa fixovať semenníky ponorením do Bouinovho fixačného prostriedku alebo modifikovaného Davidsonovho fixačného prostriedku (16) (17) (18);

pre tieto tkanivá sa neodporúča fixácia formalínom. Obal *tunica albuginea* sa môže opatrne a plytko prepichnúť ihlou na oboch stranách orgánu, aby sa umožnilo rýchle napustenie fixačným prostriedkom. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány.

66. Tieto tkanivá môžu poskytnúť cenné údaje o účinkoch na endokrinný systém: gonády (vaječníky a semenníky), akcesórne pohlavné orgány (maternica vrátane krčka maternice, nadsemenníky, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami, dorzolaterálna a ventrálna prostata), vagína, hypofýza, samčia prsná žľaza a nadoblička. Zmeny na samčích prsných žľazách nie sú dostatočne zdokumentované, ale tento parameter môže byť veľmi citlivý na látky s estrogénovým pôsobením. Skúmanie orgánov/tkanív, ktoré nie sú uvedené v odseku 65, je voliteľné.

67. Mŕtve mláďatá a mláďatá usmrtené na 13. deň po narodení alebo krátko po tomto dni je potrebné prinajmenšom dôkladne preskúmať zvonku na účely zistenia výrazných abnormalít. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť vonkajším reprodukčným pohlavným orgánom, ktoré by sa mali vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji.

Histopatológia

68. Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách vybratých zvierat v kontrolnej skupine a v skupine s vysokými dávkami (s osobitným dôrazom na štádiá spermatogenézy v samčích gonádach a histopatológiu štruktúry intersticiálnych buniek semenníkov). V prípade potreby sa môže vyšetriť štítna žľaza mláďat a zvyšných dospelých zvierat. Ak sa v skupine s vysokou dávkou zistia zmeny súvisiace s ošetrením, tieto vyšetrenia sa aplikujú aj pri zvieratách zo skupín s odlišnou úrovňou dávok. V usmernení o histopatológii (10) sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o disekcii, fixácii, vykonávaní rezov a histopatológii endokrinných tkanív.

69. Všetky závažné lézie je potrebné preskúmať. S cieľom pomôcť pri stanovení úrovní NOAEL je potrebné vyšetriť cieľové orgány v skupinách s odlišnou úrovňou dávok, obzvlášť v skupinách, v ktorých sa uvádza úroveň NOAEL.

70. Ak sa použila satelitná skupina, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch, pri ktorých boli v ošetrených skupinách zistené účinky.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

71. Uvádzajú sa údaje o jednotlivých zvieratách. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v tabuľkovej podobe, kde sa pre každú testovanú skupinu uvedie počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo usmrtenia, počet plodných zvierat, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, opis zistených toxických príznakov vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy histopatologických zmien a všetky relevantné údaje, ktoré sa týkajú vrhu. V dodatku 3 sa uvádza formát súhrnnej správy v tabuľkovej podobe, ktorý sa ukázal ako veľmi užitočný na hodnotenie reprodukčných a vývojových účinkov.

72. Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Porovnávanie účinkov podľa rozsahu dávok má zamedziť používaniu opakovaných t-testov. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas plánovania štúdie. Štatistická analýza AGD a retenčnej mliečnej cysty vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách, pričom sa zohľadňujú vplyvy spojené s vrhom. Ak je to vhodné, jednotkou analýzy je vrh. Štatistická analýza telesnej hmotnosti mláďaťa vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách s prihliadnutím na veľkosť vrhu. Vzhľadom na obmedzené rozmery štúdie majú štatistické analýzy vo forme testov „významnosti" obmedzenú hodnotu v prípade mnohých sledovaných parametrov, najmä reprodukčných sledovaných parametrov. Niektoré z najčastejšie používaných metód, obzvlášť parametrické testy na meranie strednej tendencie, nie sú vhodné. Ak sa použijú štatistické analýzy, vybraná metóda by mala byť vhodná na distribúciu skúmanej premennej a mala by sa zvoliť pred začiatkom štúdie.

Vyhodnotenie výsledkov

73. Zistenia z tejto štúdie toxicity sa majú vyhodnotiť na základe zistených účinkov, pitvy a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahŕňať vzťah medzi dávkou testovanej chemikálie a prítomnosťou alebo absenciou abnormalít, početnosťou ich výskytu, ako aj ich závažnosťou, a to vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, neplodnosti, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a akýchkoľvek iných toxických účinkov.

74. Z dôvodu krátkeho obdobia ošetrovania samca je pri posudzovaní účinkov na reprodukčnú schopnosť samcov potrebné zvážiť histopatológiu semenníkov a nadsemenníkov spolu s údajmi o plodnosti. Ako pomôcka pri interpretácii štúdie môže byť užitočné aj použitie historických údajov o reprodukcii/vývoji z kontrolných skupín (napr. pokiaľ ide o veľkosť vrhu, AGD, retenčnú mliečnu cystu, hladiny T4 v sére), ak sú k dispozícii.

75. Na účely kontroly kvality sa navrhuje, aby sa zozbierali historické údaje z kontrolných skupín a aby sa vypočítali variačné koeficienty pre číselné údaje, najmä pre parametre spojené s detekciou endokrinného disruptora. Tieto údaje sa môžu použiť pre porovnanie, keď sa vyhodnocujú jednotlivé štúdie.

Správa o teste

76. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu,

— odôvodnenie výberu druhu, ak je iný ako potkan.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— údaje o zložení testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak sa uplatňuje,

— podrobné údaje o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis postupu randomizácie na výber mláďat na utratenie, ak boli utratené.

Výsledky:

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak sa uplatňuje,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach a dávkach vrátane plodnosti, gravidity a akýchkoľvek iných

— toxických príznakov

— dĺžka gravidity, toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (údaje o tom, či sú účinky vratné alebo nevratné),

— hodnotenie senzorickej aktivity, sily zovretia a motorickej aktivity,

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— testy klinickej biochémie s významnými základnými hodnotami,

— počet dospelých samíc s normálnym alebo abnormálnym estrálnym cyklom a trvanie cyklu,

— počet živonarodených zvierat a straty po implantácii,

— počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, všeobecné hodnotenie vonkajších pohlavných orgánov, počet nevyvinutých jedincov,

— čas uhynutia počas štúdie alebo údaj, či zvieratá prežili do usmrtenia,

— počet implantátov, veľkosť vrhu a hmotnosť vrhu v čase zaznamenávania,

— údaje o telesnej hmotnosti mláďat,

— AGD všetkých mláďat (a telesná hmotnosť v deň merania AGD),

— retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách,

— hladiny hormónov štítnej žľazy pri mláďatách na 13. deň a dospelých samcoch (a pri matkách a mláďatách na 4. deň, ak sa uskutočnilo meranie),

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o hmotnosti orgánov rodičov,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis histopatologických pozorovaní,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Rozbor výsledkov.

Závery.

Interpretácia výsledkov

77. Štúdia umožní hodnotenia reprodukčnej/vývojovej toxicity v súvislosti s podávaním opakovaných dávok. Keďže dôraz sa kladie na sledované parametre všeobecnej toxicity, ako aj reprodukčnej/vývojovej toxicity, výsledky štúdie predovšetkým umožnia rozlíšenie medzi účinkami na reprodukciu/vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity, a účinkami, ktoré sa prejavujú iba pri dávkach, ktoré sú toxické aj pre rodičovské zvieratá (pozri odseky 7 – 11). Mohlo by to naznačovať potrebu ďalšieho dokazovania a poskytnúť usmernenie pri návrhu ďalších štúdií. Pri interpretácii výsledkov skúmania reprodukcie a vývoja by sa malo nahliadnuť do usmerňovacieho dokumentu OECD 43 (19). V usmerňovacom dokumente OECD č. 106 o histologickom hodnotení endokrinných a reprodukčných testov pri hlodavcoch (16) sa uvádzajú informácie o príprave a hodnotení (endokrinných) orgánov a vaginálnych sterov, ktoré môžu byť užitočné pre túto testovaciu metódu.

LITERATÚRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) OECD (1992). *Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods*, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). *Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*. J. Toxicol, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). *Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide*. Fundam. Appl. Toxicol., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). *Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force*, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OECD (2015). *Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies*, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). *Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). *A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice*. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). *Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments*. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). *„Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights"*, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009). *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). *Histological Methods for the Evaluation of the Testis*. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, s. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). *Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid*. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV [POZRI AJ USMERŇOVACÍ DOKUMENT OECD Č. 150 (20)]

Androgénny účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený androgénny hormón (napr. testosterón).

Antiandrogénny účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného androgénneho hormónu (napr. testosterónu).

Antiestrogénový účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného estrogénového hormónu (napr. estradiolu 17ß).

Antityreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného hormónu štítnej žľazy (napr. T_3).

Chemikália je látka alebo zmes.

Vývojová toxicita je prejav reprodukčnej toxicity predstavujúci prenatálne, perinatálne, postnatálne, štrukturálne alebo funkčné poruchy potomstva.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvieraťa za deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň) alebo ako konštantná koncentrácia v potrave.

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Zjavná toxicita je všeobecný termín opisujúci jasné toxické príznaky po podaní testovanej chemikálie. Tieto príznaky by mali postačovať na posúdenie nebezpečnosti a pri zvýšení podanej dávky by podľa nich malo byť možné predpokladať výskyt závažných toxických príznakov a pravdepodobnej mortality.

Porucha plodnosti predstavuje poruchy samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

Toxicita v prípade matiek znamená nežiaduce účinky na gravidné samice, ktoré sa vyskytujú buď špecificky (priamy účinok), alebo nešpecificky (nepriamy účinok) a ktoré súvisia so stavom gravidity.

NOAEL je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku. Je to najvyššia úroveň dávky, pri ktorej po podaní testovanej chemikálie nie sú pozorované žiadne nepriaznivé nálezy.

Estrogénový účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený estrogénový hormón (napr. estradiol 17ß).

Reprodukčná toxicita predstavuje škodlivé účinky na potomstvo a/alebo poruchu samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

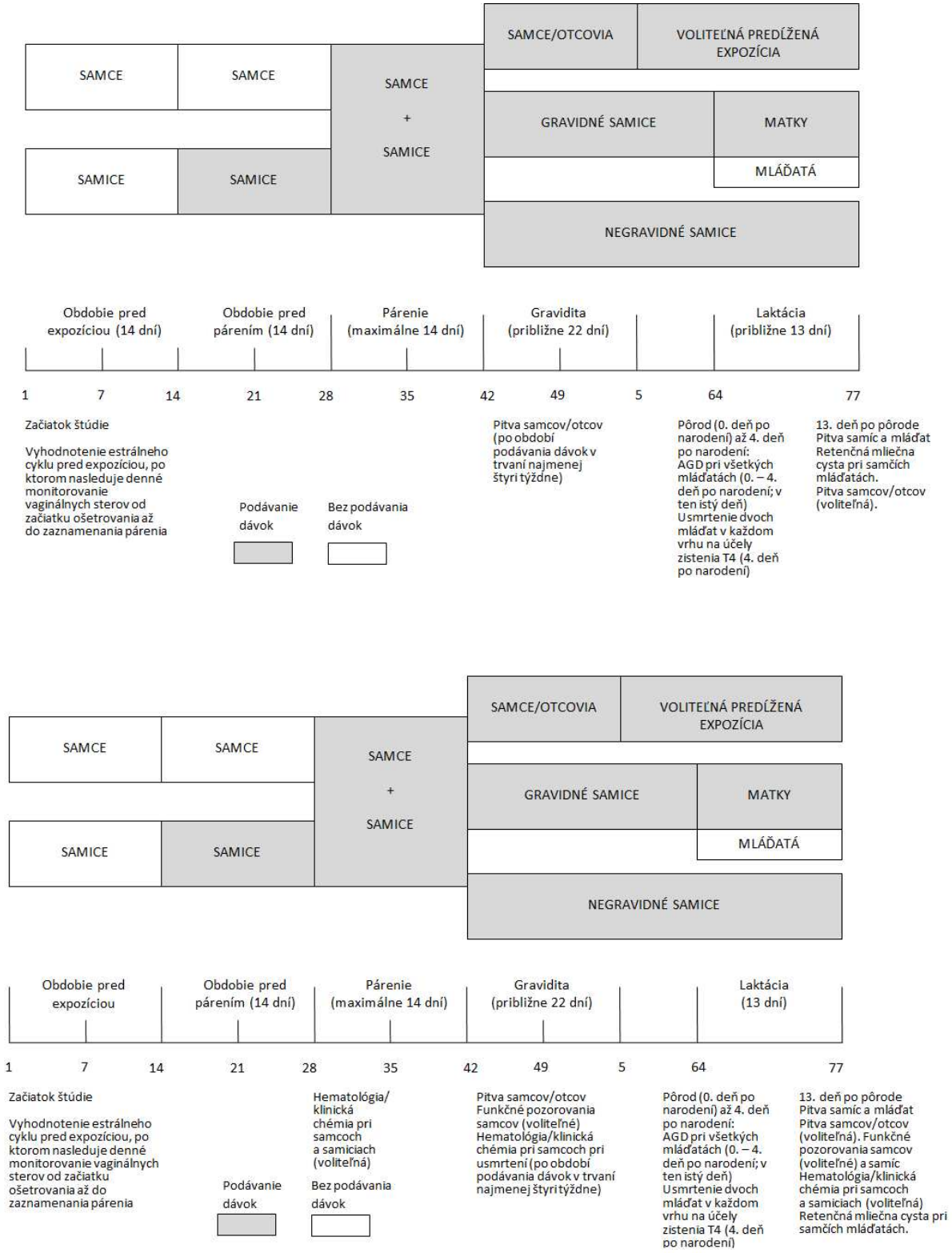
Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Tyreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený hormón štítnej žľazy (napr. T_3).

Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a relevantnosti pre konkrétny účel.

Dodatok 2

SCHÉMA HARMONOGRAMU TESTU ZNÁZORŇUJÚCA MAXIMÁLNE TRVANIE ŠTÚDIE NA ZÁKLADE ÚPLNÉHO 14-DŇOVÉHO OBDOBIA PÁRENIA



Dodatok 3

SÚHRNNÁ SPRÁVA V TABUĽKOVEJ PODOBE O ÚČINKOCH NA REPRODUKCIU/VÝVOJ

POZOROVANIA	HODNOTY				
Dávkovanie (jednotky).....	0 (kontrola)	…	…	…	…
Počet párov na začiatku (N)					
Estrálny cyklus (minimálne stredná dĺžka a frekvencia nepravidelných cyklov)					
Samice vykazujúce známky kopulácie (N)					
Samice, pri ktorých nastala gravidita (N)					
Dni počatia 1 – 5 (N)					
Dni počatia 6 –... [1] (N)					
Gravidita ≤ 21 dní (N)					
Gravidita = 22 dní (N)					
Gravidita ≥ 23 dní (N)					
Matky so živonarodenými mláďatami (N)					
Matky so živými mláďatami na 4. deň pp (N)					
Počet implantátov na matku (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku pri narodení (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku na 4. deň (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) pri narodení (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat v čase merania AGD (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach)					
AGD mláďat meraná v rovnaký postnatálny deň, medzi 0. až 4. PND (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach, zaznamenať PND)					

POZOROVANIA	HODNOTY				
Hmotnosť mláďat na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat na 13. deň (stredná hodnota)					
Retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách na 13. deň (stredná hodnota)					
ABNORMÁLNE MLÁĎATÁ					
Matky s počtom 0					
Matky s počtom 1					
Matky s počtom ≥ 2					
STRATA POTOMSTVA					
Prenatálna (počet implantátov mínus živonarodené mláďatá)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					
Postnatálna (životnarodené mláďatá mínus živé mláďatá na 13. postnatálny deň)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					

([1]) posledný deň obdobia párenia

B.65 METÓDA NA TESTOVANIE POLEPTANIA KOŽE S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVEJ BARIÉRY *IN VITRO*

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 435 (2015). Poleptanie kože predstavuje vznik nevratného poškodenia kože, ktoré sa prejavuje ako viditeľná nekróza cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie, ako sa vymedzuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadení Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (nariadenie CLP) ([1]). Táto testovacia metóda, ktorá je rovnocenná s aktualizovaným usmernením OECD na vykonávanie testov 435, predstavuje testovaciu metódu s využitím membránovej bariéry *in vitro*, ktorá slúži na identifikáciu žieravých chemikálií. V rámci tejto testovacej metódy sa používa umelá membrána navrhnutá tak, aby na žieravé chemikálie reagovala podobným spôsobom ako koža zvieraťa *in situ*.

2. Žieravosť pre kožu sa tradične posudzuje nanesením testovanej chemikálie na kožu živých zvierat a posúdením rozsahu poškodenia tkaniva po uplynutí stanoveného času (2). Okrem súčasnej testovacej metódy sa prijalo viacero testovacích metód *in vitro*, ktoré predstavujú alternatívy (3) (4) k štandardnému postupu *in vivo* s využitím králičej kože (kapitola B.4 tejto prílohy, ktorá je rovnocenná s usmernením OECD TG 404), ktorý slúži na identifikovanie žieravých chemikálií (2). V stratégii viacúrovňového testovania a hodnotenia podľa GHS OSN pri hodnotení a klasifikácii žieravosti pre kožu a v usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade podráždenia/poleptania kože sa odporúča použitie validovaných a uznaných testovacích metód *in vitro* v rámci modulov 3 a 4 (1) (5). V rámci prístupu IATA sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, a i) poskytuje sa usmernenie o tom, ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie potenciálu chemikálií na spôsobenie podráždenia a poleptania kože; a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania vrátane prípadov, keď sa zistia negatívne výsledky (5). V rámci tohto modulárneho prístupu možno na základe pozitívnych výsledkov z testovacích metód *in vitro* označiť chemikáliu za žieravú bez toho, aby bolo potrebné testovanie na zvieratách, čím sa obmedzí a spresní používanie zvierat a predíde sa bolesti a utrpeniu, ku ktorým by mohlo dôjsť, ak by sa na tento účel používali zvieratá.

3. Pre model s využitím membránovej bariéry *in vitro*, ktorý je komerčne dostupný pod označením Corrositex® (6) (7) (8), sa uskutočnili validačné štúdie, ktorými sa preukázala celková presnosť pri predikcii žieravosti pre kožu na úrovni 79 % (128/163), citlivosť na úrovni 85 % (76/89) a špecifickosť na úrovni 70 % (52/74), a to na základe databázy 163 látok a zmesí (7). Na základe uznanej validity sa táto validovaná referenčná metóda (VRM) odporúča na použitie v rámci viacúrovňovej testovacej stratégie na posudzovanie potenciálu chemikálií, pokiaľ ide o nebezpečenstvo žieravosti pre kožu (5) (7). Skôr ako sa na účely regulácie môže použiť test poleptania kože s využitím membránovej bariéry *in vitro*, je potrebné stanoviť jeho spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jeho navrhovaného používania, aby sa zabezpečila jeho podobnosť s metódou VRM (9) v súlade s vopred určenými normami výkonnosti (PS) (10). Vzájomné uznávanie údajov podľa dohody OECD bude možné garantovať len po tom, ako bola akákoľvek nová alebo aktualizovaná metóda v súlade s normami výkonnosti preskúmaná a zaradená do rovnocenného usmernenia OECD na vykonávanie testov. V súčasnosti usmernenie OECD na vykonávanie testov 435 zahŕňa len jednu metódu *in vitro*, a to túto testovaciu metódu, ktorá je komerčne dostupná ako model Corrositex®.

4. Ostatné metódy na testovanie žieravosti pre kožu sú založené na použití rekonštituovanej ľudskej kože (OECD TG 431) (3) a izolovanej kože potkanov (OECD TG 430) (4). Súčasťou tohto usmernenia na vykonávanie testov je aj zaradenie žieravých chemikálií do troch podkategórií žieravosti podľa GHS OSN a do troch prepravných obalových skupín OSN z hľadiska nebezpečenstva žieravosti. Toto usmernenie na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2006 a prešlo aktualizáciou v roku 2015, keď sa doň začlenil usmerňovací dokument IATA a aktualizoval sa zoznam látok na preukázanie spôsobilosti.

VYMEDZENIE POJMOV

5. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

6. Test opísaný v tejto testovacej metóde umožňuje identifikáciu žieravých testovaných chemikálií a ich ďalšiu klasifikáciu do podkategórií podľa GHS OSN/nariadenia CLP (tabuľka 1). Okrem toho možno pomocou takejto testovacej metódy prijímať rozhodnutia o žieravosti a nežieravosti špecifických tried chemikálií, napr. organických a anorganických kyselín, derivátov kyselín ([2]) a zásad na určité testovacie účely v súvislosti s prepravou (7) (11) (12). V tejto testovacej metóde sa opisuje všeobecný postup podobný validovanej referenčnej testovacej metóde (7). Aj keď táto

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

([2]) „Derivát kyseliny“ predstavuje nešpecifické označenie triedy a vo všeobecnosti sa vymedzuje ako chemikália vytvorená z kyseliny, a to buď priamo, alebo pomocou modifikácie alebo čiastočnej substitúcie. Táto trieda zahŕňa anhydridy, halogénkarboxylové kyseliny, soli a iné druhy chemikálií.

testovacia metóda neposkytuje primerané informácie o podráždení kože, treba poznamenať, že podráždením kože *in vitro* s vplyvom na zdravie sa konkrétne zaoberá testovacia metóda B.46 (rovnocenná k usmerneniu OECD TG 439) (13). Pokiaľ ide o úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej dermálnej expozícii, je potrebné použiť usmerňovací dokument OECD o integrovaných prístupoch k hodnoteniu pri vykonávaní testov (5).

Tabuľka 1

Kategória a podkategórie žieravosti pre kožu podľa GHS OSN [1]

Kategória žieravosti (kategória 1) (pre orgány, ktoré nepoužívajú podkategórie)	Podkategórie potenciálnej žieravosti [1] (pre orgány, ktoré používajú podkategórie, vrátane nariadenia CLP)	Žieravé v prípade ≥ 1 z 3 zvierat	
		Expozícia	Pozorovanie
Žieravé	Podkategória žieravosti 1A	≤ 3 minúty	≤ 1 hodina
	Podkategória žieravosti 1B	< 3 minúty/≤ 1 hodina	≤ 14 dní
	Podkategória žieravosti 1C	< 1 hodina/≤ 4 hodiny	≤ 14 dní

[1] V prípade EÚ sa v nariadení CLP uplatňujú tri podkategórie žieravosti pre kožu 1A, 1B a 1C.

7. Obmedzením validovanej referenčnej metódy (7) je to, že mnohé nežieravé chemikálie a niektoré žieravé chemikálie nemusia splniť požiadavky na testovanie na základe výsledkov počiatočného testu kompatibility (pozri odsek 13). Chemikálie na báze vody s hodnotou pH v rozsahu 4,5 až 8,5 často nespĺňajú požiadavky na testovanie, no pri testoch na zvieratách sa nežieravosť preukázala v prípade 85 % testovaných chemikálií v uvedenom rozsahu pH (7). Metódu membránovej bariéry *in vitro* možno použiť na testovanie tuhých látok (rozpustných alebo nerozpustných vo vode), kvapalín (vodných alebo nevodných) a emulzií. Testované chemikálie, ktoré nespôsobujú rozpoznateľnú zmenu v teste kompatibility [t. j. zmenu farby v systéme detekcie chemikálií (CDS) validovanej referenčnej testovacej metódy] však nemožno testovať pomocou metódy membránovej bariéry a na ich testovanie je potrebné použiť iné testovacie metódy.

PRINCÍP TESTU

8. Testovací systém je zložený z dvoch zložiek: zo syntetickej makromolekulárnej biobariéry a systému detekcie chemikálií (CDS). Pomocou tejto testovacej metódy sa prostredníctvom systému CDS rozpoznáva narušenie membránovej bariéry spôsobené žieravou testovanou chemikáliou po nanesení testovanej chemikálie na povrch syntetickej makromolekulárnej membránovej bariéry (7), pričom sa predpokladá pôsobenie rovnakých mechanizmov žieravosti ako v prípade kože živého organizmu.

9. Prienik cez membránovú bariéru (alebo jej narušenie) možno merať prostredníctvom viacerých postupov alebo systému CDS, pričom sa sleduje zmena farby farbiva indikátora pH alebo zmena inej vlastnosti roztoku indikátora, ktorý sa nachádza pod bariérou.

10. Je potrebné určiť, že membránová bariéra je platná na zamýšľané použitie, t. j. relevantná a spoľahlivá. V rámci toho je potrebné zabezpečiť, že rozličné prípravky sú konzistentné, pokiaľ ide o vlastnosti bariéry, napr. schopné zabrániť preniknutiu nežieravých chemikálií cez bariéru, umožňujúce kategorizáciu žieravých vlastností chemikálií z hľadiska rôznych podkategórií žieravosti podľa GHS OSN (1). Priradená klasifikácia vychádza z času, ktorý je potrebný na preniknutie chemikálie cez membránovú bariéru k roztoku indikátora.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

11. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania metódy membránovej bariéry *in vitro*, ktorá spĺňa požiadavky tejto testovacej metódy, preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne klasifikujú dvanásť látok na preukázanie spôsobilosti odporúčaných v tabuľke 2. V situáciách, keď látka uvedená v zozname nie je k dispozícii, alebo v odôvodnených prípadoch možno použiť inú látku, pre ktorú sú dostupné primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napr. zo zoznamu referenčných chemikálií (10)], za predpokladu, že sa uplatňujú rovnaké výberové kritériá, aké sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 2

Látky na preukázanie spôsobilosti [1]

Látka [2]	Registračné číslo CAS	Chemická trieda	Podkategória GHS OSN *in vivo* [3]	Podkategória GHS OSN *in vitro* [3]
dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganické kyseliny	1A	1A
kyselina dusičná	7697-37-2	anorganické kyseliny	1A	1A
chlorid fosforečný	10026-13-8	prekurzory anorganických kyselín	1A	1A
valeryl chlorid	638-29-9	chloridy kyselín	1B	1B
hydroxid sodný	1310-73-2	anorganické zásady	1B	1B
1-(2-aminoetyl)piperazín	140-31-8	alifatické amíny	1B	1B
benzénsulfonylchlorid	98-09-9	chloridy kyselín	1C	1C
N,N-dimetyl benzylamín	103-83-3	anilíny	1C	1C
tetraetylénpentamín	112-57-2	alifatické amíny	1C	1C
eugenol	97-53-0	fenoly	NC	NC
nonylakrylát	2664-55-3	akryláty/metakryláty	NC	NC
hydrogénuhličitan sodný	144-55-8	anorganické soli	NC	NC

(1) Medzi dvanástimi látkami uvedenými vyššie sa nachádzajú tri látky z každej z troch podkategórií žieravých látok podľa GHS OSN a tri nežieravé látky. Tieto látky sú jednoducho dostupné od komerčných dodávateľov. Podkategória GHS OSN vychádza z výsledkov testovania *in vivo* vysokej kvality. Tieto látky sú vybraté zo zoznamu 40 referenčných látok, ktoré sú súčasťou minimálneho zoznamu chemikálií určených na preukázanie presnosti a spoľahlivosti testovacích metód, ktoré sú štrukturálne a funkčne podobné validovanej referenčnej testovacej metóde, pričom boli zvolené spomedzi 163 referenčných chemikálií, ktoré sa pôvodne použili pri validácii referenčnej testovacej metódy (Corrositex®) (7) (10) (14). Cieľom tohto výberového procesu bolo v maximálnej možnej miere zahrnúť chemikálie, ktoré zastupujú celý rozsah žieravých reakcií (napr. nežieravé látky, žieravé látky podľa obalovej skupiny OSN I, II a III), ktorých meranie alebo predikcia je možná pomocou validovanej referenčnej testovacej metódy, zastupujú chemické triedy použité počas procesu validácie, majú dobre vymedzené chemické štruktúry; vyvolávajú reprodukovateľné výsledky v rámci validovanej referenčnej testovacej metódy, vyvolávajú jednoznačné výsledky v referenčnom teste *in vivo*, sú komerčne dostupné a nie sú spojené s neúmernými nákladmi na zneškodnenie (14).
(2) Látky testované v čistej podobe alebo s čistotou ≥ 90 %.
(3) Obalové triedy OSN I, II, resp. III zodpovedajú podkategóriám 1A, 1B, resp. 1C podľa GHS OSN. NC – nežieravé.

POSTUP

12. V nasledujúcich odsekoch sa opisujú zložky a postupy testovacej metódy na posúdenie žieravosti s využitím umelej membránovej bariéry (7) (15) na základe aktuálnej validovanej referenčnej metódy (VRM), t. j. komerčne dostupného modelu Corrositex®. Membránovú bariéru a riešenia týkajúce sa kompatibility/indikátora a kategorizácie možno vytvoriť, pripraviť alebo získať komerčne dostupným spôsobom, ako napríklad v prípade validovanej referenčnej metódy Corrositex®. K dispozícii je vzorový protokol testovacej metódy pre validovanú referenčnú testovaciu metódu (7). Testovanie sa má vykonávať pri teplote okolia (17 – 25 °C) a zložky majú byť v súlade s nasledujúcimi podmienkami.

Test kompatibility s testovanou chemikáliou

13. Pred uskutočnením testu s využitím membránovej bariéry sa uskutoční test kompatibility s cieľom určiť, či je možná detekcia testovanej chemikálie pomocou systému CDS. Ak pomocou systému CDS nie je možná detekcia testovanej chemikálie, testovacia metóda s využitím membránovej bariéry nie je vhodná na posúdenie potenciálnej žieravosti príslušnej testovanej chemikálie a je potrebné použiť inú testovaciu metódu. Systém CDS a podmienky expozície použité v teste kompatibility majú zodpovedať expozícii pri následnom teste s využitím membránovej bariéry.

Test na určenie kategórie časového rámca pre testovanú chemikáliu

14. Ak je to vhodné pre danú testovaciu metódu, testovaná chemikália, ktorá vyhovela v teste kompatibility, sa podrobí testu na určenie kategórie časového rámca, t. j. skríningovému testu na rozlíšenie medzi slabými a silnými kyselinami alebo zásadami. Vo validovanej referenčnej testovacej metóde sa napríklad pomocou testu na určenie kategórie časového rámca stanovuje, ktorý z dvoch časových rámcov sa má použiť podľa toho, či sa zistí významná tlmivá kapacita. Na základe tlmivej kapacity testovanej chemikálie sa používajú dva rôzne časové rámce narušenia bariéry na určenie žieravosti a podkategórie žieravosti pre kožu podľa GHS OSN.

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVEJ BARIÉRY

Membránová bariéra

15. Membránová bariéra pozostáva z dvoch zložiek: bielkovinového makromolekulárneho vodného gélu a priepustnej podpornej membrány. Bielkovinový gél je nepriepustný pre kvapaliny a pevné látky, ale môže byť narušený žieravinou, čím sa stane priepustným. Úplne zhotovená membránová bariéra sa uloží pri vopred určených podmienkach, aby sa predišlo znehodnoteniu gélu, napr. vysychaním, mikrobiálnym rastom, posunom, prasknutím, čím by sa narušila jeho funkcia. Určí sa prijateľné obdobie skladovania, pričom po jeho uplynutí sa prípravky s membránovou bariérou nemôžu používať.

16. Priepustná podporná membrána slúži ako mechanická opora pre bielkovinový gél počas procesu zgélovatenia a expozície testovanej chemikálii. Podporná membrána bráni poklesu alebo posunu gélu a má byť jednoducho priepustná pre všetky testované chemikálie.

17. Bielkovinový gél zložený z bielkovín, napr. keratínu, kolagénu, alebo zo zmesí bielkovín vytvára gélový podklad, ktorý slúži ako cieľ pre testovanú chemikáliu. Bielkovinový materiál sa umiestni na povrch podpornej membrány a nechá sa zgélovatieť, skôr ako sa membránová bariéra umiestni nad roztok indikátora. Bielkovinový gél má mať všade rovnakú hrúbku a hustotu a nemajú sa v ňom nachádzať vzduchové bubliny ani kazy, ktoré by mohli ovplyvniť jeho funkčnú integritu.

Systém detekcie chemikálií (CDS)

18. Roztok indikátora, ktorý predstavuje rovnaký roztok, aký sa použil pri teste kompatibility, reaguje na prítomnosť testovanej chemikálie. Použije sa farbivo alebo kombinácia farbív indikátora pH, napr. krezolová červeň alebo metyloranž, na ktorej sa prejaví zmena farby ako reakcia na prítomnosť testovanej chemikálie. Systém merania môže byť vizuálny alebo elektronický.

19. Detekčné systémy, ktoré sa vyvíjajú na účely detekcie prechodu testovanej chemikálie cez bariérovú membránu, je potrebné posúdiť z hľadiska relevantnosti a spoľahlivosti, aby sa preukázal rozsah chemikálií, ktoré možno detegovať, a kvantitatívne limity detekcie.

VYKONANIE TESTU

Zostavenie zložiek testovacej metódy

20. Membránová bariéra sa umiestni do nádobky (alebo skúmavky) s roztokom indikátora tak, aby podporná membrána bola úplne v kontakte s roztokom indikátora a neboli prítomné vzduchové bubliny. Je potrebné zabezpečiť, aby sa zachovala integrita bariéry.

Aplikácia testovanej chemikálie

21. Vhodné množstvo testovanej chemikálie, napr. 500 µl kvapaliny alebo 500 mg tuhej látky vo forme jemného prášku (7) sa opatrne navrství na vrchný povrch membránovej bariéry a rovnomerne sa rozmiestni. Pripraví sa primeraný počet replikátov, napr. štyri (7), pre každú testovanú chemikáliu a príslušné kontroly (pozri odseky 23 až 25). Zaznamená sa čas aplikácie testovanej chemikálie na membránovú bariéru. S cieľom zabezpečiť správne zaznamenanie krátkych časov poleptania sú časy aplikácie testovanej chemikálie do nádobiek s replikátmi rozložené.

Meranie prienikov cez membránovú bariéru

22. Každá nádobka sa primerane sleduje, zaznamená sa čas prvej zmeny roztoku indikátora, t. j. prieniku cez bariéru, a stanoví sa čas medzi aplikáciou a prienikom cez membránovú bariéru.

Kontroly

23. V testoch, v ktorých sa spolu s testovanou chemikáliou používa nosič alebo rozpúšťadlo, musí byť nosič alebo rozpúšťadlo kompatibilné so systémom membránovej bariéry, t. j. nesmie meniť integritu systému membránovej bariéry ani žieravosť testovanej chemikálie. V relevantných prípadoch sa kontrola s rozpúšťadlom (alebo nosičom) testuje súčasne s testovanou chemikáliou, aby sa preukázala kompatibilita rozpúšťadla so systémom membránovej bariéry.

24. Pozitívna (žieravá) kontrola so strednou žieravosťou, napr. 110 ±15 mg hydroxidu sodného (podkategória žieravosti 1B podľa GHS OSN) (7) sa má testovať súčasne s testovanou chemikáliou s cieľom posúdiť prijateľnú funkčnosť testovacieho systému. Druhá pozitívna kontrola, ktorá patrí do rovnakej chemickej triedy ako testovaná chemikália, môže byť užitočná na vyhodnotenie relatívnych žieravých vlastností žieravej testovanej chemikálie. Je potrebné vybrať pozitívne kontroly, ktoré majú strednú žieravosť (napr. podkategória 1B podľa GHS OSN), s cieľom detegovať zmeny v čase prieniku, ktorý môže byť neprijateľne dlhší alebo kratší než určená referenčná hodnota, čo by poukazovalo na nesprávnu činnosť testovacieho systému. Na tento účel sú vysoko žieravé (podkategória 1A podľa GHS OSN) alebo nežieravé chemikálie užitočné len v obmedzenej miere. Žieravá chemikália patriaca do podkategórie 1B podľa GHS OSN umožňuje detekciu príliš krátkeho alebo príliš dlhého času narušenia bariéry. Slabo žieravú chemikáliu (podkategória 1C podľa GHS OSN) možno použiť ako pozitívnu kontrolu na meranie schopnosti testovacej metódy konzistentne rozlišovať medzi slabo žieravými a nežieravými chemikáliami. Bez ohľadu na použitý prístup je potrebné vytvoriť prijateľný rozsah reakcií na pozitívnu kontrolu na základe historického rozsahu časov narušenia bariéry pre použité pozitívne kontroly, napr. stredná hodnota ±2 – 3 štandardné odchýlky. V jednotlivých štúdiách je potrebné pre každú pozitívnu kontrolu určiť presný čas narušenia bariéry, aby bola možná detekcia odchýlok, ktoré sú mimo prijateľného rozsahu.

25. Negatívna (nežieravá) kontrola, napr. 10 % kyselina citrónová, 6 % kyselina propiónová (7), sa má takisto testovať súčasne s testovanou chemikáliou ako ďalšie opatrenie v rámci kontroly kvality s cieľom preukázať funkčnú integritu membránovej bariéry.

Kritériá prijateľnosti štúdie

26. Podľa stanovených časových parametrov pre jednotlivé podkategórie žieravosti podľa GHS OSN sa na predikciu žieravosti testovanej chemikálie používa čas (v minútach), ktorý uplynul medzi aplikáciou testovanej chemikálie na membránovú bariéru a prienikom cez túto bariéru. Na to, aby sa štúdia považovala za prijateľnú, sa musí prostredníctvom súbežnej pozitívnej kontroly dosiahnuť očakávaný čas odozvy pri prieniku (napr. čas narušenia bariéry 8 – 16 minút, ak sa ako pozitívna kontrola používa hydroxid sodný), súbežná negatívna kontrola nesmie byť žieravá a súbežná kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa používa, nemá byť ani žieravá, ani nemá meniť žieravé vlastnosti testovanej chemikálie. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania metódy, ktorá spĺňa požiadavky tejto testovacej metódy, preukázali technickú spôsobilosť pomocou dvanástich látok odporúčaných v tabuľke 2. Pri nových podobných metódach („me-too“) vyvinutých v rámci tejto testovacej metódy, ktoré sú štrukturálne a funkčne podobné validovanej referenčnej metóde (14), by sa mali použiť vopred určené normy výkonnosti na preukázanie spoľahlivosti a presnosti novej metódy pred tým, ako sa začne používať na regulačné testovanie (10).

Interpretácia výsledkov a klasifikácia žieravosti testovaných chemikálií

27. Čas (v minútach), ktorý uplynul medzi aplikáciou testovanej chemikálie na membránovú bariéru a prienikom cez túto bariéru, slúži na klasifikáciu testovanej chemikálie z hľadiska podkategórií žieravosti podľa GHS OSN (1) a v relevantných prípadoch z hľadiska obalovej skupiny OSN (16). Pre jednotlivé navrhované testovacie metódy sa stanovujú hraničné časové hodnoty pre každú z troch podkategórií žieravosti. Pri konečnom rozhodnutí o hraničných časových hodnotách je potrebné zohľadniť to, aby sa minimalizovala možnosť nedostatočnej klasifikácie nebezpečnosti z hľadiska žieravosti (t. j. falošne negatívne výsledky). V súčasnom usmernení na vykonávanie testov sa majú použiť hraničné časové hodnoty modelu Corrositex® opísané v tabuľke 3, keďže tento model predstavuje jedinú testovaciu metódu, ktorá v súčasnosti patrí do tohto usmernenia na vykonávanie testov (7).

Tabuľka 3

Predikčný model Corrositex®

Stredný čas narušenia bariéry (min.)		Predikcia podľa GHS OSN ([3])
Testovaná chemikália kategórie 1 ([1]) (určená kategorizačným testom metódy)	Testovaná chemikália kategórie 2 ([2]) (určená kategorizačným testom metódy)	
0 – 3 min.	0 – 3 min.	žieravá voliteľná podkategória 1A
< 3 až 60 min.	< 3 až 30 min.	žieravá voliteľná podkategória 1B
< 60 až 240 min.	< 30 až 60 min.	žieravá voliteľná podkategória 1C
< 240 min.	< 60 min.	nežieravá

([1]) Testovaná chemikália s vysokou tlmivou kapacitou (6)
([2]) Testovaná chemikália s nízkou tlmivou kapacitou (6)
([3]) Podkategórie 1A, 1B, resp. 1C podľa GHS OSN zodpovedajú obalovým skupinám OSN I, II, resp. III.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

28. Čas (v minútach), ktorý uplynul medzi aplikáciou a prienikom cez bariéru sa pre testovanú chemikáliu a pozitívne kontroly uvádza v tabuľkovej podobe ako údaje o jednotlivých replikátoch, ako aj stredné hodnoty ± štandardnej odchýlky pre každý test.

Správa o teste

29. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália a kontrolné látky:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— viaczložkové látky, UVCB a zmesi: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe,

— podmienky skladovania.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (ak je to vhodné), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Model membránovej bariéry in vitro a použitý protokol vrátane preukázanej presnosti a spoľahlivosti

Podmienky testovania:

— opis použitých prístrojov a postupov prípravy,

— zdroj a zloženie použitej membránovej bariéry *in vitro*,

— zloženie a vlastnosti roztoku indikátora,

— metóda detekcie,

— množstvá testovanej chemikálie a kontrolných látok,

— počet replikátov,

— opis a odôvodnenie testu na určenie kategórie časového rámca,

— metóda aplikácie,

— časy pozorovania,

— opis použitých kritérií hodnotenia a klasifikácie,

— preukázanie spôsobilosti pri vykonávaní testovacej metódy pred začatím bežného používania otestovaním chemických látok na preukázanie spôsobilosti.

Výsledky:

— individuálne nespracované údaje z jednotlivých testovacích a kontrolných vzoriek pre každý replikát v podobe tabuľky,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia s prihliadnutím na použitý predikčný model/rozhodovacie kritériá.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

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

(2) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie/poleptanie kože.

(3) Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Testovacia metóda pomocou zrekonštruovanej ľudskej epidermy (RHE).

(4) Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Transkutánny elektrický odpor (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitola B.46 tejto prílohy, Podráždenie kože *in vitro*: Test na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. K dispozícii na adrese: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. K dispozícii na adrese: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (9).

Chemikália: látka alebo zmes.

Systém detekcie chemikálií (CDS): systém vizuálneho alebo elektronického merania s roztokom indikátora, ktorý reaguje na prítomnosť testovanej chemikálie, napr. zmenou vo farbive alebo v kombinácii farbív indikátora pH, prostredníctvom ktorej sa prejaví zmena farby ako reakcia na prítomnosť testovanej chemikálie, alebo inými typmi chemických alebo elektrochemických reakcií.

Zhoda: ide o mieru výkonnosti testovacej metódy pre testovacie metódy, ktoré poskytujú kategorizačné výsledky, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a je vymedzený ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo veľkej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch skúmaných testovaných chemikálií (9).

GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NC: nežieravé.

Normy výkonnosti: normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) podobné úrovne spoľahlivosti a presnosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (9).

Relevantnosť: opis vzťahu testovacej metódy k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testovacou metódou správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (9).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (9).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Poleptanie kože *in vivo*: vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch strata farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

B.66 STABILNE TRANSFEKTOVANÁ TRANSAKTIVÁCIA V SKÚŠKACH *IN VITRO* NA ZISŤOVANIE AGONISTOV A ANTAGONISTOV ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Usmernenia OECD na vykonávanie testov výkonnosti

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 455 (2016). TG 455 je usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti (PBTG), v ktorom sa opisuje metodika stabilne transfektovanej transaktivácie v skúškach *in vitro* na určovanie agonistov a antagonistov estrogénových receptorov (skúšky ER TA). Obsahuje niekoľko mechanicky a funkčne podobných testovacích metód na identifikáciu agonistov a antagonistov estrogénových receptorov (t. j. ERα, a/alebo ERβ) a malo by uľahčiť vývoj nových podobných alebo modifikovaných testovacích metód v súlade so zásadami validácie stanovenými v usmerňovacom dokumente OECD o validácii a medzinárodnom uznávaní nových a aktualizovaných testovacích metód na posúdenie nebezpečnosti (1). Plne validované referenčné testovacie metódy (dodatok 2 a dodatok 3), ktoré poskytujú základ pre toto PBTG, sú:

— skúška stabilne transfektovanej transaktivácie (STTA) (2) s použitím bunkovej línie (h) ERα-HeLa-9903, a

— skúška VM7Luc ER TA (3) s použitím bunkovej línie VM7Luc4E2 ([1]), ktorá vyjadruje najmä hERα s určitým prírastkom z hERββ(4)(5).

Na vývoj a validáciu podobných skúšok zameraných na rovnaký sledovaný parameter nebezpečenstva sú k dispozícii a mali by sa používať normy výkonnosti (PS) (6) (7). Umožňujú včasnú zmenu PBTG 455 tak, aby bolo možné k aktualizovanému PBTG pridať nové podobné skúšky. Podobné skúšky sa však pridajú až po preskúmaní a súhlase zo strany OECD, že sú splnené normy výkonnosti. Skúšky zahrnuté do TG 455 môžu byť použité bez rozdielu na riešenie požiadaviek členských štátov OECD týkajúcich sa výsledkov testov na transaktiváciu estrogénových receptorov, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

Súvislosti a zásady skúšok zahrnutých do tejto testovacej metódy

2. OECD v roku 1998 začala činnosť s vysokou prioritou s cieľom vykonať revíziu existujúcich usmernení a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie potenciálnych endokrinných disruptorov bol revidovaný v roku 2012. Pôvodné a revidované koncepčné rámce sú zahrnuté ako prílohy k usmerňovaciemu dokumentu OECD o štandardizovaných usmerneniach na vykonávanie testov na hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov (8). Koncepčný rámec tvorí päť úrovní, každá úroveň zodpovedá odlišnej úrovni biologickej zložitosti. Skúšky transaktivácie (TA) estrogénových receptorov opísané v tejto testovacej metóde predstavujú úroveň 2, čo zahŕňa „skúšky *in vitro* poskytujúce údaje o vybraných endokrinných mechanizmoch/dráhach“. Táto testovacia metóda je určená pre skúšky transaktivácie (TA) *in vitro* určené na identifikáciu agonistov a antagonistov estrogénových receptorov (ER).

3. Interakcia estrogénov s estrogénovými receptormi môže ovplyvniť transkripciu génov riadených estrogénom, čo môže viesť k indukcii alebo inhibícii bunkových procesov vrátane tých, ktoré sú potrebné na proliferáciu buniek, normálny vývoj plodu a reprodukčnú funkciu (9) (10) (11). Porušenie normálnych estrogénových systémov môže potenciálne spustiť nežiaduce účinky na normálny vývoj (ontogenézu), reprodukčné zdravie a integritu reprodukčného systému.

4. Skúšky transaktivácie *in vitro* sú založené na priamej alebo nepriamej interakcii látok so špecifickým receptorom, ktorý reguluje transkripciu reportérového génového produktu. Takéto skúšky sa vo veľkej miere používajú na hodnotenie expresie génov regulovanej špecifickými jadrovými receptormi, ako sú estrogénové receptory (12) (13) (14) (15) (16). Boli navrhnuté na detekciu estrogénovej transaktivácie regulovanej estrogénovými receptormi (17) (18) (19). Existujú najmenej dva hlavné podtypy jadrových estrogénových receptorov, ERα a ERβ, ktoré sú zakódované odlišnými génmi. Príslušné proteíny majú rôzne biologické funkcie, ako aj rôznu distribúciu v tkanivách a ligandové afinity (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jadrový ERα sprostredkuje klasickú estrogénovú reakciu (27) (28) (29) (30), a preto väčšina modelov, ktoré sa v súčasnosti vyvíjajú na meranie aktivácie alebo inhibície estrogénových receptorov, sú špecifické pre ERα. Tieto skúšky sa používajú na identifikáciu chemikálií, ktoré aktivujú (alebo inhibujú) estrogénové receptory po naviazaní ligandov, po ktorom sa komplex receptora a ligandu naviaže na konkrétne úseky DNA

zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén, čo vedie k zvýšenej bunkovej expresii markerového proteínu. V skúškach sa môžu použiť rôzne reportérové reakcie. V systémoch založených na luciferáze enzým luciferáza transformuje luciferínový substrát na bioluminiscenčný produkt, ktorý možno kvantitatívne merať luminometrom. Inými príkladmi bežných reportérov sú fluorescenčný proteín a gén *LacZ*, ktorý kóduje β-galaktozidázu, enzým, ktorý dokáže transformovať bezfarebný substrát X-gal (5-bróm-4-chlórindolylgalaktopyranozid) na modrý produkt, ktorý možno kvantifikovať spektrofotometrom. Tieto reportérové gény možno hodnotiť rýchlo a lacno pomocou komerčne dostupných testovacích súprav.

5. Validačné štúdie skúšok STTA a VM7Luc TA preukázali ich význam a spoľahlivosť, pokiaľ ide o ich určený účel (3)(4)(5)(30). Normy výkonnosti pre skúšky transaktivácie estrogénových receptorov (ER TA) založené na luminiscencii s použitím bunkových línií prsníka sú zahrnuté v hodnotiacej správe výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Skúška *in vitro* na určenie agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií na estrogénové receptory ľudí [ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals] (3). Tieto normy výkonnosti boli upravené tak, aby boli použiteľné pre skúšky STTA aj VM7Luc TA (2).

6. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

Rozsah a obmedzenia týkajúce sa skúšok transaktivácie

7. Tieto skúšky sa navrhujú na účely skríningu a stanovovania priorít, ale môžu poskytnúť aj mechanistické informácie, ktoré možno použiť v analýze váhy dôkazov. Týkajú sa transaktivácie indukovanej chemickou väzbou na estrogénové receptory v systéme *in vitro*. Výsledky by teda nemali byť priamo extrapolované na komplexnú signalizáciu a reguláciu intaktného endokrinného systému *in vivo*.

8. Transaktivácia, ktorú sprostredkujú estrogénové receptory, sa považuje za jeden z kľúčových mechanizmov narušenia endokrinného systému (ED), hoci existujú aj iné mechanizmy, prostredníctvom ktorých môže dôjsť k narušeniu endokrinného systému, okrem iného napríklad prostredníctvom i) interakcií s inými receptormi a enzýmovými systémami v rámci endokrinného systému; ii) hormónovej syntézy; iii) metabolickej aktivácie a/alebo inaktivácie hormónov; iv) distribúcie hormónov do cieľových tkanív a v) vylúčenia hormónov z tela. Žiadna zo skúšok v rámci tejto testovacej metódy sa netýka týchto spôsobov účinku.

9. Táto testovacia metóda sa týka schopnosti chemikálií aktivovať (teda pôsobiť ako agonisty) a takisto potlačiť (teda pôsobiť ako antagonisty) transkripciu závislú od estrogénových receptorov. Niektoré chemikálie môžu v závislosti od typu buniek vykazovať agonistické aj antagonistické pôsobenie a sú známe ako selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM). Chemikálie, pri ktorých sa v týchto skúškach dosiahnu negatívne výsledky, by sa mohli vyhodnotiť v skúške viazania na estrogénové receptory, skôr než sa vyvodí záver, že daná chemikália sa na receptor neviaže. Okrem toho skúšky pravdepodobne informujú len o aktivite materskej molekuly so zreteľom na obmedzené metabolizačné kapacity bunkových systémov *in vitro*. Vzhľadom na to, že počas validácie boli použité iba jednotlivé látky, neriešila sa použiteľnosť na testované zmesi. Táto testovacia metóda je napriek tomu teoreticky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok, UVCB a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na viaczložkovej látke, UVCB alebo zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

10. Na informačné účely tabuľka 1 poskytuje výsledky testov agonistov pre 34 látok, ktoré boli testované v obidvoch plne validovaných referenčných testovacích metódach opísaných v tejto testovacej metóde. Z týchto látok je 26 klasifikovaných ako definitívne agonisty estrogénových receptorov a 8 je klasifikovaných ako negatívne na základe publikovaných správ vrátane skúšok *in vitro* viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie a/alebo uterotrofickej skúšky (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). V tabuľke 2 sa nachádzajú výsledky testov antagonistov pre 15 látok, ktoré boli testované v obidvoch plne validovaných referenčných testovacích metódach opísaných v tejto testovacej metóde. Z týchto látok sú 4 klasifikované ako definitívne/predpokladané antagonisty estrogénových receptorov a 10 je klasifikovaných ako negatívne na základe publikovaných správ vrátane skúšok *in vitro* viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (2)(3)(18)(31). V súvislosti s údajmi zhrnutými v tabuľke 1 a tabuľke 2 existovala 100 % zhoda medzi oboma referenčnými testovacími metódami, pokiaľ ide o klasifikáciu všetkých látok, s výnimkou jednej látky (mifepristónu), v prípade skúšky antagonistov, pričom každá látka bola správne klasifikovaná ako agonista/antagonista estrogénových receptorov alebo ako negatívna. Doplňujúce informácie o tejto skupine chemikálií, ako aj o ďalších chemikáliách testovaných v skúškach STTA a VM7Luc ER TA počas validačných štúdií sú uvedené v normách výkonnosti pre ERTA (6)(7), v dodatku 2 (tabuľky 1, 2 a 3).

Tabuľka 1

Prehľad výsledkov zo skúšok STTA a VM7Luc ER TA pre látky testované v obidvoch skúškach agonistov a klasifikované ako agonisty estrogénových receptorov (POS) alebo ako negatívne (NEG)

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA [1]			Skúška VM7Luc ER TA [3]		Zdroj údajov pre klasifikáciu [4]		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Iné transaktivácie ER [c]	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
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-etinylestradiol [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-trenbolón	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-nortestosterón [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-kumylfenol [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-*terc*-oktylfenol [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	apigenín [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

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA (1)			Skúška VM7Luc ER TA (3)		Zdroj údajov pre klasifikáciu (4)		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} (b) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} (b), (3) (M)	Iné transaktivácie ER (c)	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
9	atrazín (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	Butylbenzyl ftalát (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	kortikosterón (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	kumestrol (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	daidzeín (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	dietylstilbestrol (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	di-n-butyl ftalát	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	etylparabén	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(bez hodnoty PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	estrón (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	genisteín (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

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA [1]			Skúška VM7Luc ER TA [3]		Zdroj údajov pre klasifikáciu [4]		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Iné transaktivácie ER [c]	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
21	haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	kaempferol [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	kepon [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	ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*mezo*-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	metyl testosterón [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	morín	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	noretynodrel [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'*-metoxychlór [a]	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(bez hodnoty 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

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA ([1])			Skúška VM7Luc ER TA ([3])		Zdroj údajov pre klasifikáciu ([4])		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} ([b]) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	Iné transaktivácie ER ([c])	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
32	reserpín	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	spironolaktón ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	testosterón	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

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); M = molárna; EC_{50} = polovičná maximálna účinná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna; POS = pozitívna; NT = netestované; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrácia testovanej látky, pri ktorej reakcia predstavuje 10 % (alebo 50 % v prípade PC_{50}) reakcie vyvolanej pozitívnou kontrolou (E2, 1 nm) na každej mikrotitračnej platničke.

([a]) Bežné látky testované v skúškach STTA a VM7Luc ER TA, ktoré boli označené ako agonisty estrogénových receptorov alebo ako negatívne a ktoré boli použité na vyhodnotenie presnosti vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA [Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde VM7Luc ER TA, tabuľka 4-1 (3)].

([b]) Maximálna koncentrácia testovaná za neprítomnosti obmedzení v dôsledku cytotoxicity alebo nerozpustnosti bola 1×10^{-5} M (skúška STTA) a 1×10^{-3} M (skúška VM7Luc ER TA).

([c]) Číslo v zátvorkách predstavuje výsledky testov, na základe ktorých je látka klasifikovaná ako pozitívna (POS) alebo negatívna (NEG), z celkového počtu referenčných štúdií.

([1]) Hodnoty uvedené v návrhu správy o predbežnej validácii a medzilaboratórnej validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie (TA) na stanovenie estrogénového pôsobenia – skúška reportérového génu, ktorého mediátorom je ľudský ERα, s použitím bunkovej línie hER-HeLa-9903 [Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line] (2).

([3]) Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metóda *in vitro* na určenie agonistov a antagonistov ER: [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]) Stredné hodnoty EC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

([4]) Klasifikácia látky ako agonistu estrogénových receptorov alebo ako látky, ktorá je negatívna, vychádzala z informácií uvedených v podkladových kontrolných dokumentoch (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre testovacie metódy viazania na estrogénové receptory a testovacie metódy transaktivácie (TA) (31), ako aj z informácií získaných z publikácií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Poznámky: Jednotlivé skúšky v rámci tejto testovacej metódy nemajú rovnaké merania. V niektorých situáciách EC_{50} nie je možné vypočítať, pretože nie je generovaná úplná krivka závislosti odozvy od dávky. Zatiaľ čo pri skúške STTA je hodnota PC_{10} kľúčovým meraním, môžu existovať aj ďalšie príklady, keď PC_x poskytne užitočné informácie.

Tabuľka 2

Porovnanie výsledkov skúšok STTA a VM7Luc ER TA v prípade látok testovaných v obidvoch skúškach antagonistov a klasifikovaných ako antagonisty estrogénových receptorov (POS) alebo ako negatívne (NEG)

	Látka [a]	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA [1]		Skúška VM7Luc ER TA [2]		Potenciálne účinky ER STTA [4]	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM [5]	Chemická trieda podľa MeSH [6]	Trieda výrobku [7]
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} [b] (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} [b], [3] (M)				
1	4-hydroxytamoxifén	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
2	dibenz[a,h]antracén	53-70-3	POS	Bez hodnoty IC_{50}	POS	Bez hodnoty IC_{50}	POS	PP	polycyklická zlúčenina	laboratórna chemikália, prírodný produkt
3	mifepristón	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	slabo POS	NEG	steroid	liek
4	raloxifén HC1	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
5	tamoxifén	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	steroid	liek, veterinárne činidlo
7	apigenín	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	heterocyklická zlúčenina	farbivo, prírodný produkt, farmaceutický medziprodukt

	Látka [a]	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA [1]		Skúška VM7Luc ER TA [2]		Potenciálne účinky ER STTA [4]	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM [5]	Chemická trieda podľa MeSH [6]	Trieda výrobku [7]
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} [b] (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} [b], [3] (M)				
8	atrazín	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	heterocyklická zlúčenina	herbicíd
9	di-n-butyl ftalát	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	ester, kyselina ftalová	kozmetická zložka, priemyselná chemikália, zmäkčovadlo
10	fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	netestované	PN	heterocyklická zlúčenina, pyrimidín	fungicíd
11	flavón	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
12	flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	amid	liek, veterinárne činidlo
13	genisteín	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	netestované	NEG	fenol	chemický medziprodukt

	Látka ([a])	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA ([1])		Skúška VM7Luc ER TA ([2])		Potenciálne účinky ER STTA ([4])	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM ([5])	Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
15	resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	uhľovodík (cyklický)	prírodný produkt

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); M = molárna; IC_{50} = polovičná maximálna inhibičná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna, PN = predpokladaná negatívna; POS = pozitívna; PP = predpokladaná pozitívna.

([a]) Bežné látky testované v skúškach STTA a VM7Luc ER TA, ktoré boli označené ako antagonisty estrogénových receptorov alebo ako negatívne a ktoré boli použité na vyhodnotenie presnosti vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) Maximálna koncentrácia testovaná za neprítomnosti obmedzení v dôsledku cytotoxicity alebo nerozpustnosti bola 1×10^{-3} M (skúška STTA) a 1×10^{-5} M (skúška VM7Luc ER TA).

([1]) Správa o validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie na stanovenie pôsobenia, ktoré sprostredkúvajú estrogénové receptory, časť B (2).

([2]) Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metóda *in vitro* na určenie agonistov a antagonistov ER [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]) Stredné hodnoty IC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

([4]) To, či dané látky spôsobujú ER STTA, sa predpokladá na základe ich nahlásených účinkov, ktoré sú známe z historických údajov CERI pochádzajúcich zo skúšky viazania na estrogénové receptory, z uterotrofickej skúšky a z informácií z verejne dostupnej literatúry (2).

([5]) Klasifikácia látky ako antagonistu estrogénových receptorov alebo ako látky, ktorá je negatívna, vychádzala z informácií uvedených v podkladových kontrolných dokumentoch (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre skúšky viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (TA) (31), ako aj z informácií získaných z publikácií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER

Základné zložky skúšky

11. Táto testovacia metóda sa vzťahuje na skúšky, v ktorých sa používa stabilne transfektovaný alebo endogénny receptor ERα a stabilne transfektovaný konštrukt reportérového génu riadený jedným alebo viacerými úsekmi estrogénovej reakcie. Môžu však byť prítomné aj iné receptory, napríklad ERβ. Toto sú základné zložky skúšky.

Kontroly

12. Je potrebné opísať základ navrhovaných súbežných referenčných štandardov pre každú skúšku agonistov a antagonistov. Súbežné kontroly (negatívne kontroly, kontroly s rozpúšťadlom a pozitívne kontroly) podľa potreby slúžia ako ukazovateľ toho, že skúška je funkčná v podmienkach testovania, a poskytujú základ pre porovnania medzi jednotlivými pokusmi. Obvykle sú súčasťou kritérií prijateľnosti pre daný pokus (1).

Štandardné postupy kontroly kvality

13. Štandardné postupy kontroly kvality sa majú vykonať podľa príslušných pokynov pre každú skúšku, aby sa zabezpečilo, že bunková línia zostane počas viacerých pasáží stabilná, bez prítomnosti mykoplazmy (t. j. bez bakteriálnej kontaminácie) a schopná poskytovať v priebehu času očakávané reakcie sprostredkované estrogénovými receptormi. Ďalej je potrebné skontrolovať bunkové línie z hľadiska ich správnej identity a prítomnosti iných kontaminantov (napr. húb, kvasiniek a vírusov).

Overovanie spôsobilosti laboratória

14. Pred testovaním neznámych chemikálií pomocou ktorejkoľvek skúšky v rámci tejto testovacej metódy by každé laboratórium malo preukázať spôsobilosť na používanie skúšky. Na preukázanie spôsobilosti každé laboratórium otestuje 14 látok na preukázanie spôsobilosti, ktoré sú uvedené v tabuľke 3 v prípade skúšky agonistov, a 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 4 v prípade skúšky antagonistov. Týmto testovaním spôsobilosti sa potvrdí aj vnímavosť testovacieho systému. Zoznam látok na preukázanie spôsobilosti je podsúborom referenčných látok uvedených v normách výkonnosti pre skúšky ER TA (6). Tieto látky sú komerčne dostupné, predstavujú triedy chemikálií bežne spojené s agonistickým alebo antagonistickým pôsobením na estrogénové receptory, majú vhodný rozsah potencie očakávanej pri agonistoch/antagonistoch estrogénových receptorov (t. j. od silnej po slabú potenciu) a sú medzi nimi aj negatívne látky. Testovanie látok na preukázanie spôsobilosti by sa malo opakovať najmenej dvakrát, v rôznych dňoch. Spôsobilosť sa preukazuje správnou klasifikáciou (pozitívna/negatívna) každej látky na preukázanie spôsobilosti. Testovanie spôsobilosti by mal zopakovať každý laboratórny technik pri učení sa skúšok. V závislosti od typu buniek sa niektoré z týchto látok na preukázanie spôsobilosti môžu správať ako selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM) a vykazovať agonistické aj antagonistické pôsobenie. Látky na preukázanie spôsobilosti sú však v tabuľkách 3 a 4 klasifikované podľa svojho známeho prevažujúceho pôsobenia a to by sa malo použiť na hodnotenie spôsobilosti.

15. Na preukázanie výkonnosti a na účely kontroly kvality by každé laboratórium malo zostaviť historické databázy agonistov a antagonistov s referenčným štandardom (napr. 17β-estradiol a tamoxifén), údaje o pozitívnych a negatívnych kontrolných chemikáliách a kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (napr. DMSO). Na začiatok sa databáza vytvorí zo sérií najmenej 10 nezávislých agonistov (napr. 17β-estradiol) a 10 nezávislých antagonistov (napr. tamoxifén). Databáza sa následne rozšíri o výsledky z budúcich analýz týchto referenčných štandardov a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla, aby sa zabezpečila konzistentnosť a výkonnosť biologickej skúšky vykonávanej laboratóriom v priebehu času.

Tabuľka 3

Zoznam (14) látok na preukázanie spôsobilosti v prípade skúšky agonistov (8)

Č. (7)	Látka	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia (1)	Skúška STTA			Skúška VM7Luc ER TA		Chemická trieda podľa MeSH (5)	Trieda výrobku (6)
				Hodnota PC_{10} (M) (2)	Hodnota PC_{50} (M) (2)	Rozsah test. koncentrácií (M)	Hodnota EC_{50} VM7Luc (M) (3)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) (4)		
14	dietylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	uhľovodík (cyklický)	liek, veterinárne činidlo
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	liek, veterinárne činidlo
15	*mezo*-hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
11	4-*terc*-oktylfenol	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	chemický medziprodukt
9	genisteín	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, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
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	chemický medziprodukt

Č. (7)	Látka	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia (1)	Skúška STTA			Skúška VM7Luc ER TA		Chemická trieda podľa MeSH (5)	Trieda výrobku (6)
				Hodnota PC_{10} (M) (2)	Hodnota PC_{50} (M) (2)	Rozsah test. koncentrácií (M)	Hodnota EC_{50} VM7Luc (M) (3)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) (4)		
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, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt
3	Butylbenzyl ftalát	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	karboxylová kyselina, ester, kyselina ftalová	zmäkčovadlo, priemyselná chemikália
4	*p,p'*- metoxychlór	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	uhľovodík (halogénovaný)	pesticíd, veterinárne činidlo
1	etylparabén	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	karboxylová kyselina, fenol	liek, konzervačný prostriedok
17	atrazín	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	heterocyklická zlúčenina	herbicíd
20	spironolaktón	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	laktón, steroid	liek

Č. (7)	Látka	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia (1)	Skúška STTA			Skúška VM7Luc ER TA		Chemická trieda podľa MeSH (5)	Trieda výrobku (6)
				Hodnota PC_{10} (M) (2)	Hodnota PC_{50} (M) (2)	Rozsah test. koncentrácií (M)	Hodnota EC_{50} VM7Luc (M) (3)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) (4)		
21	ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	heterocyklická zlúčenina	liek
22	reserpín	50-55-5	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	heterocyklická zlúčenina, indol	liek, veterinárne činidlo

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); EC_{50} = polovičná maximálna účinná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna; POS = pozitívna; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrácia testovanej látky, pri ktorej reakcia predstavuje 10 % (alebo 50 % v prípade PC_{50}) reakcie vyvolanej pozitívnou kontrolou (E2, 1 nm) na každej mikrotitračnej platničke.

(1) Klasifikácia látky ako pozitívnej alebo negatívnej, pokiaľ ide o jej agonistické pôsobenie na estrogénové receptory, vychádzala z podkladových kontrolných dokumentov (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre skúšky viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (TA) (31), ako aj z empirických údajov a ďalších informácií získaných z referenčných štúdií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Hodnoty uvedené v návrhu správy o predbežnej validácii a medzilaboratórnej validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie (TA) na stanovenie estrogénového pôsobenia – skúška reportérového génu, ktorého mediátorom je ľudský ERα, s použitím bunkovej línie hER-HeLa-9903 [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) Stredné hodnoty EC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

(4) Nahlásené koncentrácie boli najvyššie testované koncentrácie (test na zistenie rozsahu) počas validácie skúšky VM7Luc ER TA. Ak sa koncentrácie medzi laboratóriami líšili, nahlásená bola najvyššia koncentrácia. Pozri tabuľku 4-10 v Hodnotiacej správe výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-Cell® ER (VM7Luc ER TA): Skúška *in vitro* na identifikáciu agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií na estrogénové receptory ľudí [ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals] (3).

(5) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

(7) Podľa tabuľky 1 noriem výkonnosti [Zoznam referenčných chemikálií (22) na hodnotenie presnosti agonistov estrogénových receptorov] (6).

(8) Ak látka na preukázanie spôsobilosti už nie je komerčne dostupná, možno použiť látku s rovnakou klasifikáciou a porovnateľnou potenciou, spôsobom účinku a chemickou triedou.

Tabuľka 4

Zoznam (10) látok na preukázanie spôsobilosti v prípade skúšky antagonistov

	Látka (1)	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA (2)			Skúška VM7Luc ER TA (3)			Potenciálne účinky ER STTA (2)	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM (6)	Chemická trieda podľa MeSH (7)	Trieda výrobku (8)
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	IC_{50} (M)	Rozsah test. konc. (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	IC_{50} (4) (M)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) (5)				
1	4-hydroxytamoxifén	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
2	raloxifén HC1	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
3	tamoxifén	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	uhľovodík (cyklický)	liek
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	má byť negatívna (*)	PN	steroid	liek, veterinárne činidlo
5	apigenín	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	heterocyklická zlúčenina	farbivo, prírodný produkt, farmaceutický medziprodukt
6	di-n-butyl ftalát	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	ester, kyselina ftalová	kozmetická zložka, priemyselná chemikália, zmäkčovadlo

	Látka (1)	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA (2)			Skúška VM7Luc ER TA (3)			Potenciálne účinky ER STTA (2)	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM (6)	Chemická trieda podľa MeSH (7)	Trieda výrobku (8)
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	IC_{50} (M)	Rozsah test. konc. (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	IC_{50} (4) (M)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) (5)				
7	flavón	525-82-6	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	má byť negatívna (*)	PN	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
8	genisteín	446-72-0	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	má byť negatívna (*)	NEG	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	netestované	NEG	fenol	chemický medziprodukt
10	resveratrol	501-36-0	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	má byť negatívna (*)	NEG	uhľovodík (cyklický)	prírodný produkt

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); M = molárna; IC_{50} = polovičná maximálna inhibičná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna, PN = predpokladaná negatívna; POS = pozitívna.

(*) klasifikovaná ako negatívna podľa preskúmania literatúry (2).

(1) Bežné látky testované v skúškach STTA a VM7Luc ER TA, ktoré boli označené ako antagonisty estrogénových receptorov alebo ako negatívne a ktoré boli použité na vyhodnotenie presnosti vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA (2) (3).

(2) Správa o validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie na stanovenie pôsobenia, ktoré sprostredkúvajú estrogénové receptory, časť B (2).

(3) Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metóda *in vitro* na určenie agonistov a antagonistov ER [ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists] (3).

(4) Stredné hodnoty IC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

(5) Nahlásené koncentrácie boli najvyššie testované koncentrácie (test na zistenie rozsahu) počas validácie skúšky VM7Luc ER TA. Ak sa koncentrácie medzi laboratóriami líšili, nahlásená bola najvyššia koncentrácia. Pozri tabuľku 4-11 v Hodnotiacej správe výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-Cell® ER (VM7Luc ER TA): Skúška *in vitro* na identifikáciu agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií na estrogénové receptory ľudí [ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals] (3).

(6) Klasifikácia látky ako antagonistu estrogénových receptorov alebo ako látky, ktorá je negatívna, vychádzala z informácií uvedených v podkladových kontrolných dokumentoch (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre testovacie metódy viazania na estrogénové receptory a testovacie metódy transaktivácie (TA) (31), ako aj z informácií získaných z publikácií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

(7) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(8) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Kritériá prijateľnosti testovacích cyklov

16. Prijatie alebo zamietnutie testovacieho cyklu je založené na hodnotení výsledkov získaných pri referenčných štandardoch a kontrolách použitých pri jednotlivých pokusoch. Hodnoty PC_{50} (EC_{50}) alebo IC_{50} v prípade referenčných štandardov by mali spĺňať kritériá prijateľnosti, ako sa stanovuje pre vybranú skúšku (v prípade STTA pozri dodatok 2, v prípade VM7Luc ER TA pozri dodatok 3), a všetky pozitívne/negatívne kontroly by mali byť správne klasifikované pre každý prijatý pokus. Schopnosť dôkladne vykonať skúšku by sa mala preukázať vytvorením a udržiavaním historickej databázy referenčných štandardov a kontrol (pozri odsek 15). Na meranie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti možno použiť štandardné odchýlky (SD) alebo variačné koeficienty (CV) pre stredné hodnoty parametrov na zostrojenie krivky referenčných noriem z viacerých pokusov. Okrem toho by mali byť splnené tieto zásady týkajúce sa kritérií prijateľnosti:

— Údaje by mali byť dostatočné na kvantitatívne hodnotenie aktivácie (v prípade skúšky agonistov) alebo potlačenia estrogénových receptorov (v prípade skúšky antagonistov) (t. j. účinnosti a potencie).

— Stredná hodnota aktivity reportérových génov musí byť pri referenčnej koncentrácii referenčného estrogénu najmenej minimálna hodnota určená v skúškach týkajúcich sa hodnoty pri kontrole s nosičom (rozpúšťadlom), aby sa zabezpečila primeraná citlivosť. Pokiaľ ide o skúšky STTA a VM7Luc ER TA, je to štvornásobok strednej hodnoty v kontrole s nosičom na každej mikrotitračnej platničke.

— Testované koncentrácie musia zostať v rozpätí rozpustnosti testovaných chemikálií a nesmú vykazovať cytotoxicitu.

Analýza údajov

17. Na klasifikáciu pozitívnej a negatívnej reakcie sa použije postup interpretácie údajov stanovený pre každú skúšku.

18. Splnenie kritérií prijateľnosti (odsek 16) naznačuje, že skúška funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testovacieho cyklu vyplynú presné údaje. Zopakovanie výsledkov prvého cyklu je najlepší ukazovateľ toho, že boli generované presné údaje. Ak dva cykly poskytnú reprodukovateľné výsledky (napr. z oboch testovacích cyklov vyplýva, že testovaná chemikália je pozitívna), nie je potrebné vykonať tretí cyklus.

19. Ak dva cykly neprinesú reprodukovateľné výsledky (napr. testovaná chemikália je pozitívna pri jednom cykle a negatívna pri druhom cykle) alebo ak sa vyžaduje vyššia miera istoty, pokiaľ ide o výsledok tejto skúšky, mali by sa vykonať aspoň tri nezávislé cykly. V tomto prípade je klasifikácia založená na dvoch zhodných výsledkoch z troch.

Všeobecné kritériá interpretácie údajov

20. V súčasnosti neexistuje všeobecne dohodnutá metóda na interpretáciu údajov o transaktivácii estrogénových receptorov (ER TA). Oba typy posudzovania pôsobenia, ktoré sprostredkúvajú estrogénové receptory, t. j. kvalitatívne hodnotenie (napr. či sú výsledky pozitívne/negatívne) aj kvantitatívne hodnotenie (napr. určenie hodnôt EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}), by však mali byť založené na empirických údajoch a spoľahlivom vedeckom úsudku. Ak je to možné, pozitívne výsledky by mali byť charakterizované rozsahom účinku v porovnaní s kontrolou s nosičom (rozpúšťadlom) alebo s referenčným estrogénom a koncentráciou, pri ktorej účinok nastáva (napr. hodnoty EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} atď.).

Správa o teste

21. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Skúška:

— použitá skúška,

— kontrola/referenčný štandard/testovaná chemikália,

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— opis (povaha, dodávateľ a šarža),

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

— typ a zdroj buniek:

  • je prítomná endogénna expresia estrogénového receptora? Ak nie, ktorý receptor, resp. ktoré receptory boli transfektované?

  • použitý reportérový génový konštrukt, resp. konštrukty (vrátane zdrojových druhov),

  • metóda transfekcie,

  • metóda výberu na udržiavanie stabilnej transfekcie (ak sa uplatňuje),

  • je metóda transfekcie relevantná pre stabilné línie?

— počet pasáží (od rozmrazenia),

— počet pasáží buniek pri rozmrazovaní,

— metódy udržiavania bunkových kultúr.

Podmienky testovania:

— obmedzenia spojené s rozpustnosťou,

— opis použitých metód hodnotenia životaschopnosti,

— skladba média, koncentrácia CO_2,

— koncentrácie testovanej chemikálie,

— objem nosiča a pridanej testovanej chemikálie,

— teplota a vlhkosť pri inkubácii,

— trvanie aplikovania,

— hustota buniek na začiatku a počas aplikovania,

— pozitívne a negatívne referenčné štandardy,

— reportérové reagenty (názov výrobku, dodávateľ a šarža),

— kritériá na hodnotenie testovacích cyklov ako cyklov poskytujúcich pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné výsledky.

Kontrola prijateľnosti:

— násobné indukcie pre každú mikrotitračnú platničku v rámci skúšky a informácie, či spĺňajú minimum, ktoré sa požaduje v danej skúške na základe historických kontrol,

— skutočné hodnoty pre kritériá prijateľnosti, napr. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ a hodnoty sklonu krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope), pre súbežné pozitívne kontroly/referenčné štandardy.

Výsledky:

— nespracované a normalizované údaje,

— úroveň maximálnej násobnej indukcie,

— údaje o cytotoxicite,

— najnižšia účinná koncentrácia (LEC), ak existuje,

— hodnoty RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} a/alebo EC_{50}, podľa potreby,

— ak je to možné, závislosť medzi koncentráciou a reakciou,

— štatistické analýzy, ak existujú, spolu s meraním chyby a spoľahlivosti (napr. SEM, SD, CV alebo 95 % CI) a opis spôsobu získania týchto hodnôt.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

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

(2) OECD (2015). *Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists*, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): s. 5367 – 73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): s. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20-6.

(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): s. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 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): s. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al*. (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): s. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al*. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 91-98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): s. 81-118.

(16) Escande A. *et al*. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): s. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): s. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al*. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122-126.

(22) Enmark E. *et al*. (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): s. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al*. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al*. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al*. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): s. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515-522.

(29) Gorski J. *et al*. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):s. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV A SKRATKY

Kritériá prijateľnosti: minimálne normy výkonnosti kontrol a referenčných štandardov v rámci pokusu. Všetky kritériá prijateľnosti majú byť splnené, aby sa pokus považoval za platný.

Presnosť (zhoda): miera zhody výsledkov skúšky s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti skúšky a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov skúšky (1).

Agonista: látka, ktorá vyvoláva reakciu, napr. transkripciu, keď sa viaže na konkrétny receptor.

Antagonista: druh receptorového ligandu alebo chemikálie, ktorý sám osebe nevyvoláva biologickú reakciu po naviazaní na receptor, ale blokuje alebo tlmí reakcie sprostredkované agonistom.

Antiestrogénové pôsobenie: schopnosť chemikálie potlačiť účinok 17ß-estradiolu sprostredkovaný estrogénovými receptormi.

Morfológia bunky: tvar a vzhľad buniek, ktoré rastú v monovrstve v jednej jamke platne s tkanivovou kultúrou. Umierajúce bunky majú často abnormálnu morfológiu.

CF: koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

Ošetrenie uhlím/dextránom: ošetrenie séra použitého v bunkovej kultúre. Ošetrením uhlím/dextránom (často označované ako „stripping“) sa odstraňujú endogénne hormóny a proteíny viažuce hormóny.

Chemikália: látka alebo zmes.

Cytotoxicita: škodlivé účinky na štruktúru alebo funkciu bunky, ktoré môžu v konečnom dôsledku spôsobiť smrť buniek a môžu sa prejavovať znížením počtu buniek prítomných v jamke na konci času expozície alebo znížením schopnosti merať danú funkciu bunky v porovnaní so súbežnou kontrolou s nosičom.

CV: variačný koeficient.

DCC-FBS: bovinné fetálne sérum ošetrené uhlím povrchovo upraveným dextránom.

DMEM: Dulbeccova modifikácia Eaglovho kultivačného média.

DMSO: dimetylsulfoxid.

E2: 17β-estradiol.

EC_{50}: polovičná maximálna účinná koncentrácia testovanej chemikálie.

ED: narušenie endokrinného systému.

hERα: ľudský estrogénový receptor alfa.

hERß: ľudský estrogénový receptor beta.

EFM: kultivačné médium bez estrogénov. Dulbeccova modifikácia Eaglovho kultivačného média (DMEM) doplnená o 4,5 % FBS ošetrené uhlím povrchovo upraveným dextránom, 1,9 % L-glutamín a 0,9 % Pen-Strep.

ER: estrogénový receptor.

ERE: úsek estrogénovej reakcie.

Estrogénové pôsobenie: schopnosť chemikálie napodobniť 17β-estradiol v jeho schopnosti viazať a aktivovať estrogénové receptory. Touto testovacou metódou možno určiť estrogénové pôsobenie sprostredkované receptorom hERα.

ERTA: transaktivácia estrogénových receptorov.

FBS: bovinné fetálne sérum.

HeLa: nesmrteľná bunková línia ľudských buniek z krčka maternice.

HeLa9903: bunkový subklon HeLa, do ktorého bol stabilne transfektovaný receptor hERα a reportérový gén luciferázy.

IC_{50}: polovičná maximálna účinná koncentrácia inhibičnej testovanej chemikálie.

ICCVAM: Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov predbežnej validácie a validácie a udáva sa ňou rozsah, v akom možno skúšku úspešne preniesť medzi laboratóriami. Označuje sa aj ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (1).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (1).

LEC: najnižšia účinná koncentrácia – je to najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá vyvoláva reakciu (t. j. najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je násobná indukcia štatisticky odlišná od súbežnej kontroly s nosičom).

Test Me-too: hovorový názov skúšky, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Môže sa používať namiesto výrazu podobná testovacia metóda.

MT: metalotioneín.

MMTV: vírus nádoru mliečnych žliaz myší.

OHT: 4-hydroxytamoxifén.

PBTG: usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti.

PC (pozitívna kontrola): silne účinná látka, najlepšie 17ß-estradiol, ktorá je zahrnutá vo všetkých testoch na zaistenie správneho fungovania skúšky.

PC_{10}: koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej merané pôsobenie v skúške agonistov predstavuje 10 % maximálneho pôsobenia vyvolaného pozitívnou kontrolou (E2 pri koncentrácii 1 nM pri skúške STTA) na každej mikrotitračnej platničke.

PC_{50}: koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej merané pôsobenie v skúške agonistov je 50 % maximálneho pôsobenia vyvolaného pozitívnou kontrolou (E2 pri referenčnej koncentrácii špecifikovanej v testovacej metóde) na každej mikrotitračnej platničke.

PC_{Max}: koncentrácia testovanej chemikálie vyvolávajúca RPC_{Max}.

Normy výkonnosti: normy založené na validovanej skúške, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej skúšky, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: 1. nevyhnutné zložky skúšky; 2. minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a 3. porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná skúška mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (1).

Látky na preukázanie spôsobilosti: podskupina referenčných látok zahrnutých do noriem výkonnosti, ktorú môžu laboratóriá použiť na preukázanie technickej spôsobilosti na vykonávanie štandardizovanej testovacej metódy. Kritériá výberu pre tieto látky zvyčajne zahŕňajú podmienku, že látky predstavujú daný rozsah reakcií, sú komerčne dostupné a sú o nich k dispozícii referenčné údaje vysokej kvality.

Spôsobilosť: preukázaná schopnosť správne vykonať skúšku pred testovaním neznámych látok.

Referenčný estrogén (pozitívna kontrola, PC): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenčný štandard: referenčná látka použitá na preukázanie primeranosti skúšky. 17β-estradiol je referenčným štandardom pre skúšky STTA a VM7Luc ER TA.

Referenčné testovacie metódy: skúšky, o ktoré sa PBTG 455 opiera.

Relevantnosť: opis vzťahu skúšky k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa skúškou správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) skúšky (1).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže skúška počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti.

RLU: relatívne svetelné jednotky.

RNA: kyselina ribonukleová.

RPC_{Max}: maximálna úroveň reakcie vyvolanej testovanou chemikáliou, vyjadrená ako percentuálny podiel reakcie vyvolanej pri koncentrácii 1 nM E2 na rovnakej mikrotitračnej platničke.

RPMI: kultivačné médium RPMI 1 640 doplnené o 0,9 % Pen-Strep a 8,0 % bovinné fetálne sérum (FBS).

Testovací cyklus: individuálny pokus, pri ktorom sa vyhodnocuje chemické pôsobenie na biologický výsledok skúšky. Každý testovací cyklus je kompletný pokus vykonaný na replikovaných jamkách s bunkami naočkovanými zo spoločného zdroja buniek v rovnakom čase.

Nezávislý testovací cyklus: samostatný, nezávislý pokus na vyhodnotenie chemického pôsobenia na biologický výsledok skúšky, v ktorom sa použijú bunky z iného zdroja, čerstvo zriedené chemikálie a ktorý sa vykoná v rôznych dňoch, prípadne v rovnaký deň, ale vykonajú ho iní pracovníci.

SD: štandardná odchýlka.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/účinných látok správne klasifikovaných skúškou. Je to miera presnosti skúšky, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a zároveň dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti skúšky (1).

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neúčinných látok správne klasifikovaných testom. Je to miera presnosti skúšky, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a zároveň dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti skúšky (1).

Stabilná transfekcia: prenos DNA do kultivovaných buniek takým spôsobom, že sa stabilne začlení do genómu buniek, čo vedie k stabilnej expresii transfektovaných génov. Na výber klonov stabilne transfektovaných buniek slúžia stabilné markery (napr. rezistencia voči G418).

Skúška STTA: skúška stabilne transfektovanej transaktivácie, skúška transkripčnej aktivácie ERα pomocou bunkovej línie HeLa 9 903.

Štúdia: úplný rozsah experimentálnej práce uskutočnenej s cieľom vyhodnotiť jednu špecifickú látku pomocou špecifickej skúšky. Súčasťou štúdie sú všetky kroky vrátane testov riedenia testovanej látky v testovacích médiách, predbežných testovacích cyklov na zistenie rozsahu, všetkých potrebných komplexných testovacích cyklov, analýz údajov, zabezpečenia kvality, posúdení cytotoxicity atď. Uskutočnenie štúdie umožňuje klasifikovať pôsobenie testovanej chemikálie na cieľ toxicity (t. j. výsledky poukazujúce na účinnú látku, neúčinnú látku alebo nejednoznačné výsledky), ktoré sa hodnotí prostredníctvom použitej skúšky, a umožňuje vyvodiť odhad potencie vzhľadom na pozitívnu referenčnú chemikáliu.

Látka: v zmysle nariadenia REACH ([1]) sa látka vymedzuje ako chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorá však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia. Veľmi podobné vymedzenie pojmu sa používa v kontexte GHS OSN (1).

TA (transaktivácia): iniciácia syntézy mRNA v reakcii na špecifický chemický signál, napríklad naviazanie estrogénu na estrogénový receptor.

Skúška: v kontexte tejto testovacej metódy je skúška jednou z metodík, ktoré sa akceptujú ako platné z hľadiska splnenia stanovených kritérií výkonnosti. Medzi zložky skúšky patrí napríklad špecifická bunková línia so súvisiacimi kultivačnými podmienkami, špecifické kultivačné médiá, v ktorých sa test uskutočňuje, podmienky usporiadania mikrotitračných platničiek, usporiadanie a riedenia testovaných chemikálií spolu s inými požadovanými opatreniami na kontrolu kvality a súvisiacimi krokmi na hodnotenie údajov.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Transkripcia: syntéza mRNA.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Validovaná testovacia metóda: skúška, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (1).

Validácia: proces, ktorým sa stanovuje spoľahlivosť a relevantnosť určitého prístupu, metódy, skúšky, postupu alebo posúdenia na vymedzený účel (1).

VC (kontrola s nosičom): rozpúšťadlo, ktoré slúži na rozpustenie testovaných a kontrolných chemikálií, sa testuje len ako nosič bez rozpustenej chemikálie.

VM7: imortalizovaná bunka adenokarcinómu, pri ktorej dochádza k endogénnej expresii estrogénového receptora.

VM7Luc4E2: bunková línia VM7Luc4E2 bola odvodená od imortalizovaných buniek adenokarcinómu odvodených od ľudských buniek, pri ktorých dochádza k endogénnej expresii oboch foriem estrogénového receptora (ERα a ERβ) a ktoré boli stabilne transfektované pomocou plazmidu pGudLuc7.ERE. Tento plazmid obsahuje štyri kópie syntetického oligonukleotidu, ktorý obsahuje úsek estrogénovej reakcie pred oblasťou promótora MMTV (vírusu nádoru mliečnych žliaz myší) a gén luciferázy svetlušky svätojánskej.

Slabá pozitívna kontrola: slabo účinná látka vybratá zo zoznamu referenčných chemikálií, ktorá je zahrnutá vo všetkých testoch na zaistenie správneho fungovania skúšky.

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Ú. v. EÚ L 304, 22.11.2007, s. 1).

Dodatok 2

SKÚŠKA NA ZÁKLADE TRANSAKTIVÁCIE STABILNE TRANSFEKTOVANÉHO ĽUDSKÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA A NA URČENIE ESTROGÉNOVÉHO AGONISTICKÉHO A ANTAGONISTICKÉHO PÔSOBENIA CHEMIKÁLIÍ POMOCOU BUNKOVEJ LÍNIE HERA-HELA-9903

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške transaktivácie (TA) sa využíva bunková línia hERα-HeLa-9 903 na stanovenie estrogénového agonistického pôsobenia sprostredkovaného ľudským estrogénovým receptorom alfa (hERα). Validačná štúdia skúšky stabilne transfektovanej transaktivácie (STTA) uskutočnená japonským inštitútom pre hodnotenie chemikálií a výskum (CERI) pomocou bunkovej línie hERα-HeLa-9 903 na stanovenie estrogénového agonistického a antagonistického pôsobenia sprostredkovaného ľudským estrogénovým receptorom alfa (hERα) preukázala relevantnosť a spoľahlivosť skúšky na zamýšľaný účel (1).

2. Táto skúška je osobitne navrhnutá na detekciu transaktivácie sprostredkovanej receptorom hERα, pričom ako sledovaný parameter sa meria chemiluminiscencia. Pri koncentráciách fytoestrogénu vyšších ako 1 μM sa však uvádzal výskyt luminiscenčných signálov, ktoré neboli sprostredkované receptorom, a to pre nadmernú aktiváciu reportérového génu luciferázy (2) (3). Zatiaľ čo z krivky závislosti odozvy od dávky vyplýva, že ku skutočnej aktivácii systému estrogénových receptorov dochádza pri nižších koncentráciách, v systémoch skúšok stabilne transfektovanej transaktivácie estrogénových receptorov (dodatok 1) je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo podobných zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch.

3. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti VŠEOBECNÝ ÚVOD a ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tomto usmernení na vykonávanie testov sú uvedené v dodatku 2.1.

PRINCÍP SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

4. Skúška slúži na signalizovanie väzby estrogénového receptora s ligandom. Po naviazaní ligandu sa komplex receptora a ligandu premiestni do jadra, kde sa naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén luciferázy svetlušky svätojánskej, čo vedie k zvýšenej bunkovej expresii enzýmu luciferázy. Luciferín je látka, ktorá sa prostredníctvom enzýmu luciferázy transformuje na bioluminiscenčný produkt, ktorý možno kvantitatívne merať pomocou luminometra. Pôsobenie luciferázy možno rýchlo a lacno vyhodnotiť pomocou viacerých komerčne dostupných testovacích súprav.

5. Tento testovací systém využíva bunkovú líniu hERα-HeLa-9 903, ktorá je odvodená od ľudského tumoru krčka maternice, s dvoma stabilne vloženými konštruktmi: i) konštrukt expresie hERα (ktorým sa kóduje ľudský receptor s plnou dĺžkou) a ii) reportérový konštrukt luciferázy svetlušky svätojánskej, ktorý nesie päť tandemových opakovaní úseku estrogénovej reakcie (ERE) vitelogenínu, riadený úsekom TATA promótora myšacieho metalotioneínu (MT). Najlepšia výkonnosť sa preukázala pri génovom konštrukte TATA myšacieho metalotioneínu, ktorý sa preto bežne používa. Pomocou tejto bunkovej línie hERα-HeLa-9 903 tak možno merať schopnosť testovanej chemikálie vyvolať transaktiváciu expresie génu luciferázy sprostredkovanú receptorom hERα.

6. V prípade skúšky agonistu ER vychádza interpretácia údajov z toho, či maximálna úroveň reakcie vyvolaná testovanou chemikáliou je alebo nie je rovnaká, prípadne vyššia, ako agonistická reakcia rovnajúca sa 10 % reakcie, ktorú vyvoláva koncentrácia pozitívnej kontroly (PC), teda 17β-estradiolu (E2), s maximálnou indukciou (1 nM) (t. j. PC_{10}). V prípade skúšky antagonistu ER vychádza interpretácia údajov z toho, či reakcia vykazuje alebo nevykazuje najmenej 30 % zníženie pôsobenia oproti reakcii vyvolanej obohatenou kontrolou (25 pM E2) bez cytotoxicity. V odsekoch 34 – 48 sa podrobne opisuje analýza a interpretácia údajov.

POSTUP

Bunkové línie

7. Na túto skúšku sa používa stabilne transfektovaná bunková línia hERα-HeLa-9 903. Túto bunkovú líniu možno získať z bunkovej banky japonskej zbierky výskumných biologických zdrojov (JCRB) ([1]) po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA).

8. Pri testovaní sa používajú len bunky charakterizované neprítomnosťou mykoplazmy. Uprednostňovanou metódou na citlivú detekciu mykoplazmatickej infekcie je polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (RT-PCR) (4) (5) (6).

Stabilita bunkovej línie

9. Na monitorovanie stability bunkovej línie sa majú v rámci skúšky agonistu použiť ako referenčné štandardy E2, 17α-estradiol, 17α-metyltestosterón a kortikosterón a minimálne raz počas každej skúšky má sa vykonať meranie úplnej krivky závislosti reakcie od koncentrácie v testovanom rozsahu koncentrácie uvedenom v tabuľke 1, pričom výsledky sa majú zhodovať s výsledkami uvedenými v tabuľke 1.

10. V prípade skúšky antagonistu sa súčasne pri každom testovacom cykle vykoná meranie úplných kriviek koncentrácie pre dva referenčné štandardy, tamoxifén a flutamid. Pri oboch chemikáliách je potrebné monitorovať správnu pozitívnu alebo negatívnu kvalitatívnu klasifikáciu.

Bunková kultúra a podmienky očkovania

11. Bunky sa uchovávajú v minimálnom základnom médiu podľa Eagla (EMEM) bez fenolovej červene, s pridaním 60 mg/l antibiotika kanamycínu a 10 % bovinného fetálneho séra ošetreného uhlím povrchovo upraveného dextránom (DCC-FBS) v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2) pri teplote 37 °C ±1 °C. Pri dosiahnutí 75 – 90 % konfluencie možno bunky subkultivovať po 10 ml v objemoch $0{,}4 \times 10^5 - 1 \times 10^5$ buniek/ml na miskách pre bunkové kultúry s priemerom 100 mm. Bunky sa zmiešajú v podobe suspenzie s 10 % kultivačným médiom FBS-EMEM (ktoré je rovnaké ako médium EMEM so sérom DCC-FBS) a potom sa naočkujú do jamiek mikrotitračnej platničky s hustotou 1×10^4 buniek/(100 µl × jamka). Následne sa bunky počas 3 hodín pred expozíciou chemikálii preinkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom 5 % CO_2 pri teplote 37 °C ±1 °C. Plastové nádoby nesmú vykazovať žiadne estrogénové pôsobenie.

12. S cieľom zachovať integritu reakcie je potrebné bunky kultivovať vo viac než jednej pasáži zo zmrazenej kmeňovej kultúry v upravenom médiu a nemali by sa kultivovať vo viac než 40 pasážach. V prípade bunkovej línie hERα-HeLa-9 903 to bude trvať kratšie ako tri mesiace. Ak však bunky rastú v nevhodných kultivačných podmienkach, ich výkonnosť sa môže znížiť.

13. Médium DCC-FBS možno pripraviť podľa opisu v dodatku 2.2 alebo získať z komerčných zdrojov.

Kritériá prijateľnosti

Pozitívne a negatívne referenčné štandardy pre skúšku agonistu ER

14. Pred štúdiou a počas nej je potrebné overiť vnímavosť testovacieho systému pomocou vhodných koncentrácií silného estrogénu: E2, slabého estrogénu (17α-estradiol), veľmi slabého agonistu (17α-metyltestosterón) a negatívnej látky (kortikosterón). V tabuľke 1 sú uvedené prijateľné rozsahy hodnôt odvodené z validačnej štúdie (1). Tieto štyri súbežné referenčné štandardy majú byť súčasťou každého pokusu, pričom výsledky majú patriť do stanoveného rozsahu prijateľných hodnôt. V opačnom prípade je potrebné určiť príčinu nesplnenia kritérií prijateľnosti (napr. manipulovanie s bunkami, sérum a antibiotikum z hľadiska kvality a koncentrácie) a zopakovať skúšku. Po splnení kritérií prijateľnosti je nevyhnutné konzistentné používanie materiálov na kultivovanie buniek, aby sa zabezpečilo

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonsko, faxové číslo: +81 72 641 9812.

minimálne kolísanie hodnôt EC_{50}, PC_{50} a PC_{10}. Pomocou štyroch súbežných referenčných štandardov, ktoré majú byť súčasťou každého pokusu (uskutočnené za rovnakých podmienok vrátane materiálov, úrovne pasážovania buniek a odborných pracovníkov), možno zaistiť citlivosť skúšky, keďže hodnoty PC_{10} troch pozitívnych referenčných štandardov majú patriť do prijateľného rozsahu, rovnako ako hodnoty PC_{50} a EC_{50}, pokiaľ ich možno vypočítať (pozri tabuľku 1).

Tabuľka 1

Hodnoty prijateľného rozsahu štyroch referenčných štandardov pre skúšku agonistu ER

Názov	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill slope)	Testovací rozsah
17β-estradiol (E2) číslo CAS: 50-28-2	−11,4 ~ −10,1	<−11	−11,3 ~ −10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8}M
17α-estradiol číslo CAS: 57-91-0	−9,6 ~ −8,1	−10,7 ~ −9,3	−9,6 ~ −8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6}M
kortikosterón číslo CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10} ~ 10^{-4}M
17α-metyltestosterón číslo CAS: 58-18-4	−6,0 ~ −5,1	−8,0 ~ −6,2	—	—	10^{-11} ~ 10^{-5}M

Pozitívne a negatívne referenčné štandardy pre skúšku antagonistu ER

15. Pred štúdiou a počas nej je potrebné overiť vnímavosť testovacieho systému pomocou vhodných koncentrácií pozitívnej látky (tamoxifén) a negatívnej látky (flutamid). V tabuľke 2 sú uvedené prijateľné rozsahy hodnôt odvodené z validačnej štúdie (1). Tieto dva súbežné referenčné štandardy majú byť súčasťou každého pokusu, pričom výsledky sa majú vyhodnotiť ako správne v súlade s kritériami. V opačnom prípade je potrebné určiť príčinu nesplnenia kritérií (napr. manipulovanie s bunkami, sérum a antibiotikum z hľadiska kvality a koncentrácie) a zopakovať skúšku. Okrem toho je potrebné vypočítať hodnoty IC_{50} pre pozitívnu látku (tamoxifén), pričom výsledky majú patriť do stanoveného rozsahu prijateľných hodnôt. Po splnení kritérií prijateľnosti je nevyhnutné konzistentné používanie materiálov na kultivovanie buniek, aby sa zabezpečilo minimálne kolísanie hodnôt IC_{50}. Pomocou týchto dvoch súbežných referenčných štandardov, ktoré majú byť súčasťou každého pokusu (uskutočnené za rovnakých podmienok vrátane materiálov, úrovne pasážovania buniek a odborných pracovníkov), možno zaistiť citlivosť skúšky (pozri tabuľku 2).

Tabuľka 2

Kritériá a hodnoty prijateľného rozsahu dvoch referenčných štandardov pre skúšku antagonistu ER

Názov	Kritériá	$LogIC_{50}$	Testovací rozsah
tamoxifén číslo CAS: 10540-29-1	pozitívne: je potrebné vypočítať IC_{50}	−5,942 ~ −7,596	10^{-10} ~ 10^{-5} M
flutamid číslo CAS: 13311-84-7	negatívne: nie je potrebné vypočítať IC_{30}	—	10^{-10} ~ 10^{-5} M

Pozitívne kontroly a kontroly s nosičom

16. Pozitívna kontrola (PC) pre skúšku agonistu ER (1 nM E2) a pre skúšku antagonistu ER (10 μM TAM) sa má na každej mikrotitračnej platničke testovať najmenej trojmo. Nosič, ktorý sa používa na rozpustenie testovanej chemikálie, sa má na každej mikrotitračnej platničke testovať najmenej trojmo ako kontrola s nosičom (VC). Ak sa pri pozitívnej kontrole používa iný nosič ako pri testovanej chemikálii, okrem tejto kontroly s nosičom sa má testovať ďalšia kontrola s nosičom najmenej trojmo na rovnakej mikrotitračnej platničke s pozitívnou kontrolou.

Kritériá kvality pre skúšku agonistu ER

17. Stredná hodnota aktivity luciferázy pozitívnej kontroly (1 nM E2) má predstavovať najmenej štvornásobok strednej hodnoty kontroly s nosičom na každej mikrotitračnej platničke. Toto kritérium je stanovené na základe spoľahlivosti hodnôt sledovaných parametrov z validačnej štúdie (historicky v rozsahu štvornásobku až tridsaťnásobku).

18. Vzhľadom na kontrolu kvality skúšky má byť násobná indukcia zodpovedajúca hodnote PC_{10} súbežnej pozitívnej kontroly (1 nM E2) väčšia než 1+2 SD hodnoty násobnej indukcie (= 1) súbežnej kontroly s nosičom. Na účely stanovania priorít môže byť hodnota PC_{10} užitočná na zjednodušenie požadovanej analýzy údajov v porovnaní so štatistickou analýzou. Hoci štatistická analýza poskytuje informácie o významnosti, takáto analýza nepredstavuje kvantitatívny parameter, pokiaľ ide o potenciál z hľadiska koncentrácie, a preto je na účely stanovenia priorít menej užitočná.

Kritériá kvality pre skúšku antagonistu ER

19. Stredná hodnota aktivity luciferázy obohatenej kontroly (25 pM E2) má predstavovať najmenej štvornásobok strednej hodnoty kontroly s nosičom na každej mikrotitračnej platničke. Toto kritérium je stanovené na základe spoľahlivosti hodnôt sledovaných parametrov z validačnej štúdie.

20. Pokiaľ ide o kontrolu kvality skúšky, relatívna transkripčná aktivácia (RTA) 1 nM E2 má byť väčšia ako 100 %, RTA 1 μM 4-hydroxytamoxifénu (OHT) má byť menšia ako 40,6 % a RTA 100 μM digitonínu (Dig) má byť menšia ako 0 %.

Preukazovanie spôsobilosti laboratória (pozri odsek 14 a tabuľky 3 a 4 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER tejto testovacej metódy).

Nosič

21. Ako súbežná kontrola s nosičom sa použije dimetylsulfoxid (DMSO) alebo vhodné rozpúšťadlo v rovnakej koncentrácii, aká sa použila pri rozličných pozitívnych a negatívnych kontrolách a testovaných chemikáliách. Testované chemikálie sa rozpustia v rozpúšťadle, ktoré rozpúšťa testovanú chemikáliu a je miešateľné s bunkovým kultivačným médiom. Vhodnými nosičmi sú voda, etanol (s čistotou 95 % až 100 %) a DMSO. V prípade použitia DMSO nemá úroveň prekročiť 0,1 obj. %. Pri každom nosiči je potrebné preukázať, že maximálny použitý objem nie je cytotoxický a nenarušuje výkonnosť skúšky.

Príprava testovaných chemikálií

22. Testované chemikálie sa vo všeobecnosti rozpustia v DMSO alebo inom vhodnom rozpúšťadle a sériovo sa zriedia s rovnakým rozpúšťadlom v bežnom pomere 1:10, čím sa pripravia roztoky určené na riedenie s kultivačnými médiami.

Rozpustnosť a cytotoxicita: Úvahy týkajúce sa zisťovania rozsahu

23. Je potrebné vykonať predbežný test s cieľom určiť vhodný rozsah koncentrácií chemikálie, ktorá sa má testovať, a presvedčiť sa, či pri testovanej chemikálii môžu vyskytnúť problémy z hľadiska rozpustnosti a cytotoxicity. Na začiatku sa chemikálie testujú po maximálnu koncentráciu 1 μl/ml, 1 mg/ml alebo 1 mM, podľa toho, ktorá je najnižšia. Na základe rozsahu cytotoxicity alebo nedostatočnej rozpustnosti zistenej v predbežnom teste sa pri prvom reálnom testovacom cykle chemikália testuje pri logaritmických sériových riedeniach, pričom sa začína od maximálnej prijateľnej koncentrácie (napr. 1 mM, 100 μM, 10 μM atď.) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny alebo výskyt cytotoxicity. Koncentrácie v druhom a podľa potreby v treťom testovacom cykle sa príslušne upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie a aby sa predišlo používaniu koncentrácií, pri ktorých sa zistí nerozpustnosť alebo nadmerná cytotoxicita.

24. Pri agonistoch a antagonistoch ER môže prítomnosť zvyšujúcich sa úrovní cytotoxicity výrazne ovplyvniť alebo vylúčiť typickú sigmoidálnu reakciu, čo je potrebné vziať do úvahy pri interpretácii údajov. Použiť sa majú metódy na testovanie cytotoxicity, pomocou ktorých možno získať informácie o 80 % životaschopnosti buniek, a to využitím vhodnej skúšky na základe skúseností laboratória.

25. Ak by z výsledkov testu cytotoxicity vyplynulo, že daná koncentrácia testovanej chemikálie znížila počet buniek najmenej o 20 %, táto koncentrácia sa bude považovať za cytotoxickú a koncentrácie na úrovni alebo nad úrovňou tejto cytotoxickej koncentrácie sa vylúčia z hodnotenia.

Chemická expozícia a usporiadanie mikrotitračnej platničky pri skúške

26. Postup riedení chemikálie (kroky 1 a 2) a expozíciu buniek chemikálii (krok 3) možno uskutočniť takto:

Krok 1: Každá testovaná chemikália sa sériovo rozriedi v DMSO alebo vo vhodnom rozpúšťadle a pridá sa do jamiek mikrotitračnej platničky, aby sa dosiahli konečné sériové koncentrácie určené predbežným testom na zistenie rozsahu [zvyčajne v sériách napríklad 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM a 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)] pri testovaní vykonávanom trojmo.

Krok 2: Riedenie chemikálie: Najskôr rozrieďte 1,5 μl testovanej chemikálie v rozpúšťadle na dosiahnutie objemu 500 μl kultivačných médií.

Krok 3: Expozícia buniek chemikálii: Pridajte 50 μl roztoku s médiami (pripraveného v kroku 2) do skúšobnej jamky, ktorá obsahuje 10^4 buniek/100 μl/jamka.

Odporúčaný konečný objem médií pre každú jamku je 150 μl. Testovacie vzorky a referenčné štandardy možno priradiť podľa tabuľky 3 a 4.

Tabuľka 3

Príklad priradenia koncentrácií referenčných štandardov na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške agonistu ER

Riadok	17α-metyltestosterón			Kortikosterón			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO); PC: pozitívna kontrola (1 nM E2)

27. Pri každom testovacom cykle sa testujú referenčné štandardy (E2, 17α-estradiol, 17−μετψλτεστοστερμνναακορτικοστερκνννταβυτκακκκκκNa každej skúšobnej mikrotitračnej platničke sa nachádzajú jamky s pozitívnou kontrolou ošetrené 1 nM E2, ktorý môže vyvolať maximálnu indukciu E2, a jamky s kontrolou s nosičom ošetrené len DMSO (alebo vhodným rozpúšťadlom) (tabuľka 4). Ak sa v rámci rovnakého pokusu používajú bunky z rôznych zdrojov (napr. odlišný počet pasáží, odlišná šarža atď.), referenčné štandardy sa majú testovať pre každý zdroj buniek.

Tabuľka 4

Príklad priradenia koncentrácií testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške agonistu ER

Riadok	Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 2			Testovaná chemikália 3			Testovaná chemikália 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO); PC: pozitívna kontrola (1 nM E2)

Tabuľka 5

Príklad priradenia koncentrácií referenčných štandardov na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške antagonistu ER

Riadok	Tamoxifén			Flutamid			Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO), PC: pozitívna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifén, Dig: digitonín.

= obohatené o 25 pM E2

28. S cieľom vyhodnotiť antagonistické pôsobenie chemikálií sa skúšobné jamky v riadkoch A až G obohatia o 25 pM E2. Pri každom pokuse sa testujú referenčné štandardy (tamoxifén a flutamid). Na každej skúšobnej mikrotitračnej platničke sa majú nachádzať jamky s pozitívnou kontrolou ošetrené 1 nM E2, ktoré sa môžu použiť ako kontrola kvality bunkovej línie hERα-HeLa-9 903, jamky s kontrolou s nosičom ošetrené len DMSO (alebo vhodným rozpúšťadlom), jamky s obsahom 0,1 % DMSO ošetrené pridaním DMSO k obohatenému E2, čo zodpovedá „obohatenej kontrole“, jamky ošetrené konečnou koncentráciou 1 μM OHT a jamky ošetrené 100 μM Dig (tabuľka 5). Pri nasledujúcej skúšobnej mikrotitračnej platničke sa použije rovnaké rozloženie bez jamiek s referenčnými štandardmi (tabuľka 6). Ak sa v rámci rovnakého pokusu používajú bunky z rôznych zdrojov (napr. odlišný počet pasáží, odlišná šarža atď.), referenčné štandardy sa majú testovať pre každý zdroj buniek.

Tabuľka 6

Príklad priradenia koncentrácií testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške antagonistu ER

Riadok	Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 2			Testovaná chemikália 3			Testovaná chemikália 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO), PC: pozitívna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifén, Dig: digitonín.

: obohatené o 25 pM E2

29. Je potrebné potvrdiť, že nedochádza k vplyvom v dôsledku umiestnenia na okraji. Ak existuje podozrenie na výskyt takýchto vplyvov, je potrebné zmeniť rozloženie na mikrotitračnej platničke, aby sa takýmto vplyvom predišlo. Na mikrotitračnej platničke možno použiť napríklad rozloženie, pri ktorom sa vylúči používanie krajných jamiek.

30. Po pridaní chemikálií sa skúšobné mikrotitračné platničky inkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom 5 % CO_2 pri teplote 37 °C ±1 °C počas 20 – 24 hodín, aby nastala indukcia produktov reportérových génov.

31. Osobitné faktory je potrebné zohľadniť v prípade zlúčenín s vysokou mierou prchavosti. V takom prípade sa môžu v blízkych jamkách s kontrolami prejaviť falošne pozitívne výsledky, preto je túto skutočnosť potrebné zvážiť z hľadiska očakávaných a historických hodnôt kontrol. V ojedinelých prípadoch, keď by prchavosť mohla spôsobovať obavy, môže použitie hermetických uzáverov platničiek prispieť k účinnému izolovaniu jednotlivých jamiek počas testovania, a preto sa v takýchto prípadoch odporúča.

32. S cieľom zaručiť nezávislosť sa majú opakované konečné testy tej istej chemikálie uskutočňovať v rôznych dňoch.

Skúška s luciferázou

33. Pri skúške možno použiť komerčný reagent na skúšku s luciferázou [napr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 alebo ekvivalent)] alebo štandardný systém na skúšku s luciferázou (napr. Promega, E1500 alebo ekvivalent), pokiaľ sú splnené kritériá prijateľnosti. Pri výbere reagentov skúšky je potrebné vychádzať z citlivosti luminometra, ktorý sa bude používať. Pri použití štandardného systému na skúšku s luciferázou sa pred pridaním substrátu má použiť reagent na lýzu bunkovej kultúry (napr. Promega, E1531 alebo ekvivalent). Reagent luciferázy sa má použiť podľa pokynov výrobcu.

ANALÝZA ÚDAJOV

Skúška agonistu ER

34. V prípade skúšky agonistu ER možno na získanie relatívnej transkripčnej aktivity v pozitívnej kontrole (1 nM E2) analyzovať luminiscenčné signály z tej istej mikrotitračnej platničky podľa týchto krokov (prijateľné sú aj iné ekvivalentné matematické postupy):

Krok 1. Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom.

Krok 2. Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3. Vypočítajte strednú hodnotu pre normalizovanú pozitívnu kontrolu.

Krok 4. Vydeľte normalizovanú hodnotu jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke strednou hodnotou normalizovanej pozitívnej kontroly (PC = 100 %).

Konečná hodnota pre jednotlivé jamky predstavuje relatívnu transkripčnú aktivitu pre danú jamku v porovnaní s reakciou v pozitívnej kontrole.

Krok 5. Vypočítajte strednú hodnotu relatívnej transkripčnej aktivity pre každú skupinu koncentrácií testovanej chemikálie. Pri reakcii sa posudzujú dva rozmery: spriemerované transkripčné pôsobenie (reakcia) a koncentrácia, pri ktorej dochádza k reakcii (pozri nasledujúci oddiel).

Faktory v súvislosti s indukciou EC_{50}, PC_{50} a PC_{10}

35. Na výpočet hodnoty EC_{50} sa vyžaduje úplná krivka závislosti reakcie od koncentrácie, čo však nemusí byť vždy dosiahnuteľné ani praktické vzhľadom na obmedzenia rozsahu testovaných koncentrácií (napríklad pre problémy spojené s cytotoxicitou alebo rozpustnosťou). Keďže však hodnota EC_{50} a maximálna úroveň indukcie (ktorá zodpovedá najvyššej hodnote Hillovej rovnice) predstavujú informatívne parametre, tieto parametre by sa mali uvádzať, pokiaľ je to možné. Na výpočet hodnoty EC_{50} a maximálnej úrovne indukcie je potrebné použiť vhodný štatistický softvér (napr. Graphpad Prism). Ak sa Hillova logistická rovnica vzťahuje na údaje závislosti reakcie od koncentrácie, na výpočet hodnoty EC_{50} sa použije táto rovnica (7):

Y = dolný bod + (horný bod − dolný bod) / (1+10 exp ((log EC50 − X) × sklon krivky podľa Hillovej rovnice)), pričom:

X je logaritmus koncentrácie a

Y je reakcia, pričom Y sa začína v spodnom bode a prechádza k hornému bodu na sigmoidnej krivke. Spodná hodnota má v Hillovej logistickej rovnici fixnú hodnotu nula.

36. Pre každú testovanú chemikáliu je potrebné zadať:

hodnotu RPC_{Max}, čo je maximálna úroveň reakcie vyvolanej testovanou chemikáliou, vyjadrená ako percentuálny podiel reakcie vyvolanej 1 nM E2 na rovnakej mikrotitračnej platničke, ako aj PC_{Max} (koncentrácia priradená k hodnote RPC_{Max}) a

pri pozitívnych chemikáliách je potrebné zadať koncentrácie, ktoré vyvolávajú PC_{10} a, ak je to vhodné, PC_{50}.

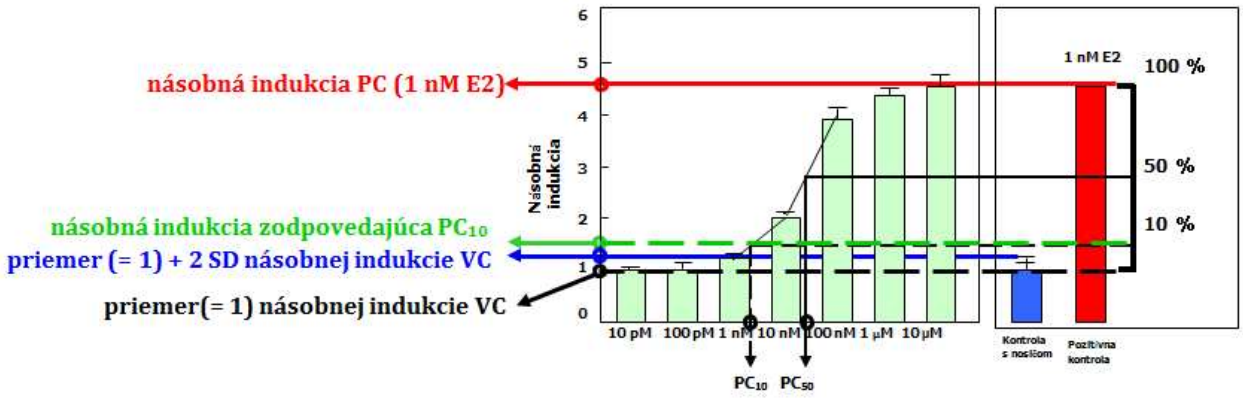
37. Hodnoty PCx možno vypočítať interpoláciou medzi 2 bodmi na súradniciach X-Y, pričom jeden sa nachádza bezprostredne nad a druhý bezprostredne pod hodnotou PCx. Keď majú údajové body, ktoré ležia bezprostredne nad a pod hodnotou PCx, súradnice (a,b), resp. (c,d), hodnotu PCx možno vypočítať pomocou tejto rovnice:

$$\log[PCx] = \log[c] + (x - d)/(d - b)$$

38. Opis hodnôt pozitívnej kontroly je uvedený ďalej na obrázku 1.

Obrázok 1

Príklad spôsobu odvodenia hodnôt pozitívnej kontroly (PC). Pozitívna kontrola (1 nM E2) je súčasťou každej skúšobnej mikrotitračnej platničky



Skúška antagonistu ER

39. V prípade skúšky antagonistu ER možno na získanie relatívnej transkripčnej aktivity (RTA) v obohatenej kontrole (25 pM E2) analyzovať luminiscenčné signály z tej istej mikrotitračnej platničky podľa týchto krokov (prijateľné sú aj iné ekvivalentné matematické postupy):

Krok 1. Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom.

Krok 2. Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3. Vypočítajte strednú hodnotu pre normalizovanú obohatenú kontrolu.

Krok 4. Vydeľte normalizovanú hodnotu jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke strednou hodnotou normalizovanej obohatenej kontroly (obohatená kontrola = 100 %).

Konečná hodnota pre jednotlivé jamky predstavuje relatívnu transkripčnú aktivitu pre danú jamku v porovnaní s reakciou v obohatenej kontrole.

Krok 5. Vypočítajte strednú hodnotu relatívnej transkripčnej aktivity pre každé ošetrovanie.

Faktory v súvislosti s indukciou IC_{30} a IC_{50}

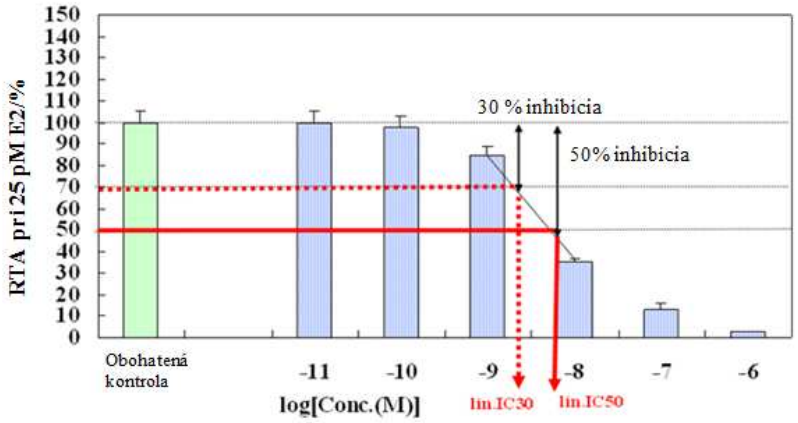
40. Pri pozitívnych chemikáliách je potrebné uviesť koncentrácie, ktoré vyvolávajú hodnoty IC_{30} a, ak je to vhodné, IC_{50}.

41. Hodnoty ICx možno vypočítať interpoláciou medzi 2 bodmi na súradniciach X-Y, pričom jeden sa nachádza bezprostredne nad a druhý bezprostredne pod hodnotou ICx. Keď majú údajové body, ktoré ležia bezprostredne nad a pod hodnotou ICx, súradnice (c,d), resp. (a,b), hodnotu ICx možno vypočítať pomocou tejto rovnice:

$$\text{lin ICx} = a - (b - (100 - x))\ (a - c)/(b - d)$$

Obrázok 2

Príklad spôsobu odvodenia hodnôt IC. Obohatená kontrola (25 pM E2) je súčasťou každej skúšobnej mikrotitračnej platničky



RTA: relatívna transkripčná aktivita

42. Výsledky by mali byť založené na dvoch (alebo troch) nezávislých testovacích cykloch. Ak sa z dvoch testovacích cyklov získajú porovnateľné a tým aj reprodukovateľné výsledky, nie je nevyhnutné uskutočňovať tretí cyklus. Na to, aby boli výsledky prijateľné, musia:

— spĺňať kritériá prijateľnosti (pozri kritériá prijateľnosti v odsekoch 14 – 20),

— byť reprodukovateľné.

Kritériá na interpretáciu údajov

Tabuľka 7

Kritériá pre skúšku agonistu ER na rozhodnutie o tom, či je chemikália pozitívna alebo negatívna

Chemikália je pozitívna	Ak sa získa hodnota RPC_{Max}, ktorá sa rovná alebo prekračuje 10 % reakcie pozitívnej kontroly najmenej v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.
Chemikália je negatívna	Ak hodnota RPC_{Max} nedosiahne aspoň 10 % reakcie pozitívnej kontroly v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.

Tabuľka 8

Kritériá pre skúšku antagonistu ER na rozhodnutie o tom, či je chemikália pozitívna alebo negatívna

Chemikália je pozitívna	Ak sa vypočíta hodnota IC_{30} najmenej v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.
Chemikália je negatívna	Ak sa nevypočíta hodnota IC_{30} v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.

43. Kritériá na interpretáciu údajov sú uvedené v tabuľkách 7 a 8. Pozitívne výsledky bude charakterizovať rozsah účinku a koncentrácie, pri ktorej k účinku dochádza. Oba tieto ciele sú splnené, keď sa výsledky vyjadria ako koncentrácia, pri ktorej sa dosahuje 50 % (PC_{50}) alebo 10 % (PC_{10}) hodnôt pozitívnej kontroly v prípade skúšky agonistu a pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % (IC_{50}) alebo 30 % (IC_{30}) hodnoty obohatenej kontroly v prípade skúšky antagonistu. Testovaná chemikália sa však považuje za pozitívnu, ak sa maximálna reakcia vyvolaná testovanou chemikáliou (RPC_{Max}) rovná alebo prekračuje 10 % reakcie pozitívnej kontroly najmenej v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov, a naopak, testovaná chemikália sa považuje za negatívnu, ak hodnota RPC_{Max} nedosiahne aspoň 10 % reakcie pozitívnej kontroly v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.

44. Výpočty hodnôt PC_{10}, PC_{50} a PC_{Max} v skúške agonistu ER a IC_{30} a IC_{50} v skúške antagonistu ER možno uskutočniť pomocou výpočtových tabuliek dostupných v rámci usmernenia na vykonávanie testov na verejnej webovej lokalite OECD ([1]).

45. Malo by byť postačujúce, ak sa získajú hodnoty PC_{10} alebo PC_{50} a IC_{30} alebo IC_{50} aspoň dvakrát. Ak by sa však pri výslednom základe údajov v rovnakom rozsahu koncentrácií prejavilo kolísanie s neprijateľne vysokým variačným koeficientom (CV; %), údaje nemožno považovať za spoľahlivé a je potrebné identifikovať zdroj tohto výrazného kolísania. Variačný koeficient trojíc nespracovaných údajov (t. j. údajov o luminiscenčnej intenzite) údajových bodov, ktoré slúžia na výpočet hodnoty PC_{10}, má byť menej ako 20 %.

46. Splnenie kritérií prijateľnosti naznačuje, že skúšobný systém funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testovacieho cyklu vyplynú presné údaje. Duplikovanie výsledkov prvého cyklu je najlepším potvrdením toho, že boli generované presné údaje.

47. Ak sa v skúške agonistu ER vyžaduje viac informácií na ďalšie účely popri účele skríningu a stanovenia priorít tohto usmernenia na vykonávanie testov pozitívnych testovaných chemikálií, obzvlášť chemikálií v rozsahu PC_{10} – PC_{49}, ako aj chemikálií, pri ktorých existuje podozrenie na nadmernú stimuláciu luciferázy, možno potvrdiť, že pozorovaná aktivita luciferázy je výlučne reakciou špecifickou pre ERα, a to prostredníctvom antagonistu ERα (pozri dodatok 2.1).

SPRÁVA O TESTE

48. Pozri odsek 20 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER

LITERATÚRA

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459 – 1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252 – 4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89 – 94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769 – 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953 – 9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97 – El02.

Dodatok 2.1

FALOŠNE POZITÍVNE VÝSLEDKY POSÚDENIE LUMINISCENČNÝCH SIGNÁLOV, KTORÉ NEBOLI SPROSTREDKOVANÉ RECEPTOROM

1. Falošne pozitívne výsledky v skúške agonistu ER môžu byť spôsobené aktiváciou génu luciferázy, ktorá nie je sprostredkovaná ER, priamou aktiváciou génového produktu alebo nesúvisiacou fluorescenciou. Takéto účinky naznačuje neúplná alebo nezvyčajná krivka závislosti odozvy od dávky. Ak existuje podozrenie na výskyt takýchto účinkov, je potrebné preskúmať účinok antagonistu ER [napr. 4-hydroxytamoxifénu (OHT) v netoxickej koncentrácii] na reakciu. Čistý antagonista ICI 1827 80 nemusí byť vhodný na tento účel, keďže dostatočná koncentrácia ICI 1827 80 môže znížiť hodnotu kontroly s nosičom, čo ovplyvní analýzu údajov.

2. S cieľom zabezpečiť validitu tohto prístupu je na tej istej mikrotitračnej platničke potrebné testovať:

   — agonistické pôsobenie neznámej chemikálie za prítomnosti/bez prítomnosti10 μM OHT,

   — kontrolu s nosičom (trojmo),

   — OHT (trojmo),

   — 1 nM E2 (trojmo) ako agonistickú pozitívnu kontrolu,

   — 1 nM E2 + OHT (trojmo).

Kritériá na interpretáciu údajov

Poznámka: Všetky jamky je potrebné ošetriť rovnakou koncentráciou nosiča.

— Ak ošetrenie antagonistom ER NEOPLYVNÍ agonistické pôsobenie neznámej chemikálie, chemikália sa označí ako negatívna.

— Ak dôjde k úplnej inhibícii agonistického pôsobenia neznámej chemikálie, použite rozhodovacie kritériá.

— Ak sa agonistické pôsobenie pri najnižšej koncentrácii rovná alebo je vyššie než reakcia pri PC_{10}, inhibícia neznámej chemikálie sa rovná alebo je vyššia než reakcia pri PC_{10}. Vypočíta sa rozdiel v reakciách medzi neošetrenými a ošetrenými jamkami s antagonistom ER, pričom tento rozdiel sa považuje za skutočnú reakciu a má sa používať pri výpočte príslušných parametrov, aby bolo možné prijať rozhodnutie o klasifikácii.

Analýza údajov

Skontrolujte normu výkonnosti.

Skontrolujte CV medzi jamkami ošetrenými za rovnakých podmienok.

1. Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom.

2. Odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek, ktoré **nie sú** ošetrené OHT.

3. Vypočítate strednú hodnotu OHT.

4. Odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek, ktoré sú ošetrené OHT.

5. Vypočítajte strednú hodnotu pozitívnej kontroly.

6. Vypočítajte relatívnu transkripčnú aktivitu pre všetky ostatné jamky vzhľadom na pozitívnu kontrolu.

Dodatok 2.2

PRÍPRAVA SÉRA OŠETRENÉHO UHLÍM POVRCHOVO UPRAVENÝM DEXTRÁNOM (DCC)

1. Ošetrenie séra uhlím povrchovo upraveným dextránom (DCC) je všeobecnou metódou na odstránenie estrogénových zlúčenín zo séra, ktoré sa pridáva k bunkovému médiu, aby sa vylúčila možnosť skreslenej reakcie v súvislosti so zvyškovými estrogénmi v sére. Týmto postupom možno ošetriť 500 ml bovinného fetálneho séra (FBS).

Zložky

2. Vyžadujú sa tieto materiály a zariadenie:

Materiály

aktívne uhlie,

dextrán,

hexahydrát chloridu horečnatého ($MgCl_2$ $6H_2O$),

sacharóza,

1 M tlmivého roztoku HEPES (pH 7,4),

ultračistá voda z filtrovacieho systému.

Zariadenie

sklená nádoba (zodpovedajúcej veľkosti) sterilizovaná v autokláve, bežná laboratórna odstredivka (s možnosťou nastavenia teploty na 4 °C).

Postup

3. Tento postup je prispôsobený používaniu odstredivkových skúmaviek s objemom 50 ml:

[1. deň] Pripravte si suspenziu uhlia povrchovo upraveného dextránom s 1 l ultračistej vody s obsahom 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sacharózy, 2,5 g uhlia, 0,25 g dextránu a 5 mM HEPES a premiešavajte pri teplote 4 °C do ďalšieho dňa.

[2. deň] Rozdeľte suspenziu do odstredivkových skúmaviek s objemom 50 ml a odstreďujte 10 minút pri 10 000 ot./min. pri teplote 4 °C. Odstráňte supernatant a uskladnite polovicu usadeniny uhlia pri teplote 4 °C na použitie na 3. deň. Rozmiešajte na suspenziu druhú polovicu uhlia s FBS, ktoré bolo pomaly rozmrazené, aby nedošlo k zrážaniu, a ktoré bolo tepelne inaktivované počas 30 minút pri teplote 56 °C, a potom suspenziu preneste do sklenej nádoby sterilizovanej v autokláve, napríklad do Erlenmeyerovej banky. Suspenziu pomaly premiešavajte pri teplote 4 °C do ďalšieho dňa.

[3. deň] Rozdeľte suspenziu s FSB do odstredivkových skúmaviek a odstreďujte 10 minút pri 10 000 ot./min. pri teplote 4 °C. Zozbierajte FBS a preneste ho do novej usadeniny uhlia, ktorá bola pripravená a uskladnená na 2. deň. Rozmiešajte usadeninu uhlia a pomaly túto suspenziu premiešavajte do ďalšieho dňa pri teplote 4 °C v sklenej nádobe sterilizovanej v autokláve.

[4. deň] Suspenziu rozdeľte a odstreďujte 10 minút pri 10 000 ot./min. pri teplote 4 °C a sterilizujte supernatant filtrovaním cez sterilný filter s veľkosťou otvorov 0,2 μm. Toto bovinné fetálne sérum ošetrené uhlím povrchovo upraveným dextránom sa má skladovať pri teplote −20 °C a možno ho používať až jeden rok.

Dodatok 3

SKÚŠKA TRANSAKTIVÁCIE ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV BUNKOVEJ LÍNIE VM7LUC NA IDENTIFIKOVANIE AGONISTOV A ANTAGONISTOV ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške sa používa bunková línia VM7Luc4E2 ([1]). Validovali ju Medziagentúrne centrum NTP pre hodnotenie alternatívnych toxikologických metód (NICEATM – National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods), ako aj Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1). Pri bunkových líniách VM7Luc dochádza k prevládajúcej expresii endogénneho ERα a malého množstva endogénneho ERβ (2) (3) (4).

2. Túto skúšku možno použiť na širokú škálu látok za predpokladu, že ich možno rozpustiť v dimetylsulfoxide (DMSO; registračné číslo CAS 67-68-5), nereagujú s DMSO ani s médiom na kultiváciu buniek a nie sú cytotoxické pri testovaných koncentráciách. Ak nemožno použiť DMSO, je možné použiť iný nosič, napríklad etanol alebo vodu (pozri odsek 12). Z preukázanej výkonnosti skúšky agonistu/antagonistu VM7Luc ER TA vyplýva, že údaje získané pomocou tejto skúšky môžu poskytovať informácie o mechanizmoch účinku sprostredkovaných estrogénovými receptormi (ER) a možno ich zvážiť pri stanovení priorít látok určených na ďalšie testovanie.

3. Táto skúška je osobitne navrhnutá na detekciu transaktivácie sprostredkovanej receptorom hERα a hERß, pričom ako sledovaný parameter sa meria chemiluminiscencia. Chemiluminiscencia má široké možnosti využitia v biologických analýzach, pretože luminiscencia poskytuje vysoký pomer signál-šum (10). Aktivitu luciferázy svetlušky svätojánskej v bunkových testoch môžu však zneprehľadniť látky, ktoré spôsobujú inhibíciu enzýmu luciferázy, čím dochádza k zdanlivej inhibícii aj k zvýšenej luminiscencii v dôsledku stabilizácie bielkovín (10). Pri niektorých skúškach zameraných na reportérový gén ER a používajúcich luciferázu sa však pri koncentráciách fytoestrogénu vyšších ako 1 μM uvádzal výskyt luminiscenčných signálov, ktoré neboli sprostredkované receptorom, a to pre nadmernú aktiváciu reportérového génu luciferázy (9) (11). Zatiaľ čo z krivky závislosti odozvy od dávky vyplýva, že ku skutočnej aktivácii systému estrogénových receptorov dochádza pri nižších koncentráciách, v systémoch skúšok stabilne transfektovanej transaktivácie estrogénových receptorov (see Appendix 2) je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo podobných zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch.

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti VŠEOBECNÝ ÚVOD a ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Táto skúška slúži na určenie naviazania ligandu ER a následného premiestnenia komplexu receptora a ligandu do jadra. V jadre sa komplex receptora a ligandu naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén (*luc*), čo vedie k produkcii luciferázy a následnej emisii svetla, ktorú možno kvantifikovať pomocou luminometra. Aktivitu luciferázy možno rýchlo a lacno vyhodnotiť pomocou viacerých komerčne dostupných súprav. Pri skúške VM7Luc ER TA sa na detekciu látok s agonistickým alebo antagonistickým pôsobením na estrogénové receptory *in vitro* využíva VM7 – bunková línia ľudského adenokarcinómu prsníka reagujúca na ER, ktorá bola stabilne transfektovaná pomocou reportérového konštruktu *luc* riadeného štyrmi úsekmi estrogénovej

([1]) Pred júnom 2016 sa táto bunková línia označovala ako BG1Luc. Bunky BG-1 pôvodne opísal Geisinger a kol. (1998) (12) a neskôr boli charakterizované výskumníkmi z inštitútu NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) (13). Relatívne nedávno sa zistilo, že existujú dva odlišné varianty buniek BG-1, ktoré používajú výskumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Z hĺbkovej analýzy (vrátane testovania DNA) týchto dvoch variantov bunkových línií BG-1, ktoré vykonal Li a spolupracovníci (2014) (14), vyplynulo, že BG-1 Fr je jedinečná a že BG-1 NIEHS, teda pôvodná bunková línia, ktorá sa pri skúške používala, nie je bunkovou líniou ľudského karcinómu vaječníkov BG1, ale variantom bunkovej línie ľudského karcinómu prsníka MCF7. Bunková línia použitá v skúške, pôvodne označovaná ako BG1Luc4E2 (15), sa už bude označovať ako VM7Luc4E2 („V“ = variant; „M7“ = bunky MCF7). Podobne skúška sa bude odteraz označovať ako VM7Luc ER TA. Hoci sa týmto mení pôvod bunkovej línie, na ktorej je skúška založená, nemá to vplyv na publikované validačné štúdie ani na použitie a aplikáciu tejto skúšky na skríning estrogénových/antiestrogénových chemikálií.

reakcie nachádzajúcimi sa pred oblasťou promótora MMTV (vírusu nádoru mliečnych žliaz myší). Tento promótor MMTV vykazuje len nízku krížovú reaktivitu s inými steroidnými a nesteroidnými hormónmi (8). Kritériá na interpretáciu údajov sú podrobne opísané v odseku 41. Stručne možno uviesť, že pozitívnu reakciu identifikuje krivka závislosti reakcie od koncentrácie, ktorá obsahuje najmenej tri body s neprekrývajúcimi sa pásmami odchýlky (stredná hodnota ± SD), ako aj zmena amplitúdy [normalizovaná relatívna svetelná jednotka (RLU)] najmenej o 20 % maximálnej hodnoty referenčného štandardu [17β-estradiol (E2; registračné číslo CAS 50-28-2) pri skúške agonistu, raloxifén HCl (Ral; registračné číslo CAS 84449-90-1)/E2 pri skúške antagonistu].

POSTUP

Bunková línia

6. Na túto skúšku sa používa stabilne transfektovaná bunková línia VM7Luc4E2. Táto bunková línia je v súčasnosti dostupná len na základe technickej licenčnej zmluvy od University of California, Davis, Kalifornia, USA ([2]) a od spoločnosti Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Severná Karolína, USA ([3]).

Stabilita bunkovej línie

7. S cieľom zachovať stabilitu a integritu bunkovej línie je potrebné bunky kultivovať vo viac než jednej pasáži zo zmrazenej kmeňovej kultúry v médiách určených na udržiavanie buniek (pozri odsek 9). Kultivácia buniek nemá presiahnuť 30 pasáží. V prípade bunkovej línie VM7Luc4E2 bude 30 pasáží trvať približne tri mesiace.

Bunková kultúra a podmienky očkovania

8. Je potrebné dodržiavať postupy uvedené v usmernení o osvedčenom postupe kultivácie buniek (5) (6), aby sa zaručila kvalita všetkých materiálov a metód s cieľom zachovať integritu, validitu a reprodukovateľnosť uskutočnených činností.

9. Bunky VM7Luc4E2 sa udržiavajú v médiu RPMI 1 640 doplnenom o 0,9 % zmesi Pen-Strep a 8,0 % bovinného fetálneho séra (FBS) v špecializovanom inkubátore pre tkanivové kultúry pri teplote 37 °C ±1 °C, vlhkosti 90 % ±5 % a v atmosfére s obsahom 5,0 % ±1 % CO_2 vo vzduchu.

10. Po dosiahnutí konfluencie na úrovni ~80 % sa bunky VM7Luc4E2 subkultivujú a umiestnia na 48 hodín do prostredia bez prítomnosti estrogénu. Následne sa bunky naočkujú do 96-jamkových mikrotitračných platničiek na účely vystavenia testovaným chemikáliám a analýzy indukcie aktivity luciferázy v závislosti od estrogénu. Médium bez prítomnosti estrogénu (EFM) obsahuje Dulbeccovu modifikáciu Eaglovho média (DMEM) bez fenolovej červene, s pridaním 4,5 % FBS ošetreného uhlím/dextránom, 1,9 % L-glutamínu a 0,9 % zmesi Pen-Strep. Všetky plastové nádoby musia vykazovať nulové estrogénové pôsobenie [pozri podrobný protokol (7)].

Kritériá prijateľnosti

11. Prijatie alebo zamietnutie testu vychádza z hodnotenia výsledkov týkajúcich sa referenčných štandardov a kontrol dosiahnutých pri jednotlivých pokusoch uskutočnených na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke. Každý referenčný štandard sa testuje pri viacerých koncentráciách, pričom z jednotlivých koncentrácií referenčných štandardov a kontrol existujú viaceré vzorky. Výsledky sa porovnávajú s kontrolami kvality (QC) pre tieto parametre, ktoré boli

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-mail: 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, tel.: 919-688-4804, fax: 919-688-4404.

odvodené z historických databáz agonistov a antagonistov vytvorených jednotlivými laboratóriami v rámci preukázania spôsobilosti. Historické databázy sa priebežne aktualizujú hodnotami pre referenčné štandardy a kontroly. V prípade zmien zariadenia alebo laboratórnych podmienok môže byť potrebné vytvorenie aktualizovaných historických databáz.

Test agonistu

Test na zistenie rozsahu

- Indukcia: Indukcia v rámci mikrotitračnej platničky sa meria tak, že sa priemerná hodnota relatívnej svetelnej jednotky (RLU) pri najvyššej koncentrácii referenčného štandardu E2 vydelí priemernou hodnotou RLU kontroly s DMSO. Zvyčajne sa dosahuje päťnásobná indukcia, na účely prijatia však má byť indukcia najmenej štvornásobná.

- Výsledky kontroly s DMSO: Hodnoty RLU kontroly s aplikáciou rozpúšťadla majú byť v rámci 2,5-násobku štandardnej odchýlky strednej hodnoty RLU historickej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla.

- Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Komplexný test

Zahŕňa kritériá prijateľnosti testu agonistu na zistenie rozsahu a tieto ďalšie kritériá:

- Výsledky získané pri referenčnom štandarde: Krivka závislosti reakcie od koncentrácie vzťahujúca sa na referenčný štandard E2 má mať sigmoidálny tvar, pričom najmenej tri hodnoty sa majú nachádzať v lineárnej časti krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

- Výsledky získané pri pozitívnej kontrole: Hodnoty RLU kontroly s metoxychlórom majú byť vyššie ako stredná hodnota kontroly s DMSO plus trojnásobok štandardnej odchýlky od strednej hodnoty kontroly s DMSO.

- Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Test antagonistu

Test na zistenie rozsahu

- Redukcia: Redukcia v rámci mikrotitračnej platničky sa meria tak, že sa priemerná najvyššia hodnota RLU referenčného štandardu Ral/E2 vydelí priemernou hodnotou RLU kontroly s DMSO. Zvyčajne sa dosahuje päťnásobná redukcia, na účely prijatia však má byť redukcia najmenej trojnásobná.

- Výsledky získané pri kontrole s E2: Hodnoty RLU kontroly s E2 majú byť v rámci 2,5-násobku štandardnej odchýlky strednej hodnoty RLU historickej kontroly s E2.

- Výsledky kontroly s DMSO: Hodnoty RLU kontroly s DMSO majú byť v rámci 2,5-násobku štandardnej odchýlky strednej hodnoty RLU historickej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla.

• Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Komplexný test

Zahŕňa kritériá prijateľnosti testu antagonistu na zistenie rozsahu a tieto ďalšie kritériá:

• Výsledky získané pri referenčnom štandarde: Krivka závislosti reakcie od koncentrácie vzťahujúca sa na referenčný štandard Ral/E2 má mať sigmoidálny tvar, pričom najmenej tri hodnoty sa majú nachádzať v lineárnej časti krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

• Výsledky získané pri pozitívnej kontrole: Hodnoty RLU kontroly s E2/tamoxifénom majú byť nižšie ako stredná hodnota kontroly s E2 mínus trojnásobok štandardnej odchýlky od strednej hodnota kontroly s E2.

• Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Referenčné štandardy, pozitívne kontroly a kontroly s nosičom

Kontrola s nosičom (skúšky agonistu a antagonistu)

12. Nosič, ktorý sa používa na rozpustenie testovaných chemikálií, sa má testovať ako kontrola s nosičom. Ako nosič sa pri validácii skúšky VM7Luc ER TA použil dimetylsulfoxid (DMSO, registračné číslo CAS 67-68-5) v koncentrácii 1 obj. % (pozri odsek 24). Ak sa použije iný nosič ako DMSO, všetky referenčné štandardy, kontroly a testované chemikálie sa majú podľa potreby testovať s rovnakým nosičom.

Referenčný štandard (test agonistu na zistenie rozsahu)

13. Referenčný štandard je E2 (registračné číslo CAS 50-28-2). Pri testovaní na zistenie rozsahu je referenčný štandard zložený zo sériového riedenia štyroch koncentrácií E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ a $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), pričom sa každá koncentrácia testuje v jamkách dvojmo.

Referenčný štandard (komplexný test agonistu)

14. Referenčný štandard E2 na komplexné testovanie je zložený zo sériového riedenia 1:2 pozostávajúceho z 11 koncentrácií E2 (v rozsahu od $3{,}67 \times 10^{-10}$ do $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) v jamkách dvojmo.

Referenčný štandard (test antagonistu na zistenie rozsahu)

15. Referenčný štandard je kombinácia Ral (registračné číslo CAS 84449-90-1) a E2 (registračné číslo CAS 50-28-2). Pri testovaní na zistenie rozsahu je referenčný štandard Ral/E2 zložený zo sériového riedenia troch koncentrácií Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$a $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) plus z pevne určenej koncentrácie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) v jamkách dvojmo.

Referenčný štandard (komplexný test antagonistu)

16. Referenčný štandard Ral/E2 na komplexné testovanie je zložený zo sériového riedenia Ral v pomere 1:2 (v rozsahu od $2{,}45 \times 10^{-8}$ do $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) plus z pevne určenej koncentrácie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M), pričom obsahuje deväť koncentrácií Ral/E2 v jamkách dvojmo.

Slabá pozitívna kontrola (agonista)

17. Slabá pozitívna kontrola je 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoxychlóru (metoxychlór; registračné číslo CAS 72-43-5) v médiu EFM.

Slabá pozitívna kontrola (antagonista)

18. Slabá pozitívna kontrola je zložená z tamoxifénu (registračné číslo CAS 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M s 9,18 × 10^{-11} M E2 v médiu EFM.

Kontrola s E2 (len pri skúške antagonistu)

19. Kontrola s E2 predstavuje 9,18 × 10^{-11} M E2 v médiu EFM a slúži ako základná negatívna kontrola.

Násobná indukcia (agonista)

20. Indukcia aktivity luciferázy vyvolaná referenčným štandardom (E2) sa meria tak, že sa priemerná najvyššia hodnota RLU referenčného štandardu E2 vydelí priemernou hodnotou RLU kontroly s DMSO, pričom výsledok má byť viac ako štvornásobok.

Násobná redukcia (antagonista)

21. Priemerná aktivita luciferázy vyvolaná referenčným štandardom (Ral/E2) sa meria tak, že sa priemerná najvyššia hodnota RLU referenčného štandardu Ral/E2 vydelí strednou hodnotou RLU kontroly s DMSO, pričom má byť viac ako trojnásobná.

Preukazovanie spôsobilosti laboratória (pozri odsek 14 a tabuľky 3 a 4 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER tejto testovacej metódy)

Nosič

22. Testované chemikálie sa rozpustia v rozpúšťadle, ktoré rozpúšťa testovanú chemikáliu a je miešateľné s bunkovým médiom. Vhodnými nosičmi sú voda, etanol (s čistotou 95 % až 100 %) a DMSO. V prípade použitia DMSO nemá úroveň prekročiť 1 obj. %. Pri každom nosiči je potrebné preukázať, že maximálny použitý objem nie je cytotoxický a nenarušuje vykonávanie skúšky. Referenčné štandardy a kontroly sa rozpustia v 100 % rozpúšťadle a potom sa rozriedia na vhodné koncentrácie v médiu EFM.

Príprava testovaných chemikálií

23. Testované chemikálie sa rozpustia v 100 % DMSO (alebo vhodnom rozpúšťadle) a potom sa rozriedia na vhodné koncentrácie v médiu EFM. Pred rozpustením a rozriedením sa majú všetky testované chemikálie nechať ustáliť pri izbovej teplote. Roztoky testovaných chemikálií sa majú pripraviť čerstvo pre každý pokus. V roztokoch nemá byť viditeľná zrazenina ani zakalenie. Referenčné štandardy a kontroly možno pripraviť vo väčšom množstve do zásoby, konečný referenčný štandard, riedenia kontrol a testované chemikálie je však potrebné pripraviť čerstvo pre každý pokus a použiť do 24 hodín od prípravy.

Rozpustnosť a cytotoxicita: Úvahy týkajúce sa zisťovania rozsahu

24. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu sú sedembodové sériové riedenia v pomere 1:10 uskutočňované dvojmo. Na začiatku sa testované chemikálie testujú po maximálnu koncentráciu 1 mg/ml (~1 mM) pri testovaní agonistu a 20 µg/ml (~10 µM) pri testovaní antagonistu. Pomocou pokusov na zistenie rozsahu sa určujú:

— počiatočné koncentrácie testovaných chemikálií, ktoré sa majú použiť počas komplexného testovania,

— riedenia testovaných chemikálií (1:2 alebo 1:5), ktoré sa majú použiť počas komplexného testovania.

25. Súčasťou protokolov skúšok agonistov a antagonistov (7) je posúdenie životaschopnosti buniek/cytotoxicity, ktoré je začlenené do testovania na zistenie rozsahu a komplexného testovania. Ako metóda na určenie cytotoxicity sa na posúdenie životaschopnosti buniek počas validácie skúšky VM7Luc ER TA (1) použila škálovaná kvalitatívna metóda vizuálneho skúmania, na určenie cytotoxicity však možno použiť kvantitatívnu metódu [pozri protokol (7)]. Údaje z koncentrácií testovaných chemikálií, ktoré spôsobujú viac ako 20 % zníženie životaschopnosti, nemožno použiť.

Expozícia testovanej chemikálii a usporiadanie mikrotitračnej platničky pri skúške

26. Bunky sa spočítajú a naočkujú na 96-jamkové mikrotitračné platničky pre tkanivové kultúry (2×10^5 buniek na jamku) v médiu EFM a inkubujú sa 24 hodín, aby sa umožnilo prichytenie buniek k platničke. Médium EFM sa odstráni a nahradí sa testovanými a referenčnými chemikáliami v médiu EFM a pokračuje inkubácia v trvaní 19 – 24 hodín. Osobitné faktory je potrebné zohľadniť v prípade látok s vysokou mierou prchavosti, pretože sa môžu v blízkych jamkách s kontrolami prejaviť falošne pozitívne výsledky. V takýchto prípadoch môže použitie hermetických uzáverov platničiek prispieť k účinnému izolovaniu jednotlivých jamiek počas testovania, a preto sa odporúča.

Testy na zistenie rozsahu

27. Pri testovaní na zistenie rozsahu sa používajú všetky jamky 96-jamkovej mikrotitračnej platničky, aby bolo možné testovať až šesť testovaných chemikálií prostredníctvom sedembodových sériových riedení v pomere 1:10 uskutočnených dvojmo (pozri obrázky 1 a 2).

— Pri testovaní *agonistu* na zistenie rozsahu sa používajú štyri koncentrácie E2 dvojmo ako referenčný štandard a štyri jamky s replikátmi na kontrolu s DMSO.

— Pri testovaní *antagonistu* na zistenie rozsahu sa používajú tri koncentrácie Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 dvojmo ako referenčný štandard, s tromi jamkami s replikátmi na kontroly s E2 a s DMSO.

Obrázok 1

Rozloženie pri teste agonistu na zistenie rozsahu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: E2-1 až E2-4 = koncentrácie referenčného štandardu E2 (od vysokej po nízku); TC1-1 až TC1-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 6 (TC6); VC = kontrola s nosičom [DMSO (1 obj. % EFM)].

Obrázok 2

Rozloženie pri teste antagonistu na zistenie rozsahu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: E2 = kontrola s E2; Ral-1 až Ral-3 = koncentrácie referenčného štandardu s raloxifén/E2 (od vysokej po nízku); TC1-1 až TC1-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 6 (TC6); VC = kontrola s nosičom [DMSO (1 obj. % EFM)].

Poznámka: Všetky testované chemikálie sa testujú za prítomnosti $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Odporúčaný konečný objem médií potrebný pre každú jamku je 200 µl. Používajte len testovacie mikrotitračné platničky, v ktorých je vo všetkých jamkách životaschopnosť buniek najmenej 80 %.

29. Stanovenie počiatočných koncentrácií pre komplexné testovanie ***agonistu*** sa podrobne opisuje v protokole testu agonistu (7). Stručne možno uviesť, že sa používajú tieto kritériá:

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nenachádzajú body, ktoré sú vyššie než stredná hodnota plus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s DMSO, komplexné testovanie sa uskutoční pomocou 11-bodového sériového riedenia v pomere 1:2, ktoré sa začína pri maximálnej rozpustnej koncentrácii.

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nachádzajú body, ktoré sú vyššie než stredná hodnota plus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s DMSO, počiatočná koncentrácia, ktorá sa má použiť pre 11-bodovú schému riedenia pri komplexnom testovaní, má byť o jeden logaritmický rád vyššia než koncentrácia vykazujúca najvyššiu upravenú hodnotu RLU pri zisťovaní rozsahu. 11-bodová schéma riedenia bude založená na riedeniach v pomere 1:2 alebo 1:5 podľa týchto kritérií:

  11-bodové sériové riedenie v pomere 1:2 sa použije, ak výsledný rozsah koncentrácií bude zahŕňať celý rozsah reakcií na základe krivky závislosti reakcie od koncentrácie vytvorenej v rámci testu na zistenie rozsahu. V opačnom prípade sa použije riedenie v pomere 1:5.

— Ak testovaná chemikália v teste na zistenie rozsahu vykazuje dvojfázovú krivku závislosti reakcie od koncentrácie, pri komplexnom testovaní je potrebné zahrnúť obe fázy.

30. Stanovenie počiatočných koncentrácií pre komplexné testovanie ***antagonistu*** sa podrobne opisuje v protokole testu antagonistu (7). Stručne možno uviesť, že sa používajú tieto kritériá:

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nenachádzajú body, ktoré sú nižšie než stredná hodnota mínus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s E2, komplexné testovanie sa uskutoční pomocou 11-bodového sériového riedenia v pomere 1:2, ktoré sa začína pri maximálnej rozpustnej koncentrácii.

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nachádzajú body, ktoré sú nižšie než stredná hodnota mínus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s E2, počiatočná koncentrácia, ktorá sa má použiť pre 11-bodovú schému riedenia pri komplexnom testovaní, má byť jedna z týchto:

• koncentrácia vykazujúca najnižšiu upravenú hodnotu RLU pri zisťovaní rozsahu,

• maximálna rozpustná koncentrácia [pozri protokol testu antagonistu (7), obrázok 14-2],

• najnižšia cytotoxická koncentrácia [pozri protokol testu antagonistu (7), súvisiaci príklad na obrázku 14-3].

— 11-bodová schéma riedenia bude založená buď na sériovom riedení v pomere 1:2 alebo 1:5, alebo na riedení podľa týchto kritérií:

11-bodové sériové riedenie v pomere 1:2 sa použije, ak výsledný rozsah koncentrácií bude zahŕňať celý rozsah reakcií na základe krivky závislosti reakcie od koncentrácie vytvorenej v rámci testu na zistenie rozsahu. V opačnom prípade sa použije riedenie v pomere 1:5.

Komplexné testy

31. Komplexné testovanie sa skladá z 11-bodových sériových riedení (sériové riedenia v pomere 1:2 alebo 1:5 na základe počiatočnej koncentrácie podľa kritérií komplexného testovania), pričom každá koncentrácia sa testuje v troch jamkách na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (pozri obrázky 3 a 4).

— Pri komplexnom testovaní *agonistu* sa používa 11 koncentrácií E2 dvojmo ako referenčný štandard. Na každej mikrotitračnej platničke sa nachádzajú štyri jamky s replikátmi na kontrolu s DMSO a štyri jamky s replikátmi na kontrolu s metoxychlórom ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Pri komplexnom testovaní *antagonistu* sa používa deväť koncentrácií Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 dvojmo ako referenčný štandard, pričom sa použijú štyri jamky s replikátmi na kontrolu s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, štyri jamky s replikátmi na kontroly s DMSO a štyri jamky na kontrolu s $3{,}36 \times 10^{-6}$M tamoxifénu.

Obrázok 3

Rozloženie pri komplexnom teste agonistu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: TC1-1 až TC1-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1; TC2-1 až TC2-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2; E2-1 až E2-11 = koncentrácie referenčného štandardu E2 (od vysokej po nízku); Meth = slabá pozitívna kontrola s p,p'-metoxychlórom; VC = kontrola s nosičom – DMSO (1 obj. %) EFM

Obrázok 4

Rozloženie pri komplexnom teste antagonistu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: E2 = kontrola s E2; Ral-1 až Ral-9 = koncentrácie referenčného štandardu raloxifén/E2 (od vysokej po nízku); Tam = slabá pozitívna kontrola s tamoxifénom/E2; TC1-1 až TC1-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1 (TC1); TC2-1 až TC2-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2 (TC2); VC = kontrola s nosičom [DMSO (1 obj. % EFM)].

Poznámka: Ako bolo uvedené, všetky referenčné a testovacie jamky obsahujú pevne stanovenú koncentráciu E2 (9,18 × 10^{-11} M).

32. S cieľom zaručiť nezávislosť sa majú opakované komplexné testy tej istej chemikálie uskutočňovať v rôznych dňoch. Uskutočnia sa najmenej dva komplexné testy. Ak si výsledky týchto testov navzájom odporujú (t. j. jeden test je pozitívny a druhý negatívny) alebo ak je jeden z testov nedostatočný, uskutoční sa dodatočný tretí test.

Meranie luminiscencie

33. Luminiscencia sa meria v rozsahu 300 až 650 nm pomocou vstrekovacieho luminometra a softvéru, ktorý ovláda vstrekový objem a interval merania (7). Emisia svetla z jednotlivých jamiek sa vyjadruje ako počet relatívnych svetelných jednotiek (RLU) na jamku.

ANALÝZA ÚDAJOV

Stanovenie EC_{50}/IC_{50}

34. Hodnoty EC_{50} [polovica maximálne účinnej koncentrácie testovanej chemikálie (agonisti)] a IC_{50} [polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie testovanej chemikálie (antagonisti)] sa stanovujú z údajov o závislosti reakcie od koncentrácie. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú pozitívne pri jednej alebo viacerých koncentráciách, sa koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá spôsobuje polovicu maximálnej reakcie (IC_{50} alebo EC_{50}), vypočíta na základe analýzy Hillovej funkcie alebo vhodnej alternatívy. Hillova funkcia predstavuje logistický matematický model so štyrmi parametrami, ktorý vyjadruje vzťah medzi koncentráciou testovanej chemikálie a reakciou (zvyčajne vyjadrený sigmoidálnou krivkou) pomocou tejto rovnice:

$$Y = \textit{dolný bod} + \frac{(\textit{horný bod} - \textit{dolný bod})}{1 + 10(lgEC_{50} - X)\textit{sklon krivky podľa Hillovej rovnice}}$$

Keď:

Y = reakcia (t. j. počet RLU),

X = logaritmus koncentrácie,

dolný bod = minimálna reakcia,

horný bod = maximálna reakcia,

lg EC_{50} (alebo lg IC_{50}) = logaritmus X ako reakcia medzi horným a dolným bodom,

sklon krivky podľa Hillovej rovnice = strmosť krivky.

Model súži na výpočet najlepšie zodpovedajúcich hodnôt pre parametre horného a dolného bodu, sklonu krivky podľa Hillovej rovnice a IC_{50} a EC_{50}. Na výpočet hodnôt EC_{50} a IC_{50} je potrebné použiť vhodný štatistický softvér (napr. Graphpad Prism®).

Stanovenie odľahlých hodnôt

35. K správnemu štatistickému úsudku môže okrem iného prispieť použitie Q-testu [pozri protokoly testov agonistu a antagonistu (7)] na určenie „nepoužiteľných" jamiek, ktoré sa vylúčia z analýzy údajov.

36. V prípade replikátov referenčného štandardu E2 (vzorka testovaná dvojmo) sa akákoľvek upravená hodnota RLU pre replikát pri danej koncentrácii E2 považuje za odľahlú hodnotu, ak je jeho hodnota o viac ako 20 % vyššia alebo nižšia než upravená hodnota RLU pre danú koncentráciu v historickej databáze.

Získavanie a úprava údajov luminometra pri testovaní na zistenie rozsahu

37. Nespracované údaje z luminometra sa prenesú do šablóny tabuľky určenej pre túto skúšku. Je potrebné určiť, či existujú údajové body s odľahlými hodnotami, ktoré sa musia odstrániť. (Pozri kritériá prijateľnosti testov, pokiaľ ide o parametre, ktoré sa určujú v analýzach.) Vykonajú sa tieto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO (VC).

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú indukciu pre referenčný štandard (E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu EC_{50} pre testované chemikálie.

Antagonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO.

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú redukciu pre referenčný štandard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu pre referenčný štandard E2.

Krok 5 Vypočítajte strednú hodnotu IC_{50} pre testované chemikálie.

Získavanie a úprava údajov luminometra pri komplexnom testovaní

38. Nespracované údaje z luminometra sa prenesú do šablóny tabuľky určenej pre túto skúšku. Je potrebné určiť, či existujú údajové body s odľahlými hodnotami, ktoré sa musia odstrániť. (Pozri kritériá prijateľnosti testov, pokiaľ ide o parametre, ktoré sa určujú v analýzach.) Vykonajú sa tieto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO.

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú indukciu pre referenčný štandard (E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu EC_{50} pre E2 a testované chemikálie.

Krok 5 Vypočítajte strednú upravenú hodnotu RLU pre metoxychlór.

Antagonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO.

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú indukciu pre referenčný štandard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu IC_{50} pre Ral/E2 a testované chemikálie.

Krok 5 Vypočítajte strednú upravenú hodnotu RLU pre tamoxifén.

Krok 6 Vypočítajte strednú hodnotu pre referenčný štandard E2.

Kritériá na interpretáciu údajov

39. Skúška VM7Luc ER TA má tvoriť súčasť prístupu založeného na analýze váhy dôkazov na stanovenie priority pre látky na testovanie narušenia endokrinného systému (ED) *in vivo*. Súčasťou tohto postupu na stanovenie priorít bude klasifikácia testovanej chemikálie ako pozitívnej alebo negatívnej, pokiaľ ide o agonistické alebo antagonistické pôsobenie na ER. Kritériá na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej, ktoré sa použili vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA, sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

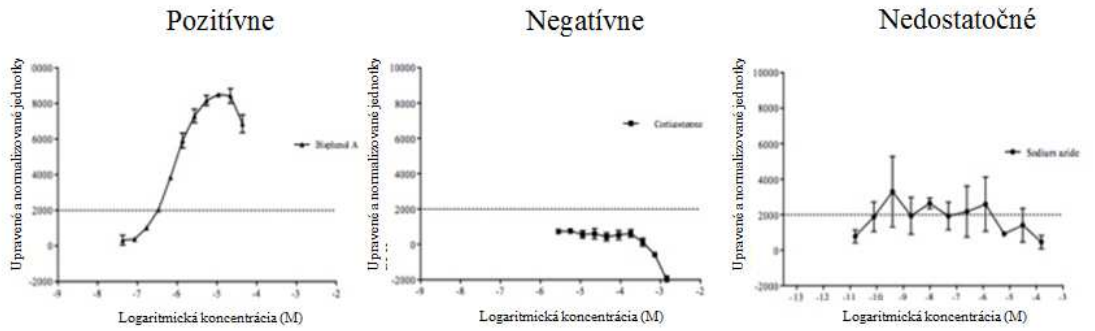
Kritériá na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej

AGONISTICKÉ PÔSOBENIE	
Pozitívne výsledky	— Všetky testované chemikálie klasifikované ako *pozitívne* z hľadiska agonistického pôsobenia na ER majú mať krivku závislosti reakcie od koncentrácie, ktorá obsahuje základnú líniu, za ktorou nasleduje časť s pozitívnym sklonom a na záver rovnovážna časť alebo vrchol. V niektorých prípadoch môžu byť vymedzené len dve z týchto charakteristík (základná línia – sklon alebo sklon – vrchol). — Línia, ktorá vymedzuje pozitívny sklon, má obsahovať najmenej tri body s neprekrývajúcimi sa pásmami odchýlky (stredná hodnota ± SD). Vylúčené sú body, ktoré tvoria základnú líniu, lineárna časť krivky však môže zahŕňať vrchol alebo prvý bod rovnovážnej časti. — Na pozitívnu klasifikáciu sa vyžaduje amplitúda reakcie, t. j. rozdiel medzi základnou líniou a vrcholom, najmenej 20 % maximálnej hodnoty v prípade referenčného štandardu E2 [t. j. najmenej 2 000 RLU, ak je maximálna hodnota reakcie referenčného štandardu (E2) upravená na 10 000 RLU]. — Ak je to možné, hodnota EC_{50} sa má vypočítať pre každú pozitívnu testovanú chemikáliu.
Negatívne výsledky	Priemerná upravená hodnota RLU pre príslušnú koncentráciu je na úrovni alebo pod úrovňou strednej hodnoty RLU kontroly s DMSO plus trojnásobku štandardnej odchýlky hodnoty RLU pre DMSO.
Nedostatočné výsledky	Údaje, ktoré vzhľadom na významné kvalitatívne alebo kvantitatívne obmedzenia nemožno interpretovať ako platné na preukázanie prítomnosti alebo neprítomnosti daného pôsobenia, sa považujú za nedostatočné a nemožno na ich základe stanoviť, či je testovaná chemikália pozitívna alebo negatívna. Test chemikálií je potrebné zopakovať.
ANTAGONISTICKÉ PÔSOBENIE	
Pozitívne výsledky	— Údaje o testovanej chemikálii vytvárajú krivku závislosti reakcie od koncentrácie, ktorá obsahuje základnú líniu, za ktorou nasleduje časť s negatívnym sklonom. — Línia, ktorá vymedzuje negatívny sklon, má obsahovať najmenej tri body s neprekrývajúcimi sa pásmami odchýlky. Vylúčené sú body, ktoré tvoria základnú líniu, lineárna časť krivky však môže zahŕňať prvý bod rovnovážnej časti. — Existovať má najmenej 20 % redukcia pôsobenia v porovnaní s maximálnou hodnotou pre referenčný štandard Ral/E2 [t. j. 8 000 RLU alebo menej, ak je maximálna hodnota reakcie referenčného štandardu (Ral/E2) upravená na 10 000 RLU]. — Najvyššie koncentrácie testovanej chemikálie, ktoré nie sú cytotoxické, majú byť menšie alebo rovné 1×10^{-5} M. — Ak je to možné, hodnota IC_{50} sa má vypočítať pre každú pozitívnu testovanú chemikáliu.
Negatívne výsledky	Všetky údajové body sa nachádzajú nad hodnotou EC_{80} (80 % reakcie E2 alebo 8 000 RLU) pri koncentráciách nižších ako $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Nedostatočné výsledky	Údaje, ktoré vzhľadom na významné kvalitatívne alebo kvantitatívne obmedzenia nemožno interpretovať ako platné na preukázanie prítomnosti alebo neprítomnosti daného pôsobenia, sa považujú za nedostatočné a nemožno na ich základe stanoviť, či je testovaná chemikália pozitívna alebo negatívna. Je potrebné zopakovať testovanie chemikálie.

40. Pozitívne výsledky bude podľa možnosti charakterizovať rozsah účinku a koncentrácia, pri ktorej k účinku dochádza. Príklady pozitívnych, negatívnych a nedostatočných údajov sa uvádzajú na obrázkoch 5 a 6.

Obrázok 5

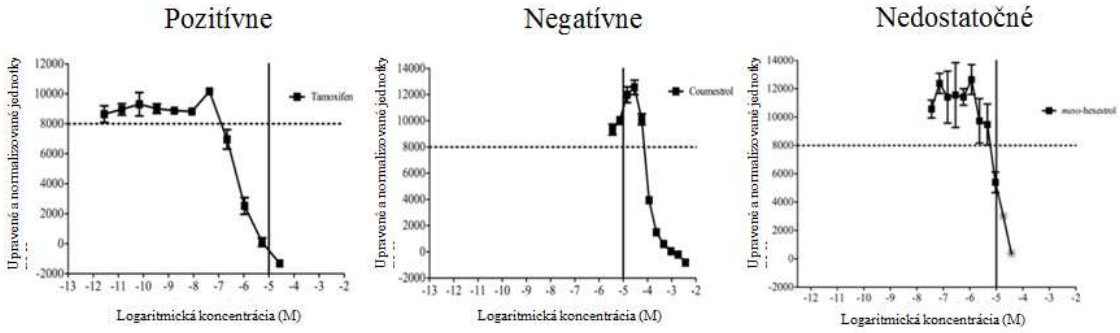
Príklady agonistu: pozitívne, negatívne a nedostatočné údaje



Prerušovaná čiara označuje 20 % reakcie E2, 2 000 upravených a normalizovaných jednotiek RLU.

Obrázok 6

Príklady antagonistu: pozitívne, negatívne a nedostatočné údaje



Prerušovaná čiara označuje 80 % reakcie Ral/E2, 8 000 upravených a normalizovaných jednotiek RLU.

Plná čiara označuje hodnotu 1,00 x 10^{-5} M. Na to, aby sa reakcia považovala za pozitívnu, musí byť pod úrovňou línie 8 000 RLU a pri koncentráciách nižších ako 1,00 x 10^{-5} M.

Koncentrácie označené hviezdičkou na grafe pre mezo-hexestrol označujú stupeň životaschopnosti „2“ alebo vyšší.

Výsledky testov pre mezo-hexestrol sa považujú za nedostatočné údaje, pretože k jedinej reakcii, ktorá je pod úrovňou 8 000 RLU, dochádza pri koncentrácii 1,00 x 10^{-5} M.

41. Výpočty EC_{50} a IC_{50} možno uskutočniť pomocou Hillovej funkcie so štyrmi parametrami [pozri ďalšie podrobnosti v protokole testu agonistu a protokole testu antagonistu (7)]. Splnenie kritérií prijateľnosti naznačuje, že systém funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testovacieho cyklu vyplynú presné údaje. Duplikovanie výsledkov prvého testovacieho cyklu je najlepším potvrdením toho, že boli generované presné údaje (pozri odsek 19 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER).

SPRÁVA O TESTE

42. Pozri odsek 20 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER.

LITERATÚRA

(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): s. 270 – 273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: s. 261 – 287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1): 67 – 82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10): 1 459 – 69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6): 646 – 57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10): 4 252 – 63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280 – 288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649 – 654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072 – 2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67 – 82.

Dodatok 4

SKÚŠKA NA ZÁKLADE TRANSAKTIVÁCIE STABILNE TRANSFEKTOVANÉHO ĽUDSKÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA A NA URČENIE ESTROGÉNOVÉHO AGONISTICKÉHO A ANTAGONISTICKÉHO PÔSOBENIA CHEMIKÁLIÍ POMOCOU BUNKOVEJ LÍNIE ERA CALUX

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške transaktivácie ERα CALUX sa využíva ľudská bunková línia U2OS na stanovenie estrogénového agonistického a antagonistického pôsobenia sprostredkovaného ľudským estrogénovým receptorom alfa (hERα). Na základe validačnej štúdie stabilne transfektovanej biologickej analýzy ERα CALUX uskutočnenej spoločnosťou BioDetection Systems BV (Amsterdam, Holandsko) sa preukázala relevantnosť a spoľahlivosť tejto skúšky na zamýšľaný účel (1). Pri bunkovej línii ERα CALUX dochádza len k expresii stabilne transfektovaného ľudského estrogénového receptora ERα (2) (3).

2. Táto skúška je osobitne navrhnutá na detekciu transaktivácie sprostredkovanej receptorom hERα, pričom ako sledovaný parameter sa meria bioluminiscencia. Bioluminiscencia sa bežne využíva v biologických analýzach vzhľadom na vysoký pomer signál-šum (4).

3. Uvádza sa, že pri koncentráciách fytoestrogénu vyšších ako 1 μM dochádza k nadmernej aktivácii reportérového génu luciferázy, čo vedie k luminiscencii, ktorá nie je sprostredkovaná receptorom (5) (6) (7). Pri skúškach stabilne transfektovanej transaktivácie ER je preto potrebné dôkladne preskúmať vyššie koncentrácie fytoestrogénov alebo iných podobných zlúčenín, ktoré môžu spôsobiť nadmernú aktiváciu expresie luciferázy (pozri dodatok 2).

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti VŠEOBECNÝ ÚVOD a ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Táto biologická analýza slúži na posúdenie naviazania ligandu ER a následného premiestnenia komplexu receptora a ligandu do jadra. V jadre sa komplex receptora a ligandu naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén luciferázy svetlušky svätojánskej, čo vedie k zvýšenej bunkovej expresii enzýmu luciferázy. Po pridaní luciferázového substrátu luciferínu sa luciferín transformujte na bioluminiscenčný produkt. Svetlo, ktoré vzniká, možno jednoducho detegovať a kvantifikovať pomocou luminometra.

6. V testovacom systéme sa využívajú stabilne transfektované bunky ERα CALUX. Bunky ERα CALUX pochádzajú z bunkovej línie U2OS osteoblastického osteosarkómu. Ľudské bunky U2OS boli stabilne transfektované s 3xHRE-TATA-Luc a pSG5-neo-hERα pomocou metódy založenej na súčasnom vyzrážaní fosforečnanu vápenatého. Bunková línia U2OS bola zvolená ako najvhodnejší kandidát, aby slúžila ako reportérová bunková línia reagujúca na estrogén (a iné steroidné hormóny), a to na základe pozorovania, že bunková línia U2OS vykazuje len malú alebo nevykazuje žiadnu aktivitu endogénnych receptorov. Neprítomnosť endogénnych receptorov sa posudzovala len pomocou reportérových plazmidov luciferázy, pričom sa pri pridaní ligandov receptora neprejavila žiadna aktivita. Okrem toho táto bunková línia podporovala silné reakcie sprostredkované hormónmi, keď sa prechodne zaviedli príbuzné receptory (2) (3) (8).

7. Súčasťou testovania estrogénového alebo antiestrogénového pôsobenia chemikálií pomocou bunkovej línie ERα CALUX je predbežný testovací cyklus a komplexné testovacie cykly. Počas predbežného testovacieho cyklu sa určuje rozpustnosť, cytotoxicita a upravený rozsah koncentrácií testovaných chemikálií určených na komplexné testovanie. Počas komplexných testovacích cyklov sa upravené rozsahy koncentrácií testovaných chemikálií testujú v rámci biologických analýz ERα CALUX, po ktorých nasleduje klasifikácia testovaných chemikálií z hľadiska agonistického alebo antagonistického účinku.

8. Kritériá na interpretáciu údajov sú podrobne opísané v odseku 59. Testovanú chemikáliu možno stručne charakterizovať ako pozitívnu z hľadiska agonistického účinku v prípade, že aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie vykazujú reakciu, ktorá sa rovná alebo je vyššia ako 10 % maximálnej reakcie referenčného štandardu 17β-estradiolu (PC_{10}). Testovanú chemikáliu možno charakterizovať ako pozitívnu z hľadiska antagonistického účinku v prípade, že aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie vykazujú reakciu, ktorá sa rovná alebo je nižšia ako 80 % maximálnej reakcie referenčného štandardu tamoxifénu (PC_{80}).

POSTUP

Bunkové línie

9. Na túto skúšku sa používa stabilne transfektovaná bunková línia U2OS ERα CALUX. Túto bunkovú líniu možno na základe technickej licenčnej zmluvy získať od organizácie BioDetection Systems BV, Amsterdam, Holandsko.

10. Používať sa majú len bunkové kultúry bez prítomnosti mykoplazmy. Použité šarže buniek buď majú mať certifikáciu potvrdzujúcu neprítomnosť kontaminácie mykoplazmou, alebo sa má pred použitím uskutočniť test na mykoplazmu. Na citlivú detekciu mykoplazmatickej infekcie sa má použiť polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (RT-PCR) (9).

Stabilita bunkovej línie

11. Na zachovanie stability a integrity buniek CALUX sa majú bunky skladovať v tekutom dusíku (–80 °C). Po rozmrazení buniek na začatie kultivácie novej kultúry sa bunky aspoň dvakrát subkultivujú a až potom sa použijú na posúdenie estrogénového agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií. Subkultivácia buniek nemá presiahnuť 30 pasáží.

12. S cieľom monitorovať stabilitu bunkovej línie v priebehu času sa vnímavosť agonistického a antagonistického testovacieho systému overuje na základe hodnotenia hodnôt EC_{50} alebo IC_{50} referenčného štandardu. Okrem toho sa monitoruje relatívna indukcia pozitívnej kontrolnej vzorky (PC) a negatívnej kontrolnej vzorky (NC). Výsledky majú byť v súlade s kritériami prijateľnosti pre agonistickú (tabuľka 3C) alebo antagonistickú (tabuľka 4C) biologickú analýzu ERα CALUX. V tabuľke 1 sa uvádzajú referenčné štandardy, pozitívne a negatívne kontroly pre agonistický režim a v tabuľke 2 pre antagonistický režim.

Bunková kultúra a podmienky očkovania

13. Bunky U2OS sa kultivujú v rastovom médiu [DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červeňou ako indikátorom pH, ktoré je doplnené bovinným fetálnym sérom (7,5 %), neesenciálnymi aminokyselinami (1 %), 10 jednotkami/ml penicilínu, streptomycínu a geneticínu (G-418) ako selekčným markerom]. Bunky sa umiestnia do inkubátora s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2) pri teplote 37 °C a 100 % vlhkosti. Keď sa pri bunkách dosiahne konfluencia 85 – 95 %, bunky sa buď subkultivujú, alebo sa pripravia na naočkovanie do 96-jamkových mikrotitračných platničiek. V druhom uvedenom prípade sa bunky resuspendujú v objeme 1×10^5 buniek/ml v skúšobnom médiu bez prítomnosti estrogénu [DMEM/F12 (1:1) bez fenolovej červene, ktoré je doplnené bovinným fetálnym sérom ošetreným uhlím povrchovo upraveným dextránom (5 obj. %), neesenciálnymi aminokyselinami (1 obj. %) a 10 jednotkami/ml penicilínu a streptomycínu] a naočkujú sa do jamiek 96-jamkových mikrotitračných platničiek (100 µl homogenizovanej bunkovej suspenzie). Bunky sa 24 hodín pred expozíciou preinkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkosť). Plastové nádoby musia byť bez prítomnosti estrogénov.

Kritériá prijateľnosti

14. Agonistické a antagonistické pôsobenia testovaných chemikálií sa testujú v testovacích sériách. Testovacia séria obsahuje najviac šesť mikrotitračných platničiek. Každá testovacia séria obsahuje najmenej jednu úplnú sériu riedení referenčného štandardu, pozitívnu kontrolnú vzorku, negatívnu kontrolnú vzorku a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. Na obrázkoch 1 a 2 sa uvádza rozloženie na mikrotitračných platničkách pri agonistických a antagonistických testovacích sériách.

15. Každé riedenie referenčných štandardov, testovaných chemikálií, ako aj všetky kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a pozitívne a negatívne kontroly sa analyzujú trojmo. Každá z trojnásobných analýz musí spĺňať kritériá uvedené v tabuľke 3A a 4A.

16. Na prvej mikrotitračnej platničke v každej testovacej sérii sa meria úplná séria riedení referenčného štandardu (17β-estradiol pre agonistický účinok; tamoxifén pre antagonistický účinok). Na to, aby bolo možné porovnať výsledky analýzy zvyšných 5 mikrotitračných platničiek s prvou mikrotitračnou platničkou, ktorá obsahuje úplnú krivku závislosti reakcie od koncentrácie pre referenčný štandard, musia všetky mikrotitračné platničky obsahovať 3 kontrolné vzorky: kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, najvyššiu koncentráciu testovaného referenčného štandardu a približnú koncentráciu referenčného štandardu zodpovedajúcu hodnotám EC_{50} (agonistický účinok) alebo IC_{50} (antagonistický účinok). Pomer priemerných kontrolných vzoriek na prvej mikrotitračnej platničke a na zvyšných 5 platničkách má vyhovovať požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

17. Pri každej mikrotitračnej platničke v testovacej sérii sa vypočíta z-faktor (10). Pri výpočte z-faktora sa používajú reakcie na najvyššiu a najnižšiu koncentráciu referenčného štandardu. Mikrotitračná platnička sa považuje za platnú v prípade, že vyhovuje požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

18. Referenčný štandard má vykazovať sigmoidálnu krivku závislosti odozvy od dávky. Hodnota EC_{50} alebo IC_{50} odvodená z reakcie série riedení referenčného štandardu má vyhovovať požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

19. Súčasťou každej testovacej série je pozitívna a negatívna kontrolná vzorka. Vypočítaná relatívna indukcia pozitívnej aj negatívnej kontrolnej vzorky má vyhovovať požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

20. Pri všetkých meraniach sa indukčný faktor najvyššej koncentrácie referenčného štandardu meria tak, že sa priemerná hodnota relatívnej svetelnej jednotky (RLU) reakcie pri najvyššej koncentrácii referenčného štandardu 17β-estradiolu vydelí priemernou hodnotou RLU reakcie referenčnej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. Pri tomto indukčnom faktore majú byť splnené minimálne požiadavky z hľadiska násobnej indukcie, ktoré sa uvádzajú v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

21. Len mikrotitračné platničky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá prijateľnosti, sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií.

22. Kritériá prijateľnosti sa vzťahujú na predbežné aj komplexné testovacie cykly.

Tabuľka 1

Koncentrácie referenčného štandardu, pozitívnej kontroly (PC) a negatívnej kontroly (NC) pre agonistickú biologickú analýzu CALUX

	Látka	Registračné číslo CAS	Testovací rozsah (M)
Referenčný štandard	17β-estradiol	50-28-2.	$1 \times 10^{-13} – 1 \times 10^{-10}$
Pozitívna kontrola (PC)	17α-metyltestosterón	58-18-4	3×10^{-6}
Negatívna kontrola (NC)	kortikosterón	50-22-6	1×10^{-8}

Tabuľka 2

Koncentrácie referenčného štandardu, pozitívnej kontroly (PC) a negatívnej kontroly (NC) pre antagonistickú biologickú analýzu CALUX

	Látka	Registračné číslo CAS	Testovací rozsah (M)
Referenčný štandard	tamoxifén	10540-29-1	$3 \times 10^{-9} – 1 \times 10^{-5}$
Pozitívna kontrola (PC)	4-hydroxytamoxifén	68047-06-3	1×10^{-9}
Negatívna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	1×10^{-5}

Tabuľka 3

Kritériá prijateľnosti pre agonistickú biologickú analýzu ERα CALUX

A – samostatné vzorky na mikrotitračnej platničke		**Kritérium**
1	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek (pre NC, PC, jednotlivé riedenia testovanej chemikálie a referenčného štandardu, okrem C0)	< 15 %
2	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek [pre referenčný štandard a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (C0, SC)]	< 30 %
3	Maximálny únik LDH ako miera cytotoxicity.	< 120 %
B – v rámci jednej mikrotitračnej platničky		
4	Pomer kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard (C0; platnička 1) a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (SC; platničky 2 až x)	0,5 až 2,0
5	Pomer aprox. hodnoty EC_{50} a najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničke 1 a aprox. hodnoty EC_{50} a najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničkách 2 až x (C4, C8)	0,70 až 1,30
6	Z-faktor pre jednotlivé platničky	> 0,6
C – v rámci jednej série analýz (všetky mikrotitračné platničky v rámci jednej série)		
7	Sigmoidálna krivka referenčného štandardu	áno (17ß-estradiol)
8	Rozsah EC_{50} referenčného štandardu 17ß-estradiolu	4×10^{-12} – 4×10^{-11} M
9	Minimálna násobná indukcia najvyššej koncentrácie 17ß-estradiolu vzhľadom na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard.	5
10	Relatívna indukcia (%) PC.	> 30 %
11	Relatívna indukcia (%) NC	< 10 %

Aprox.: aproximatívna; PC: pozitívna kontrola; NC: negatívna kontrola; SC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu; C0: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard; SD: štandardná odchýlka; LDH: laktátdehydrogenáza

Tabuľka 4

Kritériá prijateľnosti pre antagonistickú biologickú analýzu ERα CALUX

	A – samostatné vzorky na mikrotitračnej platničke	**Kritérium**
1	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek [pre NC, PC, jednotlivé riedenia testovanej chemikálie a referenčného štandardu, kontrola s aplikáciou rozpúšťadla (C0)]	< 15 %
2	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek [pre kontrolu s nosičom (VC) a najvyššiu koncentráciu referenčného štandardu (C8)]	< 30 %
3	Maximálny únik LDH ako miera cytotoxicity.	< 120 %
	B – v rámci jednej mikrotitračnej platničky	
4	Pomer kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard (C0; platnička 1) a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (SC; platničky 2 až x)	0,70 až 1,30
5	Pomer aprox. koncentrácií IC_{50} referenčného štandardu na platničke 1 a aprox. koncentrácií IC_{50} referenčného štandardu na platničkách 2 až x (C4)	0,70 až 1,30
6	Pomer najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničke 1 a najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničkách 2 až x (C8)	0,50 až 2,0
7	Z-faktor pre jednotlivé platničky	> 0,6
	C – v rámci jednej série analýz (všetky mikrotitračné platničky v rámci jednej série)	
8	Sigmoidálna krivka referenčného štandardu	áno (tamoxifén)
9	Rozsah IC_{50} referenčného štandardu (tamoxifén)	1×10^{-8} – 1×10^{-7} M
10	Minimálna násobná indukcia kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard vzhľadom na najvyššiu koncentráciu tamoxifénu.	2,5
11	Relatívna indukcia (%) PC.	< 70 %
12	Relatívna indukcia (%) NC	> 85 %

Aprox.: aproximatívna; PC: pozitívna kontrola; NC: negatívna kontrola; VC: kontrola s nosičom (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla bez pevne stanovenej koncentrácie agonistického referenčného štandardu); SC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu; C0: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard; SD: štandardná odchýlka; LDH: laktátdehydrogenáza

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom, referenčné štandardy, pozitívne kontroly, negatívne kontroly

23. Pre predbežný testovací cyklus aj pre komplexné testovacie cykly sa má použiť rovnaká kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom, referenčné štandardy, pozitívne kontroly a negatívne kontroly. Okrem toho má byť rovnaká aj koncentrácia referenčných štandardov, pozitívnych kontrol a negatívnych kontrol.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla

24. Rozpúšťadlo, ktoré slúži na rozpustenie testovanej chemikálie, sa má testovať ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla. Počas validácie biologickej analýzy ERα CALUX sa ako nosič použil dimetylsulfoxid (DMSO, 1 obj. %; registračné číslo CAS 67-68-5). Ak sa použije iné rozpúšťadlo ako DMSO, všetky referenčné štandardy, kontroly a testované chemikálie sa majú testovať s rovnakým nosičom. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre antagonistické štúdie obsahuje pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu, ktorým je 17β-estradiol (približne v koncentrácii EC_{50}). S cieľom testovať rozpúšťadlo pre antagonistické štúdie je potrebné pripraviť a testovať kontrolu s nosičom.

Kontrola s nosičom (antagonistický účinok)

25. Na testovanie antagonistického účinku sa do média skúšky dopĺňa pevne stanovená koncentrácia agonistického referenčného štandardu, ktorým je 17β-estradiol (približne v koncentrácii EC_{50}). Na testovanie rozpúšťadla, ktoré slúži na rozpustenie testovaných chemikálií pri skúmaní antagonistického účinku, sa pripraví médium skúšky bez pevne stanovenej koncentrácie agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu. Táto kontrolná vzorka sa označí ako kontrola s nosičom. Počas validácie biologickej analýzy ERα CALUX sa ako nosič použil dimetylsulfoxid (DMSO, 1 obj. %; registračné číslo CAS 67-68-5). Ak sa použije iné rozpúšťadlo ako DMSO, všetky referenčné štandardy, kontroly a testované chemikálie sa majú testovať s rovnakým nosičom.

Referenčné štandardy

26. Agonistický referenčný štandard je 17β-estradiol (tabuľka 1). Referenčný štandard obsahuje sériu riedení ôsmich koncentrácií 17β-estradiolu (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. Antagonistický referenčný štandard je tamoxifén (tabuľka 2). Referenčný štandard obsahuje sériu riedení ôsmich koncentrácií tamoxifénu (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). Každá z koncentrácií antagonistického referenčného štandardu sa inkubuje spolu s pevne stanovenou koncentráciou agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu (3×10^{-12} M).

Pozitívna kontrola

28. Pozitívna kontrola pre agonistické štúdie je 17α-metyltestosterón (tabuľka 1).

29. Pozitívna kontrola pre antagonistické štúdie je 4-hydroxytamoxifén (tabuľka 2). Antagonistická pozitívna kontrola sa inkubuje spolu s pevne stanovenou koncentráciou agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu (3×10^{-12} M).

Negatívna kontrola

30. Negatívna kontrola pre agonistické štúdie je kortikosterón (tabuľka 1).

31. Negatívna kontrola pre antagonistické štúdie je resveratrol (tabuľka 2). Antagonistická negatívna kontrola sa inkubuje spolu s pevne stanovenou koncentráciou agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu (3×10^{-12} M).

Preukazovanie spôsobilosti laboratória (pozri odsek 14 a tabuľky 3 a 4 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER tejto testovacej metódy)

Nosič

32. Rozpúšťadlo, ktoré slúži na rozpustenie testovaných chemikálií, má zabezpečiť úplné rozpustenie testovanej chemikálie a má byť miešateľné s bunkovým médiom. Vhodnými rozpúšťadlami sú DMSO, voda a etanol (s čistotou 95 % až 100 %). V prípade použitia DMSO ako rozpúšťadla nemá maximálna koncentrácia DMSO počas inkubácie prekročiť 1 obj. %. Pred použitím sa má rozpúšťadlo testovať s cieľom overiť, že nie je cytotoxické a nenarušuje výkonnosť skúšok.

Príprava referenčných štandardov, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a testovaných chemikálií

33. Referenčné štandardy, pozitívne kontroly, negatívne kontroly a testované chemikálie sa rozpustia v 100 % DMSO (alebo vo vhodnom rozpúšťadle). Vhodné (sériové) riedenia sa potom pripravia v tom istom rozpúšťadle. Pred rozpustením sa majú všetky látky nechať ustáliť pri izbovej teplote. V čerstvo pripravených zásobných roztokoch referenčných štandardov, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a testovaných chemikálií sa nemá vyskytovať viditeľná zrazenina ani zakalenie. Referenčné štandardy a kontroly možno pripraviť vo väčšom množstve do zásoby. Zásobné roztoky testovaných chemikálií sa majú pripraviť čerstvo pred každým pokusom. Konečné riedenia referenčných štandardov, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a testovaných chemikálií je potrebné pripraviť čerstvo pre každý pokus a použiť do 24 hodín od prípravy.

Rozpustnosť, cytotoxicita a zisťovanie rozsahu.

34. Počas predbežného testovacieho cyklu sa stanoví rozpustnosť testovaných chemikálií vo zvolenom rozpúšťadle. Pripraví sa zásoba s maximálnou koncentráciou 0,1 M. V prípade, že sa pri tejto koncentrácii vyskytnú problémy s rozpustnosťou, pripravia sa zásobné roztoky s nižšou koncentráciou, až kým sa testované chemikálie úplne nerozpustia. Počas predbežného testovacieho cyklu sa testujú sériové riedenia testovanej chemikálie v pomere 1:10. Maximálna koncentrácia skúšky pri testovaní agonistického alebo antagonistického účinku je 1 mM. Po predbežnom testovacom cykle sa odvodí vhodne upravený rozsah koncentrácie testovaných chemikálií, ktorý sa bude testovať počas komplexných testovacích cyklov. Pri komplexnom testovaní sa použijú riedenia 1 x, 3 x, 10 x, 30 x, 100 x, 300 x, 1000 x a 3000 x.

35. Súčasťou protokolu skúšky agonistu a antagonistu je testovanie cytotoxicity (11). Cytotoxicita sa testuje v rámci predbežného testovacieho cyklu aj v rámci komplexných testovacích cyklov. Ako metóda na posúdenie cytotoxicity sa počas validácie biologickej analýzy ERα CALUX použil test úniku laktátdehydrogenázy (LDH) v kombinácii s kvalitatívnou vizuálnou kontrolou buniek (pozri dodatok 4.1) po expozícii testovaným chemikáliám. Použiť však možno aj iné kvantitatívne metódy na stanovenie cytotoxicity (napr. kolorimetrická skúška s využitím tetrazólia (MTT) alebo biologická analýza cytotoxicity CALUX). Vo všeobecnosti sa testované chemikálie, pri ktorých sa prejavuje viac ako 20 % zníženie životaschopnosti buniek, považujú za cytotoxické a nemožno ich preto použiť na vyhodnotenie údajov. Pokiaľ ide o skúšku úniku LDH, koncentrácia testovanej chemikálie sa považuje za cytotoxickú, keď je percentuálna hodnota úniku LDH vyššia ako 120 %.

Expozícia testovanej chemikálii a usporiadanie mikrotitračnej platničky pri skúške

36. Po ošetrení banky s konfluentnými kultivovanými bunkami trypsínom sa bunky opätovne rozmiešajú v koncentrácii 1×10^5 buniek/ml v skúšobnom médiu bez prítomnosti estrogénov. Opätovne rozmiešané bunky sa naočkujú po 100 µl do vnútorných jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. Vonkajšie jamky sa naplnia 200 µl fosfátového tlmivého fyziologického roztoku (PBS) (pozri obrázky 1 a 2). Naočkované bunky sa počas 24 hodín preinkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkosť).

37. Po preinkubácii sa mikrotitračné platničky vizuálne skontrolujú z hľadiska cytotoxicity (pozri dodatok 4.1), kontaminácie a konfluencie. Na testovanie sa použijú len mikrotitračné platničky, pri ktorých sa neprejavuje vizuálna cytotoxicita ani kontaminácia a ktoré majú minimálne 85 % mieru konfluencie. Médium z vnútorných jamiek sa opatrne odstráni a nahradí sa 200 µl skúšobného média bez prítomnosti estrogénov, ktoré obsahuje vhodné série

riedenia referenčných štandardov, testovaných chemikálií, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla (tabuľka 5: agonistické štúdie; tabuľka 6: antagonistické štúdie). Všetky referenčné štandardy, testované chemikálie, pozitívne kontroly, negatívne kontroly a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa testujú trojmo. Na obrázku 1 sa uvádza rozloženie na mikrotitračnej platničke pri testovaní agonistického účinku. Na obrázku 2 sa uvádza rozloženie na mikrotitračnej platničke pri testovaní antagonistického účinku. Rozloženie na mikrotitračnej platničke pri predbežnom a komplexnom testovaní je identické. Pri testovaní antagonistického účinku obsahujú všetky vnútorné jamky, s výnimkou jamiek obsahujúcich kontrolu s nosičom (VC), aj pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M). Ku každej platničke TC je potrebné pridať referenčné štandardy C8 a C4.

38. Po expozícii buniek všetkým chemikáliám sa 96-jamkové mikrotitračné platničky inkubujú ďalších 24 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkosť).

Obrázok 1

Rozloženie na 96-jamkových mikrotitračných platničkách na účely predbežného testovacieho cyklu a posúdenia agonistického účinku.

Mikrotitračná platnička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Ďalšie mikrotitračné platničky

	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 (EC_{50})	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 = rozpúšťadlo pre referenčný štandard.

C(1 – 8) = série riedení (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) referenčného štandardu.

PC = pozitívna kontrola.

NC = negatívna kontrola.

TCx-(1 – 8) = riedenia (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) testovanej chemikálie na účely predbežného testovacieho cyklu a posúdenia agonistického účinku testovanej chemikálie x.

SC = kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (optimálne rovnaké rozpúšťadlo ako v prípade C0, ale prípadne z inej šarže).

Sivé bunky: = vonkajšie jamky, naplnené 200 µl PBS.

Obrázok 2

Rozloženie na 96-jamkových mikrotitračných platničkách na účely antagonistického predbežného testovacieho cyklu a posúdenia antagonistického účinku.

Mikrotitračná platnička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Ďalšie mikrotitračné platničky

	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 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max.)	
F		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max.)	
G		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max.)	
H												

C0 = rozpúšťadlo pre referenčný štandard.

C(1 – 8) = série riedení (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) referenčného štandardu.

NC = negatívna kontrola.

PC = pozitívna kontrola.

TCx-(1 – 8) = riedenia (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) testovanej chemikálie na účely predbežného testovacieho cyklu a posúdenia agonistického účinku testovanej chemikálie x.

SC = kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (optimálne rovnaké rozpúšťadlo ako v prípade C0, ale prípadne z inej šarže).

VC = kontrola s nosičom (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla bez pevne stanovenej koncentrácie agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu).

Sivé bunky: = vonkajšie jamky, naplnené 200 µl PBS.

Poznámka: všetky vnútorné jamky, s výnimkou jamiek obsahujúcich kontrolu s nosičom (VC), obsahujú aj pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Meranie luminiscencie

39. Meranie luminiscencie sa podrobne opisuje v protokoloch skúšky agonistu a antagonistu (10). Médium z jamiek sa odstráni a bunky sa lýzujú 24 hodín po inkubácii, aby došlo k otvoreniu bunkovej membrány a bolo možné merať aktivitu luciferázy.

40. Pri postupe na meranie luminiscencie sa vyžaduje luminometer vybavený dvomi vstrekovačmi. Reakciu luciferázy spúšťa vstreknutie substrátu luciferínu. Reakcia sa zastaví pridaním 0,2 M NaOH. Zastavením reakcie sa predchádza prenosu luminiscencie medzi jednotlivými jamkami.

41. Emitované svetlo z jednotlivých jamiek sa vyjadruje ako počet relatívnych svetelných jednotiek (RLU) na jamku.

Predbežný testovací cyklus

42. Na základe výsledkov analýzy predbežného testovacieho cyklu sa určuje upravený rozsah koncentrácie testovaných chemikálií na komplexné testovanie. Podrobný opis vyhodnotenia výsledkov analýzy predbežného testovacieho cyklu a určenia upraveného rozsahu koncentrácie testovaných chemikálií na komplexné testovanie sa uvádza v protokole skúšky agonistu a antagonistu (10). Na tomto mieste sa uvádza stručné zhrnutie postupov na určenie rozsahu koncentrácie testovaných chemikálií na účely testovania agonistického a antagonistického účinku. Usmernenie k návrhu sériového riedenia sa uvádza v tabuľkách 5 a 6.

Výber koncentrácií na posúdenie agonistických účinkov

43. Počas predbežného testovacieho cyklu sa testované chemikálie majú testovať pomocou sérií riedení, ktoré sa uvádzajú v tabuľke 5 (agonistický účinok) a tabuľke 6 (antagonistický účinok). Všetky koncentrácie sa testujú v trojnásobných jamkách podľa rozloženia mikrotitračnej platničky uvedeného na obrázku 1 (agonistický účinok) alebo obrázku 2 (antagonistický účinok).

44. Len výsledky analýzy, ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (tabuľka 3), sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie jedna alebo viacero mikrotitračných platničiek, je potrebné vykonať opätovnú analýzu príslušných mikrotitračných platničiek. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie prvá mikrotitračná platnička, ktorá obsahuje úplnú sériu riedení referenčného štandardu, musí sa zopakovať rozbor úplnej testovacej série (6 mikrotitračných platničiek).

45. Upraviť počiatočné rozsahy koncentrácie testovaných chemikálií a zopakovať predbežný testovací cyklus je potrebné v týchto prípadoch:

— Zistí sa cytotoxicita. Postup predbežného testovacieho cyklu sa zopakuje s použitím nižších, necytotoxických koncentrácií testovanej chemikálie.

— Pri predbežnom testovaní testovanej chemikálie sa nedosiahne kompletná krivka závislosti odozvy od dávky, pretože pri testovaných koncentráciách sa dosiahne maximálna indukcia. Predbežný testovací cyklus sa zopakuje s použitím nižších koncentrácií testovanej chemikálie.

46. Keď sa pozoruje platný vzťah dávky a účinku, vyberie sa (najnižšia) koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje maximálna indukcia a pri ktorej sa neprejavuje cytotoxicita. Najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa bude testovať pri komplexných testovacích cykloch, má predstavovať trojnásobok tejto vybratej koncentrácie.

47. Pripraví sa úplná upravená séria riedení testovanej chemikálie s krokmi riedenia uvedenými v tabuľke 5, pričom sa začína s najvyššou koncentráciou určenou vyššie.

48. Testovaná chemikália, ktorá nevyvoláva agonistický účinok, sa testuje v rámci komplexných testovacích cyklov, pričom sa začína od najvyššej necytotoxickej koncentrácie zistenej počas predbežného testovania.

Výber koncentrácií na posúdenie antagonistických účinkov

49. Len výsledky analýzy, ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (tabuľka 4), sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie jedna alebo viacero mikrotitračných platničiek, je potrebné vykonať opätovnú analýzu príslušných mikrotitračných platničiek. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie prvá mikrotitračná platnička, ktorá obsahuje úplnú sériu riedení referenčného štandardu, musí sa zopakovať rozbor úplnej testovacej série (6 mikrotitračných platničiek).

50. Upraviť počiatočné rozsahy koncentrácie testovaných chemikálií a zopakovať predbežný testovací cyklus je potrebné v týchto prípadoch:

— Zistí sa cytotoxicita. Postup predbežného testovacieho cyklu sa zopakuje s použitím nižších, necytotoxických koncentrácií testovanej chemikálie.

— Pri predbežnom testovaní testovanej chemikálie sa nedosiahne kompletná krivka závislosti odozvy od dávky, pretože pri testovaných koncentráciách sa dosiahne maximálna inhibícia. Predbežné testovanie sa zopakuje s použitím nižších koncentrácií testovanej chemikálie.

51. Keď sa zistí platný vzťah dávky a účinku, vyberie sa (najnižšia) koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje maximálna inhibícia a pri ktorej sa neprejavuje cytotoxicita. Najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa bude testovať pri komplexných testovacích cykloch, má predstavovať trojnásobok tejto vybratej koncentrácie.

52. Pripraví sa úplná upravená séria riedení testovanej chemikálie s krokmi riedenia uvedenými v tabuľke 6, pričom sa začína s najvyššou koncentráciou určenou vyššie.

53. Testované chemikálie, ktoré nevyvolávajú antagonistické účinky, sa testujú v rámci komplexných testovacích cyklov, pričom sa začína od najvyššej necytotoxickej koncentrácie testovanej počas predbežného testovania.

Komplexné testovacie cykly

54. Po výbere upravených rozsahov koncentrácie sa testované chemikálie komplexne testujú pomocou sérií riedení, ktoré sa uvádzajú v tabuľke 5 (agonistický účinok) a tabuľke 6 (antagonistický účinok). Všetky koncentrácie sa testujú v trojnásobných jamkách podľa rozloženia mikrotitračnej platničky uvedeného na obrázku 1 (agonistický účinok) alebo obrázku 2 (antagonistický účinok).

55. Len výsledky analýzy, ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (tabuľky 3 a 4), sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie jedna alebo viacero mikrotitračných platničiek, je potrebné vykonať opätovnú analýzu príslušných mikrotitračných platničiek. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie prvá mikrotitračná platnička, ktorá obsahuje úplnú sériu riedení referenčného štandardu, musí sa zopakovať rozbor úplnej testovacej série (6 mikrotitračných platničiek).

Tabuľka 5

Koncentrácie a riedenia referenčných štandardov, kontrol a testovaných chemikálií použité na účely testovania agonistického účinku

Koncentrácia referenčného 17β-estradiolu (M)		TCx – riedenie v predbežnom testovacom cykle		TCx – riedenie v komplexnom testovacom cykle		Koncentrácia 17β-estradiolu (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3×10^{-6}
C1	1×10^{-13}	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1×10^{-8}
C2	3×10^{-13}	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1×10^{-12}	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3×10^{-12}	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6×10^{-12}	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1×10^{-11}	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3×10^{-11}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1×10^{-10}						

TCx –testovaná chemikália x
PC –pozitívna kontrola (17α-metyltestosterón)
NC –negatívna kontrola (kortikosterón)
C0 –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard
SC –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu

Tabuľka 6

Koncentrácie a riedenia referenčných štandardov, kontrol a testovaných chemikálií použité na účely testovania antagonistického účinku

Koncentrácia referenčného tamoxifénu (M)		TCx – riedenie v predbežnom testovacom cykle		TCx – riedenie v komplexnom testovacom cykle		Koncentrácia kontrol (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1×10^{-9}
C1	3×10^{-9}	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1×10^{-5}
C2	1×10^{-8}	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3×10^{-8}	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1×10^{-7}	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	3×10^{-7}	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Koncentrácia doplneného**	
C6	1×10^{-6}	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**agonistu (M)**	
C7	3×10^{-6}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	3×10^{-12}
C8	1×10^{-5}						

TCx –testovaná chemikália x
PC –pozitívna kontrola (4-hydroxytamoxifén)
NC –negatívna kontrola (resveratrol)
C0 –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard
SC –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu
VC –kontrola s nosičom [neobsahuje pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M)]

Zhromažďovanie a analýza údajov

56. Po predbežnom a komplexnom testovacom cykle sa na účely testovania agonistického účinku určia hodnoty EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} a maximálna indukcia (TCx_{max}) testovanej chemikálie. Pri testovaní antagonistického účinku sa vypočítajú hodnoty IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} a minimálna indukcia (TCx_{min}). Na obrázku 3 (agonistický účinok) a obrázku 4 (antagonistický účinok) je uvedené grafické znázornenie týchto parametrov. Požadované parametre sa vypočítajú na základe relatívnej indukcie jednotlivých testovaných chemikálií [vzhľadom na maximálnu indukciu referenčného štandardu (= 100 %)]. Na vyhodnotenie údajov sa používa nelineárna regresia (variabilný sklon, 4 parametre) podľa tejto rovnice:

$$Y = dolný\ bod + \frac{(horný\ bod - dolný\ bod)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times sklon\ krivky\ podľa\ Hillovej\ rovnice})}$$

Keď:

X = logaritmus dávky alebo koncentrácie

Y = reakcia [relatívna indukcia (%)]

horný bod = maximálna indukcia (%)

dolný bod = minimálna indukcia (%)

$LogEC_{50}$ = logaritmus koncentrácie, pri ktorej sa pozoruje 50 % maximálnej reakcie

sklon krivky podľa Hillovej rovnice = faktor sklonu krivky alebo podľa Hillovej rovnice

57. Nespracované údaje z luminometra, vyjadrené ako relatívne svetelné jednotky (RLU), sa prenesú do tabuľky na analýzu údajov určenej pre predbežný a komplexný testovací cyklus. Nespracované údaje majú spĺňať kritériá prijateľnosti uvedené v tabuľkách 3A a 3B (agonistický účinok) alebo 4A a 4B (antagonistický účinok). V prípade, že nespracované údaje spĺňajú kritériá prijateľnosti, na určenie požadovaných parametrov sa uskutočnia tieto výpočtové kroky:

Agonistický účinok

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy referenčných štandardov.

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy testovaných chemikálií.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií referenčného štandardu. Pre indukciu najvyššej koncentrácie referenčného štandardu stanovte hodnotu 100 %.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií testovanej chemikálie v porovnaní s najvyššou koncentráciou referenčného štandardu, ktorej zodpovedá hodnota 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy pomocou nelineárnej regresie (variabilný sklon, 4 parametre).

— Stanovte hodnoty EC_{50} a EC_{10} referenčného štandardu.

— Stanovte hodnoty EC_{50} a EC_{10} testovaných chemikálií.

— Stanovte maximálnu relatívnu indukciu testovanej chemikálie (TC_{max}).

— Stanovte hodnoty PC_{10} a PC_{50} testovaných chemikálií.

V prípade testovaných chemikálií nemožno vždy dosiahnuť kompletnú krivku závislosti odozvy od dávky, napríklad v dôsledku cytotoxicity alebo problémov s rozpustnosťou. Hodnoty EC_{50}, EC_{10} a PC_{50} tak nemožno určiť. V takom prípade možno určiť len hodnoty PC_{10} a TC_{max}.

Antagonistický účinok

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU najvyššej koncentrácie referenčného štandardu od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy referenčných štandardov.

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU najvyššej koncentrácie referenčného štandardu od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy testovaných chemikálií.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií referenčného štandardu. Pre indukciu najnižšej koncentrácie referenčného štandardu stanovte hodnotu 100 %.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií testovanej chemikálie v porovnaní s najnižšou koncentráciou referenčného štandardu, ktorej zodpovedá hodnota 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy pomocou nelineárnej regresie (variabilný sklon, 4 parametre).

— Stanovte hodnoty IC_{50} a IC_{20} referenčného štandardu.

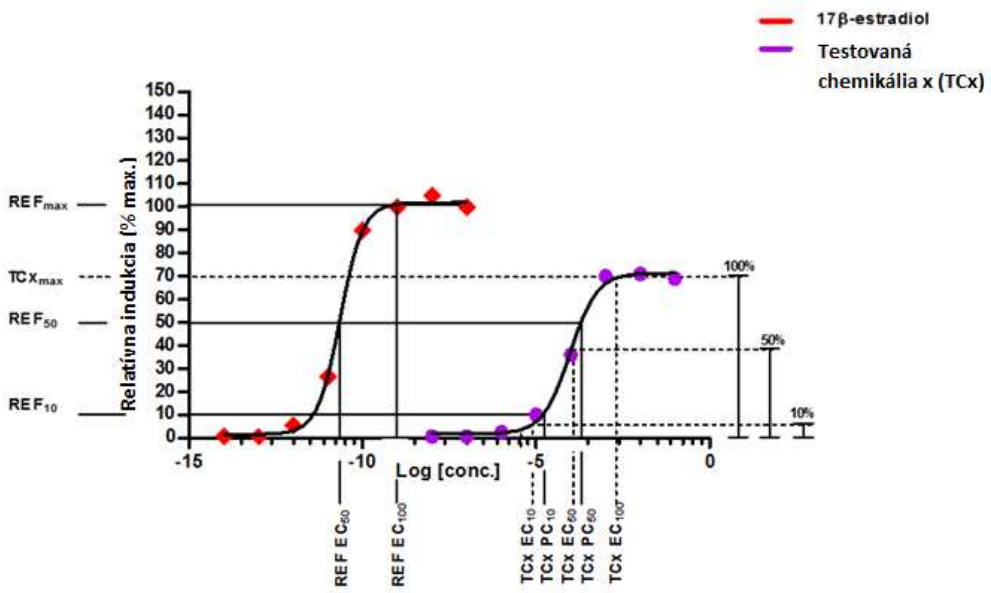
— Stanovte hodnoty IC_{50} a IC_{20} testovaných chemikálií.

— Stanovte minimálnu relatívnu indukciu testovanej chemikálie (TC_{min}).

— Stanovte hodnoty PC_{80} a PC_{50} testovaných chemikálií.

Obrázok 3

Prehľad parametrov určených v skúške agonistu



EC_{10} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 10 % maximálnej reakcie pri danej látke.

EC_{50} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 50 % maximálnej reakcie pri danej látke.

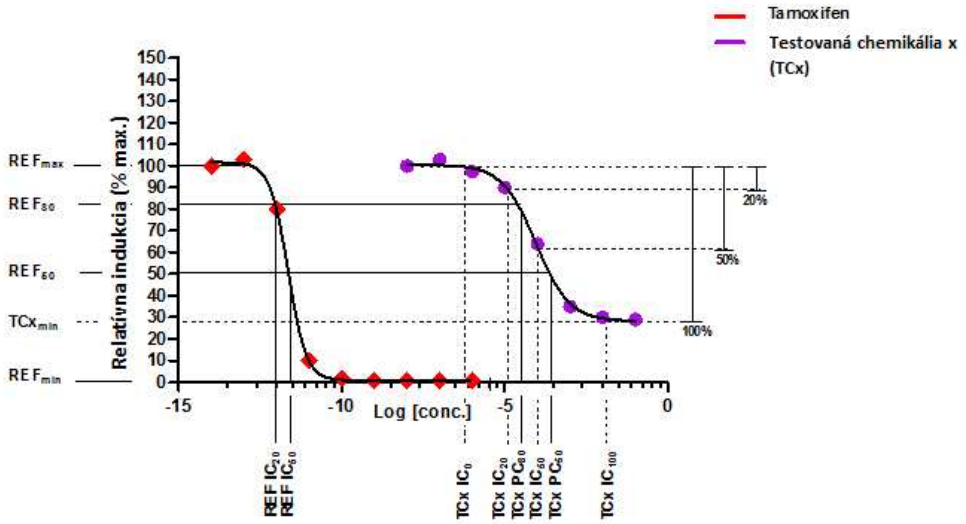
PC_{10} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote EC_{10} referenčného štandardu.

PC_{50} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote EC_{50} referenčného štandardu.

TCx_{max} = maximálna relatívna indukcia testovanej chemikálie.

Obrázok 4

Prehľad parametrov určených v skúške antagonistu



IC_{20} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 80 % maximálnej reakcie pri danej látke (20 % inhibícia).

IC_{50} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 50 % maximálnej reakcie pri danej látke (50 % inhibícia).

PC_{80} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote IC_{20} referenčného štandardu.

PC_{50} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote IC_{50} referenčného štandardu.

TCx_{min} = minimálna relatívna indukcia testovanej chemikálie.

V prípade testovaných chemikálií nemožno vždy dosiahnuť kompletnú krivku závislosti odozvy od dávky, napríklad v dôsledku cytotoxicity alebo problémov s rozpustnosťou. Hodnoty IC_{50}, IC_{20} a PC_{50} tak nemožno určiť. V takom prípade možno určiť len hodnoty PC_{20} a TC_{min}.

58. Výsledky by mali byť založené na dvoch (alebo troch) nezávislých testovacích cykloch. Ak sa z dvoch testovacích cyklov získajú porovnateľné a tým aj reprodukovateľné výsledky, nie je nevyhnutné uskutočňovať tretí cyklus. Na to, aby boli výsledky prijateľné, musia:

— spĺňať kritériá prijateľnosti (pozri kritériá prijateľnosti v odsekoch 14 – 22),

— byť reprodukovateľné.

Kritériá na interpretáciu údajov

59. Pri interpretácii údajov a rozhodnutí o tom, či sa testovaná chemikália považuje za pozitívnu alebo negatívnu, sa majú použiť tieto kritériá:

Agonistický účinok

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **pozitívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{max} sa rovná alebo prekračuje 10 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{10}).

2. Aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{10} alebo ju prekračujú.

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **negatívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{max} neprekračuje 10 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{10}).

2. Menej ako dve koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{10} alebo ju prekračujú.

Antagonistický účinok

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **pozitívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{min} sa rovná alebo je nižšia ako 80 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{80} = 20 % inhibícia).

2. Aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{80} alebo sú nižšie ako táto hodnota.

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **negatívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{min} prekračuje 80 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{80} = 20 % inhibícia).

2. Menej ako dve koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{80} alebo sú nižšie ako táto hodnota.

60. Na charakterizovanie potencie pozitívnej reakcie testovanej chemikálie sa uvádza rozsah účinku (agonistický účinok: TC_{max}, antagonistický účinok: TC_{min}) a koncentrácia, pri ktorej dochádza k účinku (agonistický účinok: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonistický účinok: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

SPRÁVA O TESTE

61. Pozri odsek 20 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER

LITERATÚRA

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136 – 148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156 – 1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6): 646 – 57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459 – 1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252 – 4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204 – 211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173 – 187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769 – 771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67 – 73

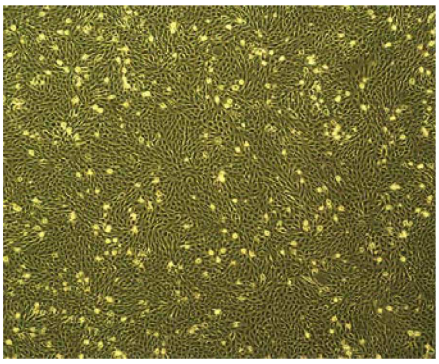
(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Dodatok 4.1:

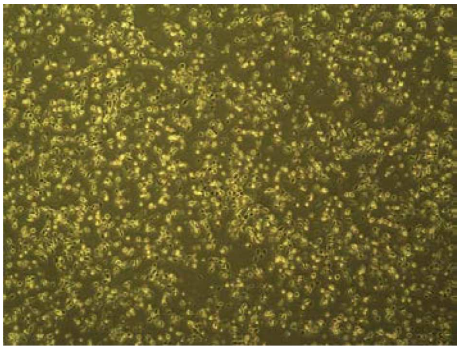
VIZUÁLNA KONTROLA ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNIEK



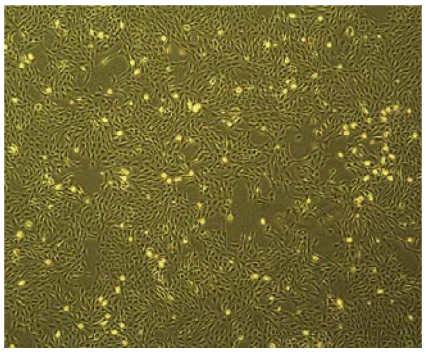
< 5 % konfluencia. Práve sa uskutočnilo naočkovanie buniek. 100 % životaschopnosť buniek. Klasifikácia: „žiadna cytotoxicita“.



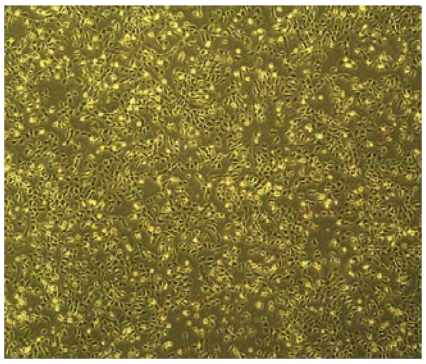
> 95 % konfluencia. Bunky sú nahustené a začínajú prerastať. > 95 % životaschopnosť buniek.
Klasifikácia: „žiadna cytotoxicita“.



< 5 % životaschopnosť buniek. Bunky sú úplne oddelené a kontakt medzi nimi je prerušený. Bunky sú zaokrúhlené. Klasifikácia: „cytotoxicita“.



> 85 % konfluencia. V tomto štádiu sú bunky vystavené testovanej chemikálii. > 95 % životaschopnosť buniek.
Klasifikácia: „žiadna cytotoxicita“.



< 25 % životaschopnosť buniek. Bunky sa začínajú oddeľovať a znižuje sa miera kontaktu medzi nimi. Bunky sú zaokrúhlené. Klasifikácia: „cytotoxicita“.

B.67 *IN VITRO* TESTY NA GÉNOVÉ MUTÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK S VYUŽITÍM GÉNU TYMIDÍNKINÁZY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 490 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne preskúmavajú a revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, regulačné potreby a dobré životné podmienky zvierat. Skúška lymfómu myší (MLA) a test TK6 s využitím lokusu tymidínkinázy (TK) boli pôvodne súčasťou testovacej metódy B.17. Následne sa v rámci Expertnej pracovnej skupiny pre MLA organizácie IWGT (Medzinárodný seminár o testovaní genotoxicity) vytvorili medzinárodne harmonizované odporúčania pre kritériá prijateľnosti skúšky a interpretáciu údajov pre skúšku MLA (1) (2) (3) (4) (5), pričom tieto odporúčania sú začlenené do tejto novej testovacej metódy B.67. Táto testovacia metóda je sformulovaná pre skúšku MLA a pre test TK6, keďže využíva aj lokus TK. Zatiaľ čo sa skúška MLA často používa na regulačné účely, test TK6 sa používa omnoho zriedkavejšie. Je potrebné poznamenať, že napriek podobnosti medzi sledovanými parametrami nie sú tieto dve bunkové línie zameniteľné a v rámci regulačných programov sa môže oprávnene uprednostniť jedna metóda pred druhou na konkrétne regulačné použitie. Napríklad validácia skúšky MLA preukázala jej vhodnosť na účely detekcie nielen génovej mutácie, ale aj schopnosti testovanej chemikálie vyvolať štrukturálne poškodenie chromozómu. Táto testovacia metóda je súčasťou série testovacích metód týkajúcich sa genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (6).

2. *In vitro* test na génové mutácie cicavčích buniek sa používa na zistenie génových mutácií vyvolaných chemikáliami. V bunkových líniách, ktoré sa používajú v týchto testoch, sa merajú priame mutácie v reportérových génoch, konkrétne v endogénnom géne tymidínkinázy (*TK* pri ľudských bunkách a *Tk* pri bunkách hlodavcov, spoločne sa v tejto testovacej metóde označuje ako *TK*). Táto testovacia metóda je určená na použitie s dvomi bunkovými líniami: bunkovou líniou myšacieho lymfómu L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (so všeobecným označením L5178Y) a TK6 ľudskou lymfoblastoidnou bunkovou líniou (so všeobecným označením TK6). Hoci sa tieto dve bunkové línie líšia z hľadiska pôvodu, bunkového rastu, statusu p53 atď., testy na génové mutácie *TK* možno pri oboch typoch buniek uskutočniť podobným spôsobom podľa opisu v tejto testovacej metóde.

3. Vďaka autozomálnej a heterozygotnej povahe génu tymidínkinázy je možná detekcia životaschopných kolónií, ktorých bunky majú nedostatok enzýmu tymidínkinázy v dôsledku mutácie z $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$. Tento nedostatok môže byť spôsobený genetickými udalosťami, ktoré ovplyvňujú gén *TK*, vrátane génových mutácií (bodové mutácie, mutácie s posunom čítacieho rámca, malé delécie atď.) a chromozómovými udalosťami (veľké delécie, štrukturálne chromozómové aberácie a mitotické rekombinácie). Chromozómové udalosti sa prejavujú stratou heterozygozity, čo je bežná genetická zmena tumor supresorových génov v procese vzniku tumorov u človeka. Teoreticky možno v rámci skúšky MLA detegovať stratu celého chromozómu, ktorý je nosičom génu *TK*, v dôsledku poruchy deliaceho vretienka a/alebo mitotickej nondisjunkcie. Z kombinácie cytogenetickej a molekulárnej analýzy je jednoznačne zrejmé, že niektoré mutanty TK v rámci skúšky MLA sú spôsobené nondisjunkciou. Z analýzy váhy dôkazov však vyplýva, že testy na génové mutácie *TK* neumožňujú spoľahlivú detekciu aneugénov pri uplatnení štandardných kritérií cytotoxicity (podľa opisu v tejto testovacej metóde), a preto nie je vhodné používať tieto testy na detekciu aneugénov (7) (8) (9).

4. Pri testoch na génové mutácie *TK* vznikajú dve odlišné fenotypové triedy mutantov *TK*: normálne rastúce mutanty, ktoré rastú rovnakou rýchlosťou ako heterozygotné bunky TK, a pomaly rastúce mutanty, ktoré pri raste vykazujú predĺžené časy zdvojenia. Normálne rastúce a pomaly rastúce mutanty možno v rámci skúšky MLA rozpoznať ako mutanty s veľkými, resp. malými kolóniami a v rámci testu TK6 ako mutanty so skorým, resp. neskorým vznikom kolónií. Molekulárna a cytogenetická povaha mutantov s veľkými a malými kolóniami v rámci skúšky MLA bola podrobne preskúmaná (8) (10) (11) (12) (13). Takisto sa vo veľkej miere skúmala molekulárna a cytogenetická povaha skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantov v rámci testu TK6 (14) (15) (16) (17). Pomaly rastúce mutanty pri oboch typoch buniek utrpeli genetické poškodenie, ktoré sa týka predpokladaných génov regulujúcich rast v blízkosti lokusu *TK* a spôsobuje predĺžené časy zdvojenia a oneskorené vytváranie kolónií alebo vytváranie malých kolónií (18). Indukcia pomaly rastúcich mutantov sa dáva do súvislosti s chemikáliami, ktoré vyvolávajú závažné štrukturálne zmeny na úrovni chromozómov. Bunky, ktorých poškodenie sa netýka predpokladaných génov regulujúcich rast v blízkosti lokusu TK, rastú rýchlosťou podobnou rodičovským bunkám a stávajú sa normálne rastúcimi mutantmi. Indukcia primárne normálne rastúcich mutantov sa dáva do súvislosti s chemikáliami, ktoré primárne pôsobia ako bodové mutagénne látky. Je preto nevyhnutné stanoviť počet pomaly rastúcich a normálne rastúcich mutantov tak, aby sa zahrnuli všetky mutanty a aby sa získali určité poznatky o typoch poškodenia (mutagény verzus klastogény) vyvolaných testovanou chemikáliou (10) (12) (18) (19).

5. Testovacia metóda je usporiadaná tak, aby poskytovala všeobecné informácie k skúške MLA aj k testu TK6, ako aj špecializované usmernenie k jednotlivým testom.

6. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

7. Testy vykonávané *in vitro* si vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Exogénny systém metabolickej aktivácie nenapodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*.

8. Je potrebné dbať na to, aby sa predišlo podmienkam, ktoré by mohli viesť k falošným pozitívnym výsledkom (t. j. možnej interakcii so systémom testovania), ktoré by neboli spôsobené interakciou medzi testovanou chemikáliou a genetickým materiálom bunky, pričom medzi takéto podmienky patria zmeny pH alebo osmolality, interakcia so zložkami média (20) (21) alebo nadmerné úrovne cytotoxicity (22) (23) (24). Cytotoxicita, ktorá prekračuje odporúčané horné hranice cytotoxicity uvedené v odseku 28, sa na účely skúšky MLA a testu TK6 považuje za nadmernú. Okrem toho je potrebné poznamenať, že testované chemikálie, ktoré sú analógmi tymidínu alebo sa správajú ako analógy tymidínu, môžu zvýšiť frekvenciu mutácií v dôsledku selektívneho rastu spontánnych mutantov na pozadí počas ošetrovania buniek a na ich primerané hodnotenie sa môžu vyžadovať dodatočné testovacie metódy (25).

9. V prípade vyrobených nanomateriálov môže byť potrebné túto testovaciu metódu osobitne upraviť, tieto úpravy však nie sú opísané v tejto testovacej metóde.

10. Pred použitím tejto testovacej metódy na testovanie zmesi s cieľom generovať údaje na zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

11. Mutantné bunky s nedostatočnou aktivitou enzýmu tymidínkinázy z dôvodu mutácie $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$ sú odolné voči cytostatickým účinkom pyrimidínového analógu trifluorotymidínu (TFT). Bunky s dostatkom *TK* sú citlivé na TFT, ktorý spôsobuje inhibíciu bunkového metabolizmu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Mutantné bunky sú tak za prítomnosti TFT schopné rozširovať sa a vytvárať viditeľné kolónie, zatiaľ čo bunky, ktoré obsahujú enzým TK, toho schopné nie sú.

PRINCÍP TESTU

12. Bunky v suspenzii sa vystavia testovanej chemikálii s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie i bez takéhoto zdroja (pozri odsek 19) na primeraný čas (pozri odsek 33) a následne sa subkultivujú na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypového prejavu pred mutantnou selekciou. Cytotoxicita sa pri skúške MLA stanovuje na základe relatívneho nárastu celkového počtu buniek (RTG – pozri odsek 25) a pri teste TK6 na základe relatívneho prežitia (RS – pozri odsek 26). Ošetrené kultúry sa primeraný čas, charakteristický pre každý typ buniek (pozri odsek 37), udržiavajú v rastovom médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypický prejav indukovaných mutácií. Po fenotypovom prejave sa frekvencia mutácií stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných kolónií a do média bez selektívneho činidla na stanovenie klonovacej účinnosti (životaschopnosti). Po vhodnom inkubačnom čase sa kolónie zrátajú. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií s korekciou podľa klonovacej účinnosti v čase mutantnej selekcie.

OPIS METÓDY

Príprava

Bunky

13. Pri skúške MLA: Keďže skúška MLA bola vytvorená a charakterizovaná pomocou vedľajšej línie $TK^{+/-}$-3.7.2C buniek L5178Y, pri skúške MLA sa musí použiť táto konkrétna vedľajšia línia. Bunková línia L5178Y bola odvodená od lymfómu týmusu vyvolaného metylcholantrénom z myši DBA-2 (26). Clive a spolupracovníci ošetrili bunky L5178Y (ktoré Clive označil ako $TK^{+/+}$-3) etylmetán sulfonátom a izolovali klon $TK^{-/-}$ (s označením $TK^{-/-}$-3.7) pomocou brómdeoxyuridínu ako selektívneho činidla. Z klonu $TK^{-/-}$ sa izoloval spontánny klon $TK^{+/-}$ (s označením $TK^{+/-}$-3.7.2.) a subklon (s označením $TK^{+/-}$-3.7.2C), ktoré boli charakterizované na použitie v skúške MLA (27). Bol zverejnený karyotyp pre bunkovú líniu (28) (29) (30) (31). Modálny počet chromozómov je 40. Prítomný je

jeden metacentrický chromozóm (t12;13), ktorý sa počíta za jeden chromozóm. Lokus *TK* pri myšiach sa nachádza na distálnom konci chromozómu 11. Bunková línia L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C obsahuje mutácie v oboch alelách p53 a vytvára mutantnú bielkovinu p53 (32) (33). Status p53 bunkovej línie $TK^{+/-}$−3.7.2C pravdepodobne zodpovedá za schopnosť testu detegovať poškodenie veľkého rozsahu (17).

14. Pri teste TK6: TK6 je ľudská lymfoblastoidná bunková línia. Rodičovská bunková línia je bunková línia transformovaného vírusu Epsteina a Barrovej (EBV), WI-L2, ktorá bola pôvodne získaná od 5-ročného chlapca s dedičnou sférocytózou. Prvý izolovaný klon, HH4, bol mutagenizovaný pomocou ICR191 a bola vytvorená heterozygotná bunková línia *TK*, TK6 (34). Bunky TK6 sú takmer diploidné a reprezentatívny karyotyp je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Lokus *TK* u ľudí sa nachádza na dlhom ramene chromozómu 17. TK6 je p53-kompetentná bunková línia, pretože obsahuje normálnu (*wild type*) sekvenciu p53 v oboch alelách a dochádza pri nej k expresii len normálnej (*wild type*) bielkoviny p53 (36).

15. V prípade skúšky MLA aj testu TK6 sa pri počiatočnom vytvorení alebo doplňaní zásoby materských buniek odporúča, aby skúšobné laboratórium potvrdilo neprítomnosť kontaminácie mykoplazmou, stanovilo karyotyp buniek alebo farebne označilo chromozómy, v ktorých sa nachádza lokus *TK*, ako aj overilo časy zdvojenia populácie. Mala by sa stanoviť dĺžka bežného bunkového cyklu buniek použitých v skúšobnom laboratóriu, ktorá by mala byť v súlade s bunkovými charakteristikami uvedenými v literatúre (16) (19) (37). Táto zásoba materských buniek sa má uskladňovať pri teplote −150 °C alebo nižšej a má slúžiť na prípravu všetkých pracovných zásob buniek.

16. Buď pred vytvorením veľkého počtu kryogénne zakonzervovaných pracovných zásob alebo pred použitím v rámci pokusu môže byť potrebné prečistiť kultúru od existujúcich mutantných buniek [pokiaľ frekvencia mutácií (MF) kontroly s aplikáciou rozpúšťadla už nie je v prijateľnom rozsahu – pozri tabuľku 2 pre skúšku MLA]. Dosahuje sa to pomocou metotrexátu (aminopterín), ktorý slúži na vylúčenie TK-deficientných buniek, a pridaním tymidínu, hypoxantínu a glycínu (L5178Y) alebo 2'-deoxycytidínu (TK6) ku kultúre na zabezpečenie optimálneho rastu TK-kompetentných buniek (19) (38) (39) a (40) pre TK6. Všeobecné odporúčania týkajúce sa osvedčených postupov v súvislosti s udržiavaním bunkových kultúr, ako aj špecifické odporúčania pre bunky L5178Y a TK6 sa nachádzajú v zdrojoch (19) (31) (37) (39) (41). Pre laboratóriá, ktoré potrebujú zásoby materských buniek na začatie skúšky MLA alebo testu TK6, alebo ktoré potrebujú získať nové zásoby materských buniek, je k dispozícii bunková banka obsahujúca riadne charakterizované bunky (37).

Médiá a podmienky kultivácie

17. Pri oboch testoch sa na udržiavanie kultúr má použiť vhodné kultivačné médium a inkubačné podmienky (napr. kultivačné nádoby, atmosféra s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2, inkubačná teplota 37 °C). Bunkové kultúry sa majú vždy udržiavať v podmienkach, v ktorých je zabezpečené, že ich rast prebieha v logaritmickej fáze. Osobitne dôležité je zvoliť médiá a podmienky kultivácie tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas doby expresie a klonovanie mutantných aj nemutantných buniek. V prípade MLA a TK6 je taktiež dôležité, aby podmienky kultivácie zaisťovali optimálny rast mutantov TK s veľkými kolóniami/skorým vznikom, ako aj s malými kolóniami/neskorým vznikom. Ďalšie podrobnosti o kultivácii vrátane potreby správne tepelne inaktivovať konské sérum, ak sa počas mutantnej selekcie používa médium RPMI, sa nachádzajú v zdrojoch (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Príprava kultúr

18. Bunky sa rozmnožujú zo zásobných kultúr a nasadia sa do kultivačného média v takej hustote, aby pri suspenzných kultúrach pokračoval exponenciálny rast počas času ošetrenia a doby expresie.

Metabolická aktivácia

19. Ak sa použijú bunky L5178Y a TK6, mali by sa použiť exogénne systémy metabolickej aktivácie, pretože tieto bunky majú nedostatočnú endogénnou metabolickú kapacitu. Najpoužívanejším systémom, ktorý sa štandardne odporúča, pokiaľ to nie je odôvodnené inak, je kofaktormi obohatená postmitochondriálna frakcia (S9) pripravená z pečene hlodavcov (väčšinou potkanov) ošetrená činidlami na indukciu enzýmov, ako je napríklad Aroclor 1254 (43) (44) (45) alebo kombinácia fenobarbitalu a β-naftoflavónu (46) (47) (48) (49) (50) (51). Uvedená kombinácia nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (52) a preukázateľne je pri indukovaní

oxidáz so zmiešanými funkciami rovnako účinná ako Aroclor 1254 (45) (46) (47) (48) (49). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách od 1 % do 2 %, môže sa však zvýšiť až na 10 obj. %. Výber typu a koncentrácie použitého exogénneho systému metabolickej aktivácie alebo metabolického induktora môže ovplyvniť trieda testovaných chemikálií.

Príprava testovaných chemikálií

20. Testované chemikálie v tuhom skupenstve by sa podľa potreby mali rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle pred tým, než sa nimi ošetria bunky (pozri odsek 21). Kvapalné testované chemikálie možno pridať priamo do testovacieho systému a/alebo pred aplikáciou na testovací systém rozriediť. Plynné alebo prchavé testované chemikálie by sa mali testovať tak, že sa štandardné protokoly vhodne upravia, napríklad sa v nich uskutoční ošetrenie v uzavretých kultivačných nádobách (53) (54) (55). Prípravky testovanej chemikálie by sa mali pripraviť bezprostredne pred ošetrením, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

PODMIENKY TESTOVANIA

Rozpúšťadlá

21. Rozpúšťadlo by sa malo zvoliť tak, aby sa optimalizovala rozpustnosť testovanej chemikálie bez toho, aby rozpúšťadlo malo negatívny vplyv na vykonávanie testu (napr. zmenou rastu buniek), ovplyvňovalo integritu testovanej chemikálie, reagovalo s kultivačnými nádobami a narušovalo systém metabolickej aktivácie. Odporúča sa, pokiaľ je to možné, najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla (alebo kultivačného média). Osvedčenými rozpúšťadlami sú voda alebo dimetylsulfoxid. Organické rozpúšťadlá by vo všeobecnosti nemali presiahnuť 1 obj. % a vodné rozpúšťadlá (fyziologický roztok alebo voda) by nemali presiahnuť 10 obj. % v konečnom médiu určenom na testovanie. Ak sa použijú iné ako osvedčené rozpúšťadlá (napr. etanol alebo acetón), ich použitie by malo byť podložené údajmi o ich kompatibilite s testovanými chemikáliami a testovacím systémom a o tom, že v použitej koncentrácii nie sú genotoxické. V prípade, že tieto podkladové údaje nie sú k dispozícii, je dôležité do testu doplniť neošetrené kontroly (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1) s cieľom preukázať, že zvolené rozpúšťadlo nevyvoláva žiadne nepriaznivé ani mutagénne účinky.

MERANIE CYTOTOXICITY A VÝBER KONCENTRÁCIÍ TESTOVANEJ CHEMIKÁLIE

22. Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by sa malo zabrániť použitiu koncentrácií, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne reakcie, napr. koncentrácií vyvolávajúcich nadmernú cytotoxicitu (pozri odsek 28), zrážanie kultivačného média (pozri odsek 29) alebo výrazné zmeny pH alebo osmolality (pozri odsek 8). Ak testovaná chemikália v čase, keď sa pridáva, spôsobuje výraznú zmenu pH média, mohlo by sa pH upraviť aplikovaním tlmivého roztoku do konečného média určeného na testovanie tak, aby nedošlo k falošným pozitívnym výsledkom a aby sa zachovali vhodné kultivačné podmienky.

23. Koncentrácia sa určuje na základe cytotoxicity a iných faktorov (pozri odseky 27 – 30). Aj keď z hľadiska lepšieho definovania koncentrácií, ktoré sa majú použiť v hlavnom pokuse, môže byť užitočné hodnotenie cytotoxicity v počiatočnom teste, počiatočný test nie je povinný. Aj keď sa vykoná počiatočné hodnotenie cytotoxicity, vyžaduje sa aj meranie cytotoxicity jednotlivých kultúr v hlavnom pokuse. Ak sa uskutočňuje pokus na zistenie rozsahu, má zahŕňať široký rozsah koncentrácií, pričom sa môže ukončiť na prvý deň po ošetrení alebo môže pokračovať počas expresie na druhý deň až po mutantnú selekciu (ak sa zdá, že použité koncentrácie sú vhodné).

24. Cytotoxicita sa má stanoviť pre jednotlivé samostatné testovacie kultúry a pre kontrolnú kultúru: metódy pre MLA (2) a TK6 (15) sú vymedzené na základe medzinárodne dohodnutých postupov.

25. Pri verzii MLA s využitím agaru aj verzii s využitím mikrotitračnej metódy: Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho nárastu celkového počtu buniek (RTG), ktorý pôvodne vymedzili Clive a Spector v roku 1975 (2). Súčasťou tohto merania je relatívny nárast počtu buniek v suspenzii (RSG: testovacia kultúra v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla) počas ošetrovania buniek, čas expresie a relatívna klonovacia účinnosť (RCE: testovacia kultúra v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla) v čase selekcie mutantov (2). Je potrebné poznamenať, že relatívny nárast počtu buniek v suspenzii zahŕňa všetky straty buniek, ku ktorým dôjde v testovacej kultúre počas ošetrenia (pozri vzorce v dodatku 2).

26. Pri teste TK6: Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia (RS), t. j. klonovacej účinnosti buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia, a to na základe počtu buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (ktorej je priradená miera prežitia 100 %) (pozri vzorec v dodatku 2).

27. Mali by sa vyhodnotiť aspoň štyri testovacie koncentrácie (bez kontroly s rozpúšťadlom a pozitívnej kontroly), ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (vhodná cytotoxicita, počet buniek atď.). Hoci sa odporúča použitie duplicitných kultúr, pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť buď paralelné kultúry, alebo jednotlivé ošetrené kultúry. Výsledky získané z paralelných kultúr pri danej koncentrácii sa majú uvádzať samostatne, možno ich však zlúčiť na účely analýzy údajov (55). V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú malú alebo nevykazujú žiadnu cytotoxicitu, budú za bežných okolností vhodné približne dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrácií. Pri výskyte cytotoxicity by vybraté koncentrácie mali pokrývať rozsah cytotoxicity od koncentrácie, ktorá vyvoláva cytotoxicitu, ako sa opisuje v odseku 28, a zahŕňať koncentrácie, pri ktorých je cytotoxicita mierna a slabá alebo žiadna. Mnohé testované chemikálie vykazujú strmé krivky závislosti reakcie od koncentrácie a s cieľom pokryť celý rozsah cytotoxicity alebo podrobne preskúmať reakciu v závislosti od koncentrácie môže byť nevyhnutné použiť viac koncentrácií s tesnejším odstupom a viac ako štyri koncentrácie, najmä v situáciách, keď sa vyžaduje opakovať pokus (pozri odsek 70). Použitie viac ako štyroch koncentrácií môže byť obzvlášť dôležité pri použití jednotlivých kultúr.

28. Ak maximálna koncentrácia vychádza z cytotoxicity, najvyššia koncentrácia by mala dosahovať hodnotu RTG v rozsahu 20 až 10 % pre MLA a hodnotu RS v rozsahu 20 až 10 % pre TK6 (odsek 67).

29. V prípade slabo rozpustných testovaných chemikálií, ktoré nie sú cytotoxické pri koncentráciách nižších, než je najnižšia nerozpustná koncentrácia, by najvyššia analyzovaná koncentrácia mala na konci ošetrenia testovanou chemikáliou vyvolať zakalenie alebo zrazeninu viditeľnú voľným okom alebo pomocou inverzného mikroskopu. Aj keď sa cytotoxicita vyskytne pri koncentrácii vyššej, ako je najnižšia nerozpustná koncentrácia daných chemikálií, testovať sa odporúča len pri jednej koncentrácii vyvolávajúcej zakalenie alebo viditeľnú zrazeninu, pretože falošné účinky môžu byť spôsobené zrazeninou. Keďže sa pri skúške MLA a teste TK6 používajú suspenzné kultúry, je potrebné zabezpečiť, aby táto zrazenina nenarušovala vykonávanie testu. Môže byť takisto užitočné pred pokusom stanoviť rozpustnosť v kultivačnom médiu.

30. Ak sa nezistí žiadna zrazenina ani obmedzujúca cytotoxicita, najvyššia testovaná koncentrácia by mala zodpovedať 10 mM, 2 mg/ml alebo 2 µl/ml, podľa toho, ktorá je najnižšia (57) (58). Keď testovaná chemikália nemá určené zloženie, napr. látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály [t. j. chemické látky neznámeho alebo variabilného zloženia (UVCB)], extrakty z prostredia atď., môže byť potrebná vyššia maximálna koncentrácia (napr. 5 mg/ml) v prípade absencie dostatočnej cytotoxicity, aby sa zvýšila koncentrácia jednotlivých zložiek. Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (59).

Kontroly

31. Pre všetky pokusné podmienky by sa mali zahrnúť súbežné negatívne kontroly (pozri odsek 21), ktoré pozostávajú zo samotného rozpúšťadla v médiu určenom na testovanie a s ktorými sa manipuluje rovnakým spôsobom ako s ošetrenými kultúrami.

32. Súbežné pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti laboratória identifikovať mutagénne látky v podmienkach použitého testovacieho protokolu a v prípade potreby aj na preukázanie účinnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie, ako aj na preukázanie primeranej detekcie malých/neskoro vznikajúcich a veľkých/skoro vznikajúcich mutantov *TK*. Príklady pozitívnych kontrol sú uvedené v tabuľke 1 ďalej. V odôvodnených prípadoch sa môžu na pozitívnu kontrolu použiť alternatívne látky. Keďže testy na cicavčích bunkách *in vitro* na zistenie genetickej toxicity sú pri krátkodobých ošetreniach (3 – 4 hodiny) vykonávaných súbežne s metabolickou aktiváciou a bez nej a pri rovnakom čase ošetrenia dostatočne štandardizované, možno použitie pozitívnych kontrol obmedziť na testovanie mutagénnej látky vyžadujúcej metabolickú aktiváciu. V tomto prípade reakcia na túto jednu pozitívnu kontrolu preukáže činnosť systému metabolickej aktivácie, ako aj vnímavosť testovacieho systému. Dlhodobé ošetrovanie (t. j. 24 hodín bez S9) by však malo mať svoju vlastnú pozitívnu kontrolu, keďže dĺžka ošetrovania sa bude líšiť od testu s metabolickou aktiváciou. Každá pozitívna kontrola sa má použiť pri jednej alebo viacerých koncentráciách, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast voči pozadiu s cieľom preukázať citlivosť testovacieho systému, pričom reakciu by nemalo narušiť prekročenie limitov cytotoxicity, ktoré sú stanovené pre túto testovaciu metódu (pozri odsek 28).

Tabuľka 1

Referenčné látky odporúčané na posúdenie spôsobilosti laboratória a na výber pozitívnych kontrol

Kategória	Látka	Registračné číslo CAS
1. Mutagénne látky aktívne bez metabolickej aktivácie		
	metyl-metánsulfonát	66-27-3
	mitomycín C	50-07-7
	4-nitrochinolín-N-oxid	56-57-5
2. Mutagénne látky vyžadujúce metabolickú aktiváciu		
	benzo[a]pyrén	50-32-8
	cyklofosfamid (monohydrát)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetylbenzantracén	57-97-6
	3-metylcholantrén	56-49-5

POSTUP

Ošetrenie testovanou chemikáliou

33. Proliferujúce bunky sa ošetria testovanou chemikáliou za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie. Expozícia trvá primeraný čas (primeraný čas je zvyčajne 3 až 4 hodiny). Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (59). Pokiaľ ide o skúšku MLA, v prípadoch, keď krátkodobé ošetrenie vykazuje negatívne výsledky a informácie naznačujú potrebu dlhšieho ošetrenia [napr. analógy nukleozidu, slabo rozpustné chemikálie (5) (59)], je potrebné zvážiť vykonanie testu s dlhším časom ošetrenia, t. j. 24 hodín bez S9.

34. Minimálny počet buniek použitých v každej z testovacích kultúr (kontrolnej aj ošetrenej) v každom štádiu testu je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným usmernením je ošetriť a subkultivovať dostatočný počet buniek v každej pokusnej kultúre na to, aby sa vo všetkých fázach testu (ošetrovanie, fenotypový prejav a mutantná selekcia) zachovalo najmenej 10, no ideálne 100 spontánnych mutantov (56).

35. V prípade skúšky MLA je odporúčaná prijateľná frekvencia spontánnych mutácií v rozsahu $35 - 140 \times 10^{-6}$ (pri verzii s využitím agaru) a $50 - 170 \times 10^{-6}$ (pri verzii s mikrotitračnou metódou) (pozri tabuľku 2). Na to, aby sa zabezpečilo prežitie najmenej 10 a ideálne 100 spontánnych mutantov po ošetrení v každej testovacej kultúre, je potrebné ošetriť najmenej 6×10^6 buniek. Ošetrením takéhoto počtu buniek a zachovaním dostatočného počtu buniek počas expresie a klonovania na účely mutantnej selekcie sa zabezpečí dostatočný počet spontánnych mutantov (najmenej 10) počas všetkých fáz pokusu, a to aj pri kultúrach ošetrených pomocou koncentrácií, ktoré spôsobujú 90 % cytotoxicitu (pri meraní podľa hodnoty RTG na úrovni 10 %) (19) (38) (39).

36. V prípade testu TK6 je frekvencia spontánnych mutácií vo všeobecnosti v rozsahu 2 až 10×10^{-6}. Na to, aby sa zabezpečilo prežitie najmenej 10 spontánnych mutantov po ošetrení v každej kultúre, je potrebné ošetriť najmenej 20×10^6 buniek. Ošetrením takéhoto počtu buniek sa zabezpečí dostatočný počet spontánnych mutantov (najmenej 10) aj pri kultúrach ošetrených pomocou koncentrácií, ktoré pri ošetrení spôsobujú 90 % cytotoxicitu (RS na úrovni 10 %). Okrem toho sa počas doby expresie musí kultivovať a naočkovať na účely mutantnej selekcie dostatočný počet buniek (60).

Čas do prejavenia fenotypu a meranie cytotoxicity a frekvencie mutácií

37. Na konci obdobia ošetrovania sa bunky počas stanoveného času kultivujú, aby sa umožnil takmer optimálny fenotypový prejav novoindukovaných mutantov, a to špecificky pre každú bunkovú líniu. V prípade MLA je čas do prejavenia fenotypu 2 dni. V prípade TK6 je čas do prejavenia fenotypu 3 – 4 dni. Ak sa používa 24-hodinové ošetrovanie, čas do prejavenia fenotypu sa začína po skončení ošetrovania.

38. Počas času do prejavenia fenotypu sa každodenne určuje počet buniek. V prípade MLA slúžia denné počty buniek na výpočet denného nárastu počtu buniek v suspenzii (SG). Po uplynutí dvojdňovej doby expresie sa bunky umiestnia do média so selektívnym činidlom aj bez selektívneho činidla na určenie počtov mutantov (platničky na účely selekcie), resp. klonovacej účinnosti (platničky na účely životaschopnosti). V prípade MLA existujú dve rovnako prijateľné metódy na klonovanie na účely mutantnej selekcie, pričom pri jednej sa využíva slabý agar a pri druhej kvapalné médium v 96-jamkových platničkách (19) (38) (39). V prípade TK6 sa pri klonovaní používajú kvapalné médiá a 96-jamkové platničky (16).

39. Jediným odporúčaným selektívnym činidlom pre mutanty *TK* je trifluorotymidín (TFT) (61).

40. V prípade MLA sa Petriho misky s agarom a mikrotitračné platničky spočítajú po 10 – 12 dňoch inkubácie. V prípade TK6 sa pri kolóniách v mikrotitračných platničkách po 10 – 14 dňoch vyhodnotí výskyt skoro vznikajúcich mutantov. S cieľom zahrnúť pomaly rastúce (neskoro vznikajúce) mutanty TK6 je potrebné po spočítaní skoro vznikajúcich mutantov bunkám doplniť rastové médium a TFT a platničky inkubovať počas ďalších 7 – 10 dní (62). Diskusia k stanoveniu počtu pomaly a normálne rastúcich mutantov *TK* sa nachádza v odsekoch 42 a 44.

41. Vhodné výpočty pre oba testy zahŕňajúce obe metódy (s využitím agaru a mikrotitračných platničiek) pre MLA sú uvedené v dodatku 2. Pri metóde MLA s využitím agaru sa kolónie spočítajú a počet mutantných kolónií sa na účely výpočtu frekvencie mutácií upraví na základe klonovacej účinnosti. Pri verzii MLA a TK6 s mikrotitračnými platničkami sa klonovacia účinnosť v platničkách na účely selekcie aj v platničkách na účely klonovacej účinnosti určí podľa Poissonovho rozdelenia (63). Z týchto dvoch klonovacích účinností sa vypočíta frekvencia mutácií.

Charakterizovanie mutantnej kolónie

42. Ak je testovaná chemikália v prípade MLA pozitívna (pozri odseky 62 – 63), charakterizovanie kolónie na základe merania veľkosti alebo rastu kolónie sa uskutoční minimálne na jednej testovacej kultúre (vo všeobecnosti najvyššia prijateľná pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolách. Ak je testovaná chemikália negatívna (pozri odsek 64), charakterizovanie mutantnej kolónie sa uskutoční na negatívnych a pozitívnych kontrolách. Pri metóde MLA s mikrotitračnými platničkami je vymedzené, že mutanty s malými kolóniami sú také, ktoré pokrývajú menej ako 25 % priemeru jamky, a mutanty s veľkými kolóniami sú také, ktoré pokrývajú viac ako 25 % priemeru jamky. Pri metóde s využitím agaru sa na stanovenie počtu kolónií a meranie veľkosti kolónií používa automatické počítadlo kolónií. Prístupy k meraniu veľkosti kolónií sú podrobne opísané v literatúre (19) (38) (40). Charakterizovanie kolónií na základe negatívnych a pozitívnych kontrol je potrebné na preukázanie správneho uskutočnenia štúdií.

43. Nie je možné stanoviť, že testovaná chemikália je negatívna, ak sa v pozitívnej kontrole správne nedetegujú mutanty s veľkými aj malými kolóniami. Na základe charakterizovania kolónie možno získať všeobecné informácie o schopnosti testovanej chemikálie spôsobiť bodové mutácie a/alebo chromozómové udalosti (odsek 4).

44. TK6: Normálne rastúce a pomaly rastúce mutanty sa diferencujú na základe rozdielu v inkubačnom čase (pozri odsek 40). V prípade TK6 sa vo všeobecnosti hodnotia skoro aj neskoro vznikajúce mutanty pri všetkých kultúrach vrátane negatívnych a pozitívnych kontrol. Charakterizovanie kolónií negatívnych a pozitívnych kontrol je potrebné na preukázanie správneho uskutočnenia štúdií. Nie je možné stanoviť, že testovaná chemikália je negatívna, ak sa v pozitívnej kontrole správne nedetegujú skoro aj neskoro vznikajúce mutanty. Na základe charakterizovania kolónie možno získať všeobecné informácie o schopnosti testovanej chemikálie spôsobiť bodové mutácie a/alebo chromozómové udalosti (odsek 4).

Spôsobilosť laboratória

45. Na to, aby sa pred vykonaním rutinného testu preukázalo, či má laboratórium s daným testom dostatočné skúsenosti, malo by mať vykonanú sériu pokusov s referenčnými pozitívnymi látkami pôsobiacimi prostredníctvom rôznych mechanizmov (aspoň jedna látka aktívna s metabolickou aktiváciou a jedna látka aktívna bez metabolickej aktivácie, vybraté z látok uvedených v tabuľke 1) a s rôznymi negatívnymi kontrolami (vrátane neošetrených kultúr a rôznych rozpúšťadiel/nosičov). Reakcie týchto pozitívnych a negatívnych kontrol by mali byť v súlade s príslušnou literatúrou. Táto požiadavka sa nevzťahuje na laboratóriá, ktoré majú skúsenosti, t. j. majú dostupnú historickú databázu, ako sa vymedzuje v odsekoch 47 – 50. V prípade MLA majú byť hodnoty získané pre pozitívne aj negatívne kontroly v súlade s odporúčaniami IWGT (pozri tabuľku 2).

46. Mal by sa preskúmať výber látok na pozitívnu kontrolu (pozri tabuľku 1) s krátkym a dlhým ošetrovaním (ak sa používajú dlhé ošetrovania) za neprítomnosti metabolickej aktivácie, ako aj s krátkym ošetrovaním za prítomnosti metabolickej aktivácie, aby sa preukázala spôsobilosť zistiť mutagénne chemikálie, stanovila sa účinnosť systému metabolickej aktivácie a preukázala sa vhodnosť podmienok pre rast buniek počas ošetrovania, fenotypového prejavu a mutatnej selekcie, ako aj vhodnosť postupov hodnotenia. Rozsah koncentrácií vybraných látok by sa mal zvoliť tak, aby poskytol opakovateľné nárasty súvisiace s jednotlivými koncentráciami v porovnaní s úrovňou pozadia, aby sa tak preukázala citlivosť a dynamické rozpätie testovacieho systému.

Údaje o historických kontrolách

47. Laboratórium by malo určiť:

— rozsah a distribúciu historických pozitívnych kontrol,

— rozsah a distribúciu historických negatívnych kontrol (neošetrených, s rozpúšťadlom).

48. Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s distribúciou historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi o negatívnych kontrolách. S pridávaním ďalších experimentálnych údajov k distribúcii kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tejto distribúcie (64) (65).

49. Historickú databázu negatívnych kontrol laboratória by na začiatku malo tvoriť minimálne 10 pokusov, ale podľa možnosti by mala pozostávať aspoň z 20 pokusov vykonaných za porovnateľných pokusných podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (65)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov týkajúcich sa pozitívnych a negatívnych kontrol a preukázať, že metodika v danom laboratóriu je „pod kontrolou“ (66). Ďalšie podrobnosti a odporúčania k vytváraniu a využívaniu historických údajov možno nájsť v literatúre (64).

50. Údaje o negatívnych kontrolách majú obsahovať frekvencie mutácií z jednej alebo prednostne z paralelných kultúr podľa opisu v odseku 27. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí distribúcie databázy historických negatívnych kontrol laboratória. V prípade, že údaje o negatívnych kontrolách nie sú v rámci 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do distribúcie historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne mimo uvedených medzí a pokiaľ existujú dôkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri odsek 49), a dôkazy o tom, že nedošlo k technickému alebo ľudskému zlyhaniu.

51. Všetky zmeny v experimentálnom protokole by sa mali posúdiť z hľadiska konzistentnosti údajov s databázami existujúcich historických kontrol v laboratóriu. Každý výrazný nesúlad by mal viesť k vytvoreniu novej databázy historických kontrol.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Prezentovanie výsledkov

52. Súčasťou prezentovania výsledkov skúšky MLA aj testu TK6 v prípade ošetrených aj kontrolných kultúr sú údaje potrebné na výpočet cytotoxicity (RTG, resp. RS) a frekvencií mutácií, ako sa uvádza ďalej.

53. V prípade MLA sa v rámci údajov o jednotlivých kultúrach uvádza RSG, RTG, klonovacia účinnosť v čase mutantnej selekcie a počet mutantných kolónií (pri verzii s využitím agaru) alebo počet prázdnych jamiek (pri verzii s mikrotitračnou metódou). Frekvencia mutácií sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na milión živých buniek. V prípade pozitívnej reakcie sa uvádzajú frekvencie mutácií pri malých a veľkých kolóniách (a/alebo percentuálny podiel celkovej frekvencie mutácií) najmenej pri jednej koncentrácii testovanej chemikálie (vo všeobecnosti najvyššia pozitívna koncentrácia) a pri negatívnych a pozitívnych kontrolách. V prípade negatívnej reakcie sa uvádza frekvencia mutácií pri malých a veľkých kolóniách v rámci negatívnej kontroly a pozitívnej kontroly.

54. V prípade TK6 sa v rámci údajov o jednotlivých kultúrach uvádza RS, klonovacia účinnosť v čase mutantnej selekcie a počet prázdnych jamiek pri skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantoch. Frekvencia mutácií sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na počet živých buniek a zahŕňa celkovú frekvenciu mutácií, ako aj frekvenciu mutácií (a/alebo percentuálny podiel celkovej frekvencie mutácií) skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantov.

Kritériá prijateľnosti

55. V prípade skúšky MLA aj testu TK6 musia byť pred určením celkových výsledkov pre konkrétnu testovanú chemikáliu splnené tieto kritériá:

— Testovali sa dve pokusné podmienky (krátke ošetrenie s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie – pozri odsek 33), pokiaľ jedna z nich neviedla k pozitívnym výsledkom.

— Analyzovateľný má byť primeraný počet buniek a koncentrácií (pozri odseky 27, 34-36).

— Kritériá výberu najvyššej koncentrácie sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 28 – 30.

Kritériá prijateľnosti pre negatívne a pozitívne kontroly

56. Medzinárodný konsenzus týkajúci sa konkrétnych kritérií prijateľnosti pre skúšku MLA je výsledkom analýzy veľkého rozsahu údajov o skúške MLA, ktorú uskutočnila Expertná pracovná skupina pre MLA organizácie IWGT (1) (2) (3) (4) (5). Táto testovacia metóda preto poskytuje konkrétne odporúčania na stanovenie prijateľnosti negatívnych a pozitívnych kontrol a na hodnotenie výsledkov pre jednotlivé látky pri skúške MLA. Databáza pre test TK6 má omnoho menší rozsah a nebola predmetom hodnotenia zo strany pracovnej skupiny.

57. V prípade MLA sa má pri každom pokuse hodnotiť, či neošetrená kontrola/kontrola s aplikáciou rozpúšťadla vyhovuje kritériám prijateľnosti pracovnej skupiny pre MLA organizácie IWGT [(4) a tabuľka 2 ďalej]), pokiaľ ide o: 1. frekvenciu mutácií (pričom frekvencie mutácií prijateľné podľa organizácie IWGT sa líšia pri verzii MLA s využitím agaru a pri verzii s mikrotitračnou metódou); 2. klonovaciu účinnosť (CE) v čase mutantnej selekcie a 3. nárast počtu buniek v suspenzii (SG) pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla (pozri vzorce v dodatku 2).

Tabuľka 2

Kritériá prijateľnosti pre MLA

Parameter	Metóda s využitím slabého agaru	Mikrotitračná metóda
Frekvencia mutácií	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Klonovacia účinnosť	65 – 120 %	65 – 120 %
Nárast počtu buniek v suspenzii	8 – 32-násobný (ošetrovanie 3 – 4 hodiny) 32 – 180-násobný (ošetrovanie 24 hodín, pokiaľ sa uskutočňuje)	8 – 32-násobný (ošetrovanie 3 – 4 hodiny) 32 – 180-násobný (ošetrovanie 24 hodín, pokiaľ sa uskutočňuje)

58. V prípade MLA sa každý test má vyhodnotiť aj z hľadiska toho, či pozitívne kontroly spĺňajú aspoň jedno z týchto dvoch kritérií prijateľnosti, ktoré navrhla pracovná skupina organizácie IWGT:

— Danou pozitívnou kontrolou sa má preukázať absolútny nárast celkovej frekvencie mutácií, t. j. nárast nad frekvenciu spontánnych mutácií na pozadí [frekvencia vyvolaných mutácií (IMF)] najmenej o 300×10^{-6}. Najmenej 40 % hodnoty IMF má predstavovať frekvenciu mutácií pri malých kolóniách.

— Pri pozitívnej kontrole dochádza k nárastu frekvencie mutácií pri malých kolóniách najmenej o 150×10^{-6} oproti hodnote v súbežnej neošetrenej kontrole/kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (hodnota IMF pri malých kolóniách na úrovni 150×10^{-6}).

59. V prípade TK6 bude test prijateľný, ak sa súbežná negatívna kontrola považuje za prijateľnú na doplnenie do databázy historických negatívnych kontrol laboratória, ako je opísané v odsekoch 48 – 49. Súbežné pozitívne kontroly (pozri odsek 32) by okrem toho mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v databáze historických pozitívnych kontrol, a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou.

60. Pri oboch testoch má byť horný limit cytotoxicity zaznamenaný pri kultúre s pozitívnou kontrolou rovnaký ako pri pokusných kultúrach. Znamená to, že hodnoty RTG/RS nemajú byť nižšie ako 10 %. Na preukázanie splnenia kritérií prijateľnosti pre pozitívnu kontrolu je postačujúce použiť jednu koncentráciu (alebo jednu z koncentrácií kultúr pozitívnych kontrol, ak sa použila viac než jedna koncentrácia). Okrem toho musí byť frekvencia mutácií pozitívnej kontroly v prijateľnom rozsahu stanovenom pre laboratórium.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

61. V prípade skúšky MLA vykonala Expertná pracovná skupina organizácie IWGT pre oblasť myšacieho lymfómu významné práce, pokiaľ ide o biologickú relevantnosť a kritériá pozitívnej reakcie (4). Táto testovacia metóda preto poskytuje konkrétne odporúčania na interpretáciu výsledkov zo skúšky MLA v súvislosti s testovanou chemikáliou (pozri odseky 62 – 64). Databáza pre test TK6 má omnoho menší rozsah a nebola predmetom hodnotenia zo strany pracovnej skupiny. Uvedené odporúčania na interpretáciu údajov pre test TK6 sú preto všeobecnejšie (pozri odseky 65 – 66). Na oba testy sa vzťahujú dodatočné odporúčania (pozri odseky 67 – 71).

MLA

62. Odporúča sa prístup na vymedzenie pozitívnych a negatívnych reakcií, aby bolo možné uistiť sa, že zvýšená frekvencia mutácií je biologicky relevantná. Namiesto štatistickej analýzy, ktorá sa vo všeobecnosti používa pri iných testoch, je tento prístup založený na použití vopred stanovenej frekvencie vyvolaných mutácií (t. j. nárast frekvencie mutácií nad úroveň súbežnej kontroly), ktorá sa označuje ako globálny hodnotiaci faktor (GEF) a vychádza z distribúcie údajov negatívnych kontrol v súvislosti s frekvenciou mutácií zo zúčastnených laboratórií (4). V prípade verzie MLA s využitím agaru je faktor GEF 90×10^{-6} a v prípade verzie MLA s mikrotitračnou metódou je faktor GEF 126×10^{-6}.

63. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak pri ktorejkoľvek z preskúmaných pokusných podmienok (pozri odsek 33) nárast frekvencie mutácií oproti súbežnej hodnote pozadia prekračuje faktor GEF a tento nárast má súvislosť s koncentráciou (napr. na základe testovania trendov). Testovaná chemikália sa vtedy považuje za schopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme.

64. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jednoznačne negatívnu, ak sa pri ktorejkoľvek z preskúmaných pokusných podmienok (pozri odsek 33) nezaznamená reakcia súvisiaca s koncentráciou alebo nedôjde k prekročeniu faktora GEF v prípade nárastu frekvencie mutácií. Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme.

TK6

65. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jasne pozitívnu, ak pre ktorúkoľvek z preskúmaných pokusných podmienok platí, že (pozri odsek 33):

— aspoň jedna z testovaných koncentrácií vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— ide o nárast, pri ktorom sa pri hodnotení vhodným testovaním trendov potvrdí súvislosť s koncentráciou (pozri odsek 33),

— niektorý z týchto výsledkov je mimo distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 48).

Ak sú splnené všetky tieto kritériá, testovaná chemikália sa považuje za schopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (66) (67).

66. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jasne negatívnu, ak pri všetkých preskúmaných pokusných podmienkach (pozri odsek 33) platí, že:

— ani jedna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— hodnotenie pomocou vhodného testovania trendov ukáže, že nedochádza k nárastu v závislosti od koncentrácie,

— všetky výsledky sa vyskytujú v rámci distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. v rámci 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 48).

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme.

Pre MLA aj TK6:

67. Ak maximálna koncentrácia vychádza z cytotoxicity, cieľová najvyššia koncentrácia by mala mať hodnotu RTG/RS v rozsahu 20 až 10 %. Existuje zhoda, že pri interpretácii pozitívnych výsledkov, ktoré sa zistili len v rozsahu 20 až 10 % RTG/RS, je potrebné postupovať obozretne a výsledok sa nebude považovať za pozitívny, ak k nárastu frekvencie mutácií došlo len na úrovni 10 % RTG/RS alebo pod ňou (ak sa vyhodnocovala) (2) (59).

68. Existujú určité okolnosti, pri ktorých môžu doplňujúce informácie pomôcť pri stanovení, že testovaná chemikália nie je mutagénna, keď neexistuje žiadna kultúra, ktorá by vykazovala hodnotu RTG v rozsahu 10 až 20 % RTG/RS. Tieto situácie sú vymedzené takto: 1) Neexistuje dôkaz o mutagenite (napr. žiadna závislosť účinku od dávky, žiadne frekvencie mutácií nad úrovňou zaznamenanou v súbežnej negatívnej kontrole alebo historických rozsahoch pozadia atď.) v sérii údajových bodov v rozsahu 100 % až 20 % RTG/RS, pričom existuje aspoň jeden údajový bod v rozsahu 20 až 25 % RTG/RS. 2) Neexistuje dôkaz o mutagenite (napr. žiadna závislosť účinku od dávky, žiadne frekvencie mutácií nad úrovňou zaznamenanou v súbežnej negatívnej kontrole alebo historických rozsahoch pozadia atď.) v sérii údajových bodov v rozsahu 100 % až 25 % RTG/RS, pričom existuje aj negatívny údajový bod mierne pod úrovňou 10 % RTG/RS. V oboch týchto situáciách možno dôjsť k záveru, že testovaná chemikália je negatívna.

69. Neexistuje požiadavka na potvrdenie jednoznačne pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

70. V prípade, že reakcia nie je jednoznačne negatívna ani jednoznačne pozitívna podľa uvedeného opisu, a/alebo v prípade, že ide o pomoc pri stanovovaní biologickej relevantnosti výsledku, by sa údaje mali odborne posúdiť a/alebo podrobiť ďalšiemu skúmaniu. Prípadne by mohlo byť užitočné uskutočnenie opakovaného pokusu pomocou zmenených pokusných podmienok [napr. odstup medzi koncentráciami, aby sa zvýšila pravdepodobnosť získania údajových bodov v rozsahu 10 – 20 % RTG/RS, použitie iných podmienok metabolickej aktivácie (t. j. koncentrácia S9 alebo pôvod S9) a trvanie ošetrovania].

71. V zriedkavých prípadoch neumožní súbor údajov ani po ďalšom skúmaní vyvodiť záver o pozitívnom alebo negatívnom výsledku. Reakcia na testovanú chemikáliu sa preto uzavrie ako nejednoznačná (interpretovaná ako s rovnakou pravdepodobnosťou pozitívna alebo negatívna).

SPRÁVA O TESTE

72. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— percentuálny podiel rozpúšťadla v konečnom kultivačnom médiu.

Bunky:

Pre hlavné laboratórne kultúry:

— typ a zdroj buniek, ako aj história v skúšobnom laboratóriu,

— vlastnosti karyotypu a/alebo modálny počet chromozómov,

— metódy udržiavania bunkových kultúr,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— časy zdvojenia buniek.

Podmienky testovania:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu bunkových kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzení rozpustnosti,

— skladba média, koncentrácia CO_2, úroveň vlhkosti,

— koncentrácia testovanej chemikálie vyjadrená ako konečná koncentrácia v kultivačnom médiu (napr. µg alebo mg/ml alebo mM kultivačného média),

— koncentrácia (a/alebo objem) rozpúšťadla a testovanej chemikálie pridaných do kultivačného média,

— inkubačná teplota,

— inkubačný čas,

— trvanie ošetrenia,

— hustota buniek počas ošetrenia,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie (zdroj S9, metóda prípravy zmesi S9, koncentrácia alebo objem zmesi S9 a S9 v konečnom kultivačnom médiu, kontroly kvality S9),

— látky na pozitívnu a negatívnu kontrolu, konečné koncentrácie pre každú z podmienok ošetrenia,

— dĺžka doby expresie (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),

— identita selektívneho činidla a jeho koncentrácia,

— v prípade MLA sa uvádza použitá verzia (agar alebo mikrotitračná metóda),

— kritériá prijateľnosti testov,

— metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,

— metódy použité na meranie cytotoxicity,

— akékoľvek doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity a použitej metódy,

— dĺžka inkubačného času po očkovaní,

— vymedzenie kolónií, ktorých veľkosť a typ sa hodnotí (vrátane kritérií na rozlíšenie „malých“ a „veľkých“ kolónií, ak je to vhodné),

— kritériá na považovanie štúdií za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné,

— metódy použité na určenie pH, osmolality (ak sa stanovuje) a zrážania (ak je to relevantné).

Výsledky:

— počet ošetrených buniek a počet subkultivovaných buniek pre jednotlivé kultúry,

— parametre toxicity (RTG v prípade MLA a RS v prípade TK6),

— známky zrážania a čas ich stanovenia,

— počet buniek naočkovaných v selektívnom a neselektívnom médiu,

— počet kolónií v neselektívnom médiu a počet rezistentných kolónií v selektívnom médiu a súvisiace frekvencie mutácií,

— meranie veľkosti kolónií v negatívnych a pozitívnych kontrolách a, ak je testovaná chemikália pozitívna, aspoň pri jednej koncentrácii a súvisiace frekvencie mutácií,

— vzťah medzi koncentráciou a reakciou, ak ho možno určiť,

— údaje o súbežných negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá) obsahujúce rozsahy, stredné hodnoty a štandardné odchýlky; počet testov, z ktorých vyplývajú historické údaje,

— štatistické analýzy (pre jednotlivé kultúry a spojené paralelné kultúry v odôvodnených prípadoch) a hodnoty p, ak existujú; v prípade MLA vyhodnotenie faktora GEF.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

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

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

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

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1 – 2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

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

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

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

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

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

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, s. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. K dispozícii na adrese: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Aneugén: akákoľvek chemikália alebo proces, ktorý pri interakcii so zložkami mitotického alebo meiotického bunkového cyklu vedie k aneuploidii v bunkách alebo organizmoch.

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme celého(-ých) súboru(-ov) chromozómov (polyploidia).

Substitučné mutagény bázového páru: chemikálie, ktoré spôsobujú substitúciu bázových párov v DNA.

Chemikália: látka alebo zmes.

Klonovacia účinnosť: percentuálny podiel buniek naočkovaných s nízkou hustotou, ktoré sú rastom schopné vytvoriť kolóniu, ktorú možno spočítať.

Klastogén: akákoľvek chemikália alebo proces, ktorý spôsobuje štrukturálne chromozómové aberácie v populáciách buniek alebo organizmoch.

Cytotoxicita: v prípade skúšok v rámci tejto testovacej metódy znamená cytotoxicita pokles relatívneho nárastu celkového počtu buniek (RTG) pri skúške MLA, resp. relatívneho prežitia (RS) pri teste TK6.

Priama mutácia: génová mutácia z rodičovského typu na mutantnú formu, ktorá spôsobuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity alebo funkcie kódovaného proteínu.

Konštrukčné mutagény: chemikálie, ktoré v molekule DNA spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých bázových párov.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov DNA, aduktov, zmien usporiadania, mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Mitotická rekombinácia: rekombinácia medzi homológnymi chromatídami počas mitózy, ktorá môže potenciálne indukovať zlom dvojvláknového reťazca DNA alebo viesť k strate heterozygozity.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Frekvencia mutácií (MF): podiel počtu pozorovaných mutantných buniek a počtu životaschopných buniek.

Čas do prejavenia fenotypu: čas po ošetrení, počas ktorého prebieha genetická zmena v rámci genómu a existujúce génové produkty sa vyčerpajú až do bodu, keď dôjde k zmene fenotypovej charakteristiky.

Relatívne prežitie (RS): na základe relatívneho prežitia sa meria cytotoxicita súvisiaca s ošetrením pri teste TK6. Predstavuje relatívnu klonovaciu účinnosť (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s klonovacou účinnosťou negatívnej kontroly.

Relatívny nárast počtu buniek v suspenzii (RSG): v prípade skúšky MLA je to relatívny celkový dvojdňový nárast počtu buniek v suspenzii pri testovacej kultúre v porovnaní s celkovým dvojdňovým nárastom počtu buniek v suspenzii pri negatívnej kontrole/kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (Clive and Spector, 1975). RSG zahŕňa relatívny rast testovacej kultúry v porovnaní s negatívnou kontrolou/kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla počas obdobia ošetrenia.

Relatívny nárast celkového počtu buniek (RTG): na základe relatívneho nárastu celkového počtu buniek sa meria cytotoxicita súvisiaca s ošetrením pri skúške MLA. Slúži na meranie relatívneho (vzhľadom na kontrolu s nosičom) rastu testovacích kultúr počas fáz klonovania, ošetrenia, dvojdňovej expresie a mutantnej selekcie v rámci testu. RSG jednotlivých bunkových kultúr sa vynásobí relatívnou klonovacou účinnosťou testovacej kultúry v čase mutantnej selekcie a vyjadrí sa vzhľadom na klonovaciu účinnosť negatívnej kontroly/kontroly s aplikáciou rozpúšťadla (Clive and Spector, 1975).

Frakcie pečene S9: supernatant pečeňového homogenátu po odstredení pri 9 000 g, t. j. surový pečeňový extrakt.

Zmes S9: zmes frakcie pečene S9 a kofaktorov potrebných pre aktivitu metabolických enzýmov.

Nárast počtu buniek v suspenzii (SG): násobné zvýšenie počtu buniek v priebehu fázy ošetrenia a expresie v rámci skúšky MLA. SG sa vypočíta ako súčin násobného zvýšenia na 1. deň a násobného zvýšenia na 2. deň pri krátkom ošetrení (3 alebo 4 hodiny). Ak sa používa 24-hodinové ošetrenie, SG predstavuje súčin násobného zvýšenia počas 24-hodinového ošetrenia a násobných zvýšení na 1. a 2. deň expresie.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla: všeobecný termín na vymedzenie kontrolných kultúr, ku ktorým sa pridáva len rozpúšťadlo používané na rozpúšťanie testovanej chemikálie.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Neošetrené kontroly: kultúry, ktoré sa neošetrujú (t. j. testovanou chemikáliou ani rozpúšťadlom), ale sa spracovávajú rovnakým spôsobom ako kultúry, ku ktorým sa pridáva testovaná chemikália.

Dodatok 2

VZORCE

Cytotoxicita

Pre obe verzie MLA (s využitím agaru aj mikrotitračnej metódy)

Cytotoxicita sa vymedzuje ako relatívny nárast celkového počtu buniek (RTG), ktorý zahŕňa relatívny nárast počtu buniek v suspenzii (RSG) počas dvojdňovej doby expresie a relatívnu klonovaciu účinnosť (RCE) zistenú v čase mutantnej selekcie. Hodnoty RTG, RSG a RCE sú vyjadrené v percentách.

Výpočet RSG: Prvý nárast počtu buniek v suspenzii (SG_1) predstavuje nárast medzi 0. a 1. dňom (koncentrácia buniek na 1. deň/koncentrácia buniek na 0. deň) a druhý nárast počtu buniek v suspenzii (SG_2) predstavuje nárast medzi 1. a 2. dňom (koncentrácia buniek na 2. deň/koncentrácia buniek na 1. deň). RSG predstavuje celkový nárast počtu buniek v suspenzii ($SG_1 \times SG_2$) pri ošetrenej kultúre v porovnaní s neošetrenou kontrolou/kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla. To znamená: RSG = $[SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$ SG_1 sa vypočíta z počiatočnej koncentrácie buniek, ktorá sa použila na začiatku ošetrenia buniek. Týmto sa zohľadňuje akákoľvek diferenciálna cytotoxicita, ktorá sa počas ošetrenia buniek vyskytne v bunkových kultúrach.

RCE je relatívna klonovacia účinnosť testovacej kultúry v porovnaní s relatívnou klonovacou účinnosťou neošetrenej kontroly/kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ktorá sa zistila v čase mutantnej selekcie.

Relatívny nárast celkového počtu buniek (RTG): RTG = RSG × RCE

TK6

Relatívne prežitie (RS):

Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia, t. j. klonovacej účinnosti (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %). Zohľadnenie strát buniek počas ošetrenia možno vypočítať takto:

$$\text{Upravená CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{počet buniek na konci ošetrenia}}{\textit{počet buniek na začiatku ošetrenia}}$$

Relatívne prežitie (RS) pre kultúru ošetrenú pomocou testovanej chemikálie sa vypočíta takto:

$$RS = \frac{\textit{upravená CE vošetrenej kultúre}}{\textit{upravená CE vkontrole srozpúšťadlom}} \times 100$$

Frekvencia mutácií pre MLA aj TK6

Frekvencia mutácií (MF) predstavuje klonovaciu účinnosť mutantných kolónií v selektívnom médiu (CE_M) upravenú na základe klonovacej účinnosti v neselektívnom médiu v čase mutantnej selekcie (CE_V). To znamená: MF = CE_M/CE_V. Ďalej sa opisuje výpočet týchto dvoch klonovacích účinností pre metódy klonovania s využitím agaru a mikrotitračnej metódy.

Verzia skúšky MLA s využitím agaru: V prípade verzie MLA s využitím slabého agaru sa počet kolónií na miske mutantnej selekcie (C_M) a počet kolónií na miske bez selekcie alebo miske na určenie klonovacej účinnosti (počet životaschopných buniek) (C_V) zistia tak, že sa priamo spočítajú klony. Keď sa naočkuje 600 buniek na misky na určenie klonovacej účinnosti (CE) mutantnej selekcie (CE_M) a na misky bez selekcie alebo misky na určenie klonovacej účinnosti (počet životaschopných buniek) (CE_V) a keď sa použije 3×10^6 buniek na účely mutantnej selekcie, potom

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Verzia MLA a TK6 s mikrotitračnou metódou: V prípade verzie MLA s mikrotitračnou metódou sa hodnoty C_M a C_V určia ako súčin celkového počtu mikrotitračných jamiek (TW) a pravdepodobného počtu kolónií na jamku (P) na mikrotitračných platničkách.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Na základe Poissonovho rozdelenia v nulovom bode (Furth a kol., 1981) sa P určuje ako

$$P = - \ln (EW/TW)$$

keď EW predstavuje počet prázdnych jamiek a TW celkový počet jamiek. Preto:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

V prípade verzie MLA s mikrotitračnou metódou sa frekvencie mutácií malých a veľkých kolónií vypočítajú rovnakým spôsobom s využitím príslušného počtu prázdnych jamiek pre malé a veľké kolónie.

Pri teste TK6 sa frekvencie mutácií malých a veľkých kolónií stanovia na základe skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantov.

B.68 TESTOVACIA METÓDA KRÁTKODOBEJ EXPOZÍCIE IN VITRO NA IDENTIFIKÁCIU i) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A ii) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 491 (2017). Testovacia metóda krátkodobej expozície (Short Time Exposure – STE) je metóda *in vitro*, ktorú možno za určitých okolností a pri zohľadnení špecifických obmedzení použiť na klasifikáciu nebezpečnosti a označovanie chemikálií (látok a zmesí), ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí, ako aj tých, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce vážne poškodenie očí alebo podráždenie očí, ako sa to vymedzuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií Organizácie Spojených národov (GHS OSN) (1) a nariadení Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]).

2. Potenciál nebezpečnosti chemikálií pre oči sa počas mnohých rokov hodnotil hlavne pomocou očného testu *in vivo* na králikoch [testovacia metóda B.5 (8), rovnocenná s usmernením OECD TG 405]. Vo všeobecnosti sa uznáva, že v dohľadnej budúcnosti nedokáže žiaden jednotlivý alternatívny test *in vitro* úplne nahradiť očný test *in vivo* na králikoch na účely predikcie úplného rozsahu reakcií, ktoré sa prejavujú vážnym poškodením očí/podráždením očí, pre rôzne triedy chemikálií. Očný test na králikoch však možno dokážu plne nahradiť strategické kombinácie alternatívnych testovacích metód použitých v rámci (viacúrovňovej) testovacej stratégie (2). Prístup zhora nadol je určený na testovanie chemikálií, pri ktorých na základe existujúcich informácií možno očakávať, že majú vysoký potenciál dráždivosti alebo vyvolávajú vážne poškodenie očí. Naopak, prístup zdola nahor je určený na testovanie chemikálií, pri ktorých na základe existujúcich informácií možno očakávať, že nespôsobujú podráždenie očí v takej miere, aby sa pri nich vyžadovala príslušná klasifikácia. Hoci sa testovacia metóda STE nepovažuje za úplnú náhradu očného testu *in vivo* na králikoch, jej použitie je vhodné ako súčasť viacúrovňovej testovacej stratégie regulačnej klasifikácie a označovania, napríklad v rámci prístupu zhora nadol/zdola nahor, s cieľom bez ďalšieho testovania identifikovať i) chemikálie vyvolávajúce vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP) a ii) chemikálie (s výnimkou vysoko prchavých látok a všetkých tuhých chemikálií okrem povrchovo aktívnych látok), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP) (1) (2). No v prípade chemikálie, pri ktorej sa na základe testovacej metódy STE nepredpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP), ani to, že bude označená ako „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP (čo znamená, že nevyvoláva vážne poškodenie ani podráždenie očí), sa vyžaduje doplňujúce testovanie na určenie konečnej klasifikácie. Okrem toho je pred použitím testovacej metódy STE v rámci prístupu zdola nahor podľa iných klasifikačných schém než GHS OSN/CLP potrebné sa obrátiť na príslušné regulačné orgány. Výber najvhodnejšej testovacej metódy a jej použitie je potrebné posudzovať v kontexte usmerňovacieho dokumentu OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu v prípade vážneho poškodenia očí a podráždenia očí (14).

3. Účelom tejto testovacej metódy je opísať postupy používané na hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči, a to na základe jej schopnosti vyvolať cytotoxicitu v testovacej metóde krátkodobej expozície. Cytotoxický účinok chemikálií na bunky rohovkového epitelu predstavuje významný spôsob účinku (MOA), ktorý vedie k poškodeniu rohovkového epitelu a podráždeniu oka. Životaschopnosť buniek sa v rámci testovacej metódy STE posudzuje kvantitatívnym meraním modrej formazánovej soli po jej extrakcii z buniek, pričom túto soľ vytvárajú živé bunky enzymatickou konverziou vitálneho farbiva MTT [2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid)], ktoré sa označuje aj ako tiazolylová modrá tetrazólium-bromid (3). Zistená životaschopnosť buniek sa porovnáva s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla (relatívna životaschopnosť) a slúži na odhad potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči. Testovaná chemikália na základe klasifikácie patrí do kategórie 1 podľa GHS OSN/CLP, keď sa pri koncentráciách 5 % aj 0,05 % zistí životaschopnosť buniek, ktorá je nižšia ako alebo sa rovná (≤) 70 %. Naopak, pri testovanej chemikálii sa predpokladá, že podľa GHS OSN/CLP sa na ňu vzťahuje označenie „bez kategórie“, keď sa pri koncentráciách 5 % aj 0,05 % zistí životaschopnosť buniek vyššia ako (>) 70 %.

4. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje, a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy STE na testovanie látok a/alebo zmesí. Vymedzenie pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Táto testovacia metóda je založená na protokole, ktorý vytvorila spoločnosť Kao Corporation (4) a ktorý bol predmetom dvoch odlišných validačných štúdií: jednu uskutočnila organizácia JSAAE (Validation Committee of

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments) (5) a druhú organizácia JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) (6). Partnerské preskúmanie uskutočnili organizácie NICEATM/ICCVAM na základe správ o validačných štúdiách a podkladových kontrolných dokumentov k testovacej metóde (7).

6. Pri použití na identifikovanie chemikálií (látok a zmesí) vyvolávajúcich vážne poškodenie očí [kategória 1 podľa GHS OSN/CLP (1)] sa pri údajoch získaných pomocou testovacej metódy STE na 125 chemikáliách (vrátane látok aj zmesí) preukázala celková presnosť 83 % (104/125), miera falošnej pozitivity 1 % (1/86) a miera falošnej negativity 51 % (20/39) v porovnaní s očným testom *in vivo* na králikoch (7). V tomto kontexte nie je miera falošnej negativity kritická, keďže všetky testované chemikálie, pri ktorých je životaschopnosť buniek ≤ 70 % pri koncentrácii 5 % a > 70 % pri koncentrácii 0,05 %, by sa následne testovali pomocou iných riadne validovaných testovacích metód *in vitro* alebo, ako posledná možnosť, pomocou očného testu *in vivo* na králikoch v závislosti od regulatórnych požiadaviek a v súlade so stratégiou postupného testovania a s prístupmi založenými na analýze váhy dôkazov, ktoré sa v súčasnosti odporúčajú (1) (8). Testovali sa najmä jednozložkové látky, existuje však aj obmedzené množstvo údajov o testovaní zmesí. Táto testovacia metóda je napriek tomu technicky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa však malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. Pri použití testovacej metódy STE na identifikáciu testovaných chemikálií zodpovedajúcich kategórii 1 podľa GHS OSN/CLP sa neprejavili žiadne iné špecifické nedostatky. Skúšajúci môžu zvážiť použitie tejto testovacej metódy pri testovaných chemikáliách, pričom by sa životaschopnosť buniek ≤ 70 % pri koncentráciách 5 % aj 0,05 % mala považovať za prejav reakcie, ktorá vyvoláva vážne poškodenie očí, pri ktorej sa bez ďalšieho testovania vyžaduje klasifikácia podľa kategórie 1 GHS OSN/CLP.

7. Pri použití na identifikovanie chemikálií (látok a zmesí), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí (t. j. „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP), sa pri údajoch získaných pomocou testovacej metódy STE na 130 chemikáliách (vrátane látok aj zmesí) preukázala celková presnosť 85 % (110/130), miera falošnej negativity 12 % (9/73) a miera falošnej pozitivity 19 % (11/57) v porovnaní s očným testom *in vivo* na králikoch (7). Ak sa z množiny údajov vylúčia vysoko prchavé látky a tuhé látky okrem povrchovo aktívnych látok, dosiahne sa zlepšenie, pri ktorom je celková presnosť 90 % (92/102), miera falošnej negativity 2 % (1/54) a miera falošnej pozitivity 19 % (9/48) (7). V dôsledku toho medzi potenciálne nedostatky testovacej metódy STE pri použití na identifikovanie testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP), patrí vysoká miera falošnej negativity pri i) vysoko prchavých látkach s tlakom pár presahujúcim 6 kPa a ii) tuhých chemikáliách (látkach a zmesiach) okrem povrchovo aktívnych látok a zmesí zložených len z povrchovo aktívnych látok. Tieto látky sú vylúčené z oblasti použiteľnosti testovacej metódy STE (7).

8. Okrem chemikálií uvedených v odsekoch 6 a 7 obsahuje množina údajov vytvorená pomocou testovacej metódy STE aj vlastné údaje pre 40 zmesí, pri ktorých sa pri porovnaní s Draizovým očným testom *in vivo* preukázala presnosť 88 % (35/40), miera falošnej pozitivity 50 % (5/10) a miera falošnej negativity 0 % (0/30) pri predikcii zmesí, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu na základe systémov klasifikácie GHS OSN/CLP (9). Testovaciu metódu STE preto možno použiť pri prístupe zdola nahor na identifikovanie zmesí spĺňajúcich podmienky označenia „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP, s výnimkou tuhých zmesí okrem tých, ktoré sú zložené len z povrchovo aktívnych látok, čo predstavuje rozšírenie jej obmedzenia na tuhé látky. Okrem toho je potrebné postupovať obozretne pri hodnotení zmesí, ktoré obsahujú látky s tlakom pár vyšším ako 6 kPa, aby sa predišlo potenciálnemu podhodnoteniu predpokladu, a primeranosť ich testovania by mala byť individuálne preukázaná v jednotlivých prípadoch.

9. Testovaciu metódu STE nemožno použiť na identifikáciu testovaných chemikálií zodpovedajúcich kategórii 2 podľa GHS OSN/CLP, ani zodpovedajúcich kategórii 2A (podráždenie očí) alebo 2B (mierne podráždenie očí) podľa GHS OSN, a to vzhľadom na značný počet chemikálií zodpovedajúcich kategórii 1 podľa GHS OSN/CLP, ktoré boli na základe podhodnotených predpokladov zaradené do kategórie 2, 2A alebo 2B, ako aj chemikálií „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP, ktoré boli na základe nadhodnotených predpokladov zaradené do kategórie 2, 2A alebo 2B (7). Na tento účel sa môže vyžadovať ďalšie testovanie pomocou inej vhodnej metódy.

10. Testovacia metóda STE je vhodná pre testované chemikálie, ktoré možno rozpustiť alebo rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút vo fyziologickom roztoku, v 5 % dimetylsulfoxide (DMSO) vo fyziologickom roztoku alebo v minerálnom oleji. Testovacia metóda STE nie je vhodná pre testované chemikálie, ktoré sú nerozpustné alebo ktoré nemožno rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút vo fyziologickom roztoku, v 5 % DMSO vo fyziologickom roztoku alebo v minerálnom oleji. Vzhľadom na krátkodobú expozíciu možno pri testovacej metóde STE použiť minerálny olej. Testovacia metóda STE je vhodná na predikciu potenciálu nebezpečnosti pre oči v prípade testovaných chemikálií nerozpustných vo vode (napr. mastné alkoholy s dlhým reťazcom alebo ketóny) za predpokladu, že sú miešateľné aspoň s jedným z troch vyššie uvedených rozpúšťadiel (4).

11. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje ([1]), a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy STE na testovanie látok a/alebo zmesí.

PRINCÍP TESTU

12. Testovacia metóda STE je skúška *in vitro* založená na cytotoxicite, ktorá sa uskutočňuje na konfluentnej jednovrstvovej bunkovej kultúre buniek rohovky králikov inštitútu Statens Seruminstitut (SIRC), ktoré sa kultivujú na 96-jamkovej polykarbonátovej mikrotitračnej platničke (4). Po päťminútovej expozícii testovanej chemikálii sa cytotoxicita kvantitatívne meria ako relatívna životaschopnosť buniek SIRC pomocou skúšky MTT (4). Znížená životaschopnosť buniek slúži na predikciu potenciálnych nežiaducich účinkov, ktoré vedú k poškodeniu očí.

13. Uvádza sa, že 80 % roztoku, ktorý sa kvapne do oka králika, sa vylúči cez spojovkový vak do troch až štyroch minút, zatiaľ čo viac než 80 % roztoku, ktorý sa kvapne do ľudského oka, sa vylúči cez spojovkový vak do jednej až dvoch minút (10). Zámerom testovacej metódy STE je dosiahnuť aproximáciu týchto časov expozície a využiť cytotoxicitu ako sledovaný parameter na posúdenie rozsahu poškodenia buniek SIRC po päťminútovej expozícii testovanej chemikálii.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

14. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testovacej metódy STE, ktorá sa tu opisuje, preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne klasifikujú jedenásť látok odporúčaných v tabuľke 1. Tieto látky boli zvolené tak, aby reprezentovali úplný rozsah reakcií z hľadiska vážneho poškodenia očí alebo podráždenia očí na základe výsledkov očných testov *in vivo* na králikoch (TG 405) a systému klasifikácie GHS OSN/CLP (1). Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné, aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou a aby boli dostupné údaje *in vitro* s vysokou kvalitou z testovacej metódy STE (3). V situáciách, keď uvedená látka nie je k dispozícii, alebo v odôvodnených prípadoch možno použiť inú látku, pre ktorú sú dostupné primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro*, za predpokladu, že sa uplatňujú rovnaké kritériá, aké sú opísané na tomto mieste.

Tabuľka 1

Zoznam látok na preukázanie spôsobilosti

Látka	Registračné číslo CAS	Chemická trieda ([1])	Skupenstvo	Kategória GHS OSN/CLP v teste *in vivo* ([2])	Rozpúšťadlo v teste STE	Kategória GHS OSN/CLP v teste STE
benzalkónium-chlorid (10 %, vodný)	8001-54-5	óniová zlúčenina	kvapalné	kategória 1	fyziologický roztok	kategória 1

([1]) V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných testovacích metódach na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália“.

Látka	Registračné číslo CAS	Chemická trieda ([1])	Skupenstvo	Kategória GHS OSN/CLP v teste *in vivo* ([2])	Rozpúšťadlo v teste STE	Kategória GHS OSN/CLP v teste STE
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	éter	kvapalné	kategória 1	fyziologický roztok	kategória 1
kyslá červeň 92	18472-87-2	heterocyklická zlúčenina; brómová zlúčenina; chlórová zlúčenina	tuhé	kategória 1	fyziologický roztok	kategória 1
hydroxid sodný	1310-73-2	alkália; anorganická chemikália	tuhé	kategória 1 ([3])	fyziologický roztok	kategória 1
butyrolaktón	96-48-0	laktón; heterocyklická zlúčenina	kvapalné	kategória 2A (kategória 2 v CLP)	fyziologický roztok	predpoklad nie je možný
1-oktanol	111-87-5	alkohol	kvapalné	kategória 2A/B ([4]) (kategória 2 v CLP)	minerálny olej	predpoklad nie je možný
cyklopentanol	96-41-3	alkohol; uhľovodík, cyklický	kvapalné	kategória 2A/B ([5]) (kategória 2 v CLP)	fyziologický roztok	predpoklad nie je možný
(2-etoxyetyl)-acetát	111-15-9	alkohol; éter	kvapalné	bez kategórie	fyziologický roztok	bez kategórie
dodekán	112-40-3	uhľovodík, acyklický	kvapalné	bez kategórie	minerálny olej	bez kategórie
metylizobutylketón	108-10-1	ketón	kvapalné	bez kategórie	minerálny olej	bez kategórie

Látka	Registračné číslo CAS	Chemická trieda ([1])	Skupenstvo	Kategória GHS OSN/CLP v teste *in vivo* ([2])	Rozpúšťadlo v teste STE	Kategória GHS OSN/CLP v teste STE
1,1-dimetylguanidín sulfát	598-65-2	amidín; zlúčenina síry	tuhé	bez kategórie	fyziologický roztok	bez kategórie

([1]) Chemické triedy boli priradené na základe informácií získaných z predchádzajúcich publikácií organizácie NICEATM a v prípade, že neboli dostupné, na základe systému Medical Subject Headings inštitútu National Library of Medicine (MeSH®) [prostredníctvom služby ChemIDplus® (National Library of Medicine), k dispozícii na adrese http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/] a štruktúrnych stanovení uskutočnených organizáciou NICEATM.

([2]) Na základe výsledkov očného testu *in vivo* na králikoch (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN/CLP (1).

([3]) Klasifikácia v kategórii 1 je založená na potenciáli 100 % hydroxidu sodného spôsobiť poleptanie kože (hydroxid sodný sa uvádza ako chemikália na preukázanie spôsobilosti s potenciálom spôsobiť poleptanie kože v usmernení OECD TG 435) a na kritériu pre kategóriu 1 podľa GHS OSN/CLP (1).

([4]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN na rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 2 zo 6, resp. 4 zo 6 zvierat s účinkami na 7. deň ako podmienka na klasifikáciu v kategórii 2A. Množina údajov *in vivo* zahŕňala 2 štúdie, pričom v každej boli 3 zvieratá. V jednej štúdii sa na 7. deň pri dvoch z troch zvierat prejavil účinok, na základe čoho sa vyžaduje klasifikácia v kategórii 2A (11), zatiaľ čo v druhej štúdii sa všetky sledované parametre pri všetkých troch zvieratách do 7. dňa vrátili na nulovú hodnotu, na základe čoho sa vyžaduje klasifikácia v kategórii 2B (12).

([5]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN na rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 1 z 3, resp. 2 z 3 zvierat s účinkami na 7. deň ako podmienka na klasifikáciu v kategórii 2A. Do štúdie *in vivo* boli zahrnuté 3 zvieratá. Všetky sledované parametre, s výnimkou zákalu rohovky a začervenania spojoviek v prípade jedného zvieraťa, sa do 7. dňa alebo skôr vrátili na nulovú hodnotu. Toto jedno zviera, ktoré sa do 7. dňa v plnej miere nezotavilo, vykazovalo (na 7. deň) zákal rohovky s hodnotou 1 a začervenanie spojoviek s hodnotou 1, ktoré sa na 14. deň vrátili na pôvodnú hodnotu (11).

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

POSTUP

Príprava jednovrstvovej bunkovej kultúry

15. Na vykonanie testovacej metódy STE sa používa bunková línia rohovky králikov SIRC. Odporúča sa, aby sa bunky SIRC získali z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad CCL60 organizácie ATCC (American Type Culture Collection).

16. Bunky SIRC sa kultivujú pri teplote 37 °C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2 v kultivačnej banke, ktorá obsahuje kultivačné médium zložené z minimálneho základného média podľa Eagla (MEM) s pridaním 10 % bovinného fetálneho séra (FBS), 2 mM L-glutamínu, 50 – 100 jednotiek/ml penicilínu a 50 – 100 µg/ml streptomycínu. Bunky, pri ktorých v kultivačnej banke nastala konfluencia, sa oddelia pomocou roztoku trypsínu a kyseliny etyléndiamíntetraoctovej s použitím alebo bez použitia škrabky na bunky. Pred použitím na bežné testovanie sa bunky namnožia (napr. 2 až 3 pasáže) v kultivačnej banke, pričom od rozmrazenia nemá prebehnúť viac ako 25 pasáží.

17. Bunky, ktoré sú pripravené na použitie v teste STE, sa následne pripravia s príslušnou hustotou a nasadia sa do 96-jamkových mikrotitračných platničiek. Odporúčaná hustota buniek pri nasadení je $6{,}0 \times 10^3$ buniek na jamku, keď sa bunky použijú štyri dni po nasadení, alebo $3{,}0 \times 10^3$ buniek na jamku, keď sa bunky použijú päť dní po nasadení, pričom objem kultúr je 200 µl. Bunky používané na test STE, ktoré sa nasadia do kultivačného média s vhodnou hustotou, dosiahnu viac ako 80 % konfluenciu v čase testovania, t. j. štyri alebo päť dní po nasadení.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

18. Prvú voľbu pri výbere rozpúšťadla na rozpustenie alebo rozmiešanie testovaných chemikálií predstavuje fyziologický roztok. Ak má testovaná chemikália nízku rozpustnosť alebo ju nemožno rozpustiť alebo rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút vo fyziologickom roztoku, ako druhá možnosť sa pri výbere rozpúšťadla použije 5 % DMSO (registračné číslo CAS 67-68-5) vo fyziologickom roztoku. V prípade testovaných chemikálií, ktoré nemožno rozpustiť ani rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút ani vo fyziologickom roztoku, ani v 5 % DMSO vo fyziologickom roztoku, sa ako tretia možnosť pri výbere rozpúšťadla použije minerálny olej (registračné číslo CAS 8042-47-5).

19. Testované chemikálie sa rozpustia alebo rovnomerne rozmiešajú vo zvolenom rozpúšťadle pri koncentrácii 5 hm. % a ďalej sa riedia sériovým 10-násobným riedením na koncentrácie 0,5 % a 0,05 %. Každá testovaná chemikália sa testuje pri koncentráciách 5 % aj 0,05 %. Bunky kultivované v 96-jamkovej mikrotitračnej platničke sa vystavia roztoku (alebo suspenzii) testovanej chemikálie s koncentráciou 5 % alebo 0,05 % v objeme 200 µl/jamka na päť minút pri izbovej teplote. Testované chemikálie (jednozložkové látky alebo viaczložkové látky alebo zmesi) sa považujú za látky v čistom stave a podľa príslušnej metódy sa riedia alebo rozmiešajú bez ohľadu na svoju čistotu.

20. Kultivačné médium opísané v odseku 16 sa používa ako kontrola s médiom na jednotlivých platničkách pri každom opakovaní. Bunky sa okrem toho vystavia aj vzorkám kontroly s aplikáciou rozpúšťadla na každej platničke pri každom opakovaní. V prípade rozpúšťadiel uvedených v odseku 18 sa potvrdilo, že nemajú nežiaduce účinky na životaschopnosť buniek SIRC.

21. V testovacej metóde STE sa na jednotlivých platničkách pri každom opakovaní ako pozitívna kontrola použije 0,01 % laurylsulfátu sodného (SLS) vo fyziologickom roztoku. S cieľom vypočítať životaschopnosť buniek pozitívnej kontroly sa na každej platničke pri každom opakovaní musí nachádzať aj kontrola s aplikáciou fyziologického roztoku ako rozpúšťadla.

22. Vyžaduje sa slepý pokus na určenie kompenzácie optickej hustoty, ktorý je potrebné vykonať na jamkách obsahujúcich len fosfátový tlmivý fyziologický roztok, nie však vápnik a horčík (PBS-) alebo bunky.

23. Každá vzorka (testovaná chemikália s koncentráciou 5 % a 0,05 %, kontrola s médiom, kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a pozitívna kontrola) sa testuje pri každom opakovaní trojmo tak, že sa bunky počas piatich minút pri izbovej teplote vystavia 200 µl príslušnej testovanej alebo kontrolnej chemikálie.

24. Referenčné látky sú užitočné na posudzovanie potenciálu neznámych chemikálií určitých chemických tried alebo tried výrobkov spôsobovať očné podráždenie alebo na posudzovanie relatívneho dráždivého potenciálu očnej dráždivej látky v určitom rozsahu reakcií na dráždivý podnet.

Meranie životaschopnosti buniek

25. Po expozícii sa bunky dvakrát premyjú 200 µl roztoku PBS a pridá sa 200 µl roztoku MTT (0,5 mg MTT/ml kultivačného média). Po dvojhodinovom čase reakcie v inkubátore (37 °C, 5 % CO_2) sa roztok MTT dekantuje, formazán MTT sa extrahuje pridaním 200 µl roztoku 0,04 N kyseliny chlorovodíkovej v izopropanole počas 60 minút v tme pri izbovej teplote a zmeria sa absorbancia roztoku formazánu MTT pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou vyhodnocovača mikrotitračných platničiek. K interferencii testovaných chemikálií so skúškou MTT (prostredníctvom farbív alebo priamych redukčných činidiel MTT) dochádza, len ak po prepláchnutí po expozícii zostane v testovacom systéme významné množstvo testovanej chemikálie, k čomu môže dôjsť v prípade tkanív 3D rekonštruovanej ľudskej rohovky alebo rekonštruovanej ľudskej epidermy, nie je to však relevantné pre 2D bunkové kultúry, ktoré sa používajú pri testovacej metóde STE.

Interpretácia výsledkov a prognostický model

26. Hodnoty optickej hustoty (OD) získané pre každú testovanú chemikáliu sa následne použijú na výpočet životaschopnosti buniek vzhľadom na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, ktorá predstavuje úroveň 100 %. Relatívna životaschopnosť buniek sa vyjadruje v percentách a určí sa ako podiel OD testovanej chemikálie a OD kontroly s aplikáciou rozpúšťadla po tom, ako sa od oboch hodnôt odpočíta OD slepého pokusu.

$$Životaschop.buniek(\%) = \frac{(OD_{570}\ testovanej\ chemikálie) - (OD_{570}\ slepého\ pokusu)}{(OD_{570}\ kontroly\ srozpúšťadlom) - (OD_{570}\ slepého\ pokusu)} \times 100$$

Podobne sa relatívna životaschopnosť každej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla vyjadruje v percentách a určí sa ako podiel OD každej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a OD kontroly s médiom po tom, ako sa od oboch hodnôt odpočíta OD slepého pokusu.

27. Je potrebné uskutočniť tri nezávislé opakovania, pričom každé obsahuje tri replikované jamky (t. j. n = 9). Aritmetický priemer týchto troch jamiek pre každú testovanú chemikáliu a kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla v každom nezávislom opakovaní sa použije na výpočet aritmetického priemeru relatívnej životaschopnosti buniek. Konečný aritmetický priemer životaschopnosti buniek sa vypočíta z troch nezávislých opakovaní.

28. Ďalej sa uvádzajú hraničné hodnoty životaschopnosti buniek na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP), a testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP).

Tabuľka 2

Prognostický model testovacej metódy STE

Životaschopnosť buniek		Klasifikácia podľa GHS OSN/CLP	Uplatniteľnosť
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
< 70 %	< 70 %	bez kategórie	látky a zmesi, s výnimkou: i) vysoko prchavých látok s tlakom pár presahujúcim 6 kPa (1) a ii) tuhých chemikálií (látok a zmesí) okrem povrchovo aktívnych látok a zmesí zložených len z povrchovo aktívnych látok
≤ 70 %	< 70 %	predpoklad nie je možný	neuplatňuje sa
≤ 70 %	≤ 70 %	kategória 1	látky a zmesi (2)

(1) Je potrebné postupovať obozretne pri hodnotení zmesí, ktoré obsahujú látky s tlakom pár vyšším ako 6 kPa, aby sa predišlo potenciálnemu podhodnoteniu predpokladu, a primeranosť ich testovania by mala byť individuálne preukázaná v jednotlivých prípadoch.

(2) Na základe výsledkov získaných hlavne z jednozložkových látok. Existuje však aj obmedzené množstvo údajov na základe testovania zmesí. Táto testovacia metóda je napriek tomu technicky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

Kritériá prijateľnosti

29. Výsledky testov sa považujú za prijateľné, keď sú splnené všetky tieto kritériá:

a) Optická hustota kontroly s médiom (vystavenej kultivačnému médiu) má byť po odpočítaní optickej hustoty slepého pokusu 0,3 alebo vyššia.

b) Životaschopnosť kontroly s aplikáciou rozpúšťadla má byť vzhľadom na kontrolu s médiom 80 % alebo vyššia. Ak sa pri každom opakovaní použijú viaceré kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, pri každej z týchto kontrol sa má preukázať životaschopnosť buniek vyššia ako 80 %, aby testované chemikálie, ktoré sa testovali s týmito rozpúšťadlami, vyhoveli požiadavkám.

c) Životaschopnosť buniek zistená pri pozitívnej kontrole (0,01 % SLS) má byť v rozsahu dvoch štandardných odchýlok voči historickej strednej hodnote. Horné a dolné hranice prijateľnosti pre pozitívnu kontrolu sa majú aktualizovať v častých intervaloch, t. j. každé tri mesiace, alebo v prípade laboratórií, v ktorých sa testy vykonávajú zriedkavo (t. j. menej ako raz mesačne), vždy, keď sa v nich uskutoční prijateľný test. V prípade, že laboratórium neuskutočňuje dostatočný počet pokusov na vytvorenie štatisticky spoľahlivej distribúcie pozitívnych kontrol, je prijateľné použiť hornú a dolnú hranicu prijateľnosti, ktorú určil autor metódy, t. j. 21,1 % až 62,3 % podľa jeho historických laboratórnych údajov, kým sa počas prvých bežných testov nevygenerujú interné údaje o distribúcii.

d) Štandardná odchýlka konečnej životaschopnosti buniek odvodenej od troch nezávislých opakovaní má byť menšia ako 15 % pre koncentrácie testovanej chemikálie 5 % aj 0,05 %.

Ak jedno alebo viaceré z týchto kritérií nebudú splnené, výsledky sa zrušia a je potrebné uskutočniť ďalšie tri nezávislé opakovania.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

30. Je potrebné uvádzať údaje pre každú jednotlivú jamku (napr. hodnoty životaschopnosti buniek) každého opakovania, ako aj celkovú strednú hodnotu, SD a klasifikáciu.

Správa o teste

31. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália a kontrolné látky

— jednozložkové látky: identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, registračné čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— viaczložkové látky, UVCB a zmesi: čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— skupenstvo, prchavosť, pH, koeficient LogP, molekulová hmotnosť, chemická trieda a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu.

Podmienky a postupy testovacej metódy

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitej testovacej metódy,

— použitá bunková línia, jej zdroj, počet pasáží a konfluencia buniek použitých na testovanie,

— podrobnosti o použitom testovacom postupe,

— počet opakovaní a použitých replikátov,

— použité koncentrácie testovaných chemikálií (ak sa líšia od odporúčaných koncentrácií),

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú testovanú chemikáliu,

— trvanie expozície testovanej chemikálii (ak sa líši od odporúčaného trvania),

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— odkaz na historickú strednú hodnotu pozitívnych kontrol a štandardnú odchýlku,

— preukázanie spôsobilosti laboratória pri uskutočňovaní testovacej metódy (napr. testovaním látky na preukázanie spôsobilosti) alebo preukázanie reprodukovateľného vykonávania testovacej metódy v priebehu času.

Výsledky

— pre každú testovanú chemikáliu a kontrolnú látku, ako aj jednotlivé testované koncentrácie sa v tabuľkovej podobe uvádzajú individuálne hodnoty OD na každú replikovanú jamku, hodnoty aritmetického priemeru OD pre každé nezávislé opakovanie, percentuálna hodnota životaschopnosti buniek pre každé nezávislé opakovanie a konečný aritmetický priemer percentuálnych hodnôt životaschopnosti buniek a SD za tri opakovania,

— výsledky pre médium, rozpúšťadlo a pozitívnu kontrolu preukazujúce vhodné akceptačné kritériá štúdie,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— celková odvodená klasifikácia s prihliadnutím na použitý prognostický model/rozhodovacie kritériá.

Diskusia o výsledkoch

Záver

LITERATÚRA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al*. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, s. 1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. K dispozícii na adrese: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitola B.5 tejto prílohy, Akútne podráždenie/poleptanie oka

(9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci. 1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

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

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (13).

Referenčná látka: látka, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou chemikáliou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentné a spoľahlivé zdroje; ii) štruktúrnu a funkčnú podobnosť s triedou testovaných látok; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej reakcie.

Prístup zdola nahor: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že si nevyžaduje klasifikáciu ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií nevyžadujúcich klasifikáciu (negatívny výsledok) od ostatných chemikálií (pozitívny výsledok).

Chemikália: látka alebo zmes.

Podráždenie očí: vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne vratné. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „vratné účinky na oči“ a kategóriou 2 podľa GHS OSN/CLP.

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych chemikálií, ktoré sú na základe testovacej metódy nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych chemikálií, ktoré boli testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

Kontrola s médiom: neošetrený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou, ako aj s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

MTT: 2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid, tiazolylová modrá tetrazólium-bromid.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

OD: optická hustota.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, rozsah pozitívnej reakcie by nemal byť nadmerný.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (10).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (13).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (10).

Vážne poškodenie očí: poškodenie očného tkaniva alebo veľmi výrazné zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po aplikácii. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „nevratné účinky na oči“ a kategóriou 1 podľa GHS OSN/CLP.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému vrátane rozpúšťadla alebo nosiča a ktorá sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou a s inými kontrolnými vzorkami, aby sa zistila základná reakcia vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (13).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii kontrolujú v určitom poradí analýzou váhy dôkazov na každej z úrovní, pričom sa pred prechodom na ďalšiu úroveň zisťuje, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti. Ak sa dráždivý potenciál testovanej chemikálie môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej chemikálie nemožno stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Prístup zhora nadol: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (pozitívny výsledok) od ostatných chemikálií (negatívny výsledok).

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

Kategória 1 podľa GHS OSN/CLP: pozri „vážne poškodenie očí“.

Kategória 2 podľa GHS OSN/CLP: pozri „podráždenie očí“.

„Bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP: chemikálie, ktoré nie sú klasifikované v kategórii 1 ani 2 podľa GHS OSN/CLP (prípadne v kategórii 2A ani 2B podľa GHS OSN).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

B.69 **TESTOVACIA METÓDA S VYUŽITÍM REKONŠTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO ĽUDSKEJ ROHOVKE (RhCE) NA IDENTIFIKÁCIU CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU A OZNAČOVANIE AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 492 (2017). *Vážne poškodenie očí* označuje poškodenie očného tkaniva alebo veľmi výrazné zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po aplikácii, ako sa vymedzuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií Organizácie Spojených národov (GHS OSN) (1) a nariadení Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]). Takisto podľa GHS OSN a CLP predstavuje *podráždenie očí* vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne vratné. Testované chemikálie, ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí, sú klasifikované v kategórii 1 podľa GHS OSN a CLP, zatiaľ čo chemikálie, ktoré vyvolávajú podráždenie očí, sú klasifikované v kategórii 2 GHS OSN a CLP. Testované chemikálie neklasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí sú vymedzené ako chemikálie, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu v kategórii 1 alebo 2 (2A alebo 2B) GHS OSN a CLP, t. j. uvádzajú sa ako chemikálie „bez kategórie“ podľa GHS OSN a CLP.

2. Posudzovanie vážneho poškodenia očí/podráždenia očí sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách [TM B.5 (2)]. Výber najvhodnejšej testovacej metódy a jej použitie je potrebné posudzovať v kontexte usmerňovacieho dokumentu OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu v prípade vážneho poškodenia očí a podráždenia očí (39).

3. V tejto testovacej metóde sa opisuje postup *in vitro*, ktorý umožňuje identifikáciu chemikálií (látok a zmesí), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí v súlade s GHS OSN a CLP. Využíva sa pri nej rekonštruovaný epitel podobný ľudskej rohovke (RhCE), ktorý do veľkej miery napodobňuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti epitelu ľudskej rohovky. Validované sú štyri ďalšie testovacie metódy *in vitro*, ktoré sa považujú za vedecky platné a prijaté ako TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) a B.68 (6), pričom sa z hľadiska sledovaných parametrov ľudského zdravia týkajú vážneho poškodenia očí/podráždenia očí.

4. Súčasťou tejto testovacej metódy sú dva validované testy s využitím komerčne dostupných modelov RhCE. V súvislosti s podráždením očí/vážnym poškodením očí sa uskutočnili validačné štúdie (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) s využitím testu očnej dráždivosti (EIT) EpiOcular™ a testu očnej dráždivosti (EIT) s epitelom ľudskej rohovky SkinEthic™ (HCE). V každom z týchto testov sa ako testovací systém využívajú komerčne dostupné modely tkaniva RhCE, ktoré sa ďalej označujú ako validované referenčné metódy – VRM 1, resp. VRM2. Na základe týchto validačných štúdií a ich nezávislého partnerského preskúmania (9) (12) sa dospelo k záveru, že testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT umožňujú správne identifikovanie chemikálií (látok aj zmesí), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa GHS OSN, a tieto testy sa odporúčajú ako vedecky platné na príslušný účel (13).

5. V súčasnosti sa vo všeobecnosti uznáva, že v dohľadnej budúcnosti nedokáže žiadna jednotlivá testovacia metóda *in vitro* úplne nahradiť Draizov očný test *in vivo* (2) (14) na účely predikcie úplného rozsahu reakcií, ktoré sa prejavujú vážnym poškodením očí/podráždením očí, pre rôzne triedy chemikálií. Draizov očný test (15) však možno dokážu nahradiť strategické kombinácie niekoľkých alternatívnych testovacích metód, napr. prístup zdola nahor/zhora nadol, v rámci (viacúrovňových) testovacích stratégií. Prístup zdola nahor (15) je určený na použitie v prípade, keď sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália nespôsobuje podráždenie očí v takej miere, aby sa pri nej vyžadovala príslušná klasifikácia, zatiaľ čo prístup zhora nadol (15) je určený na použitie v prípade, že sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália spôsobuje vážne poškodenie očí. Testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT sa odporúčajú na identifikovanie chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa GHS OSN/CLP („bez kategórie“), bez ďalšieho testovania, a to v rámci stratégie testovania, ako je napríklad prístup zdola nahor/zhora nadol, ktorý navrhol Scott a kol., napríklad ako prvý krok v prístupe zdola nahor alebo ako jeden z posledných krokov v prístupe zhora nadol (15). Testy

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT nie sú zamýšľané na rozlišovanie medzi kategóriou 1 podľa GHS OSN/CLP (vážne poškodenie očí) a kategóriou 2 podľa GHS OSN/CLP (podráždenie očí). Toto rozlíšenie je potrebné zabezpečiť pomocou ďalšej úrovne stratégie testovania (15). V prípade testovanej chemikálie, pri ktorej sa pomocou testu EpiOcular™ EIT alebo SkinEthic™ HCE EIT určí, že si vyžaduje klasifikáciu ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí/vážne poškodenie očí, sa bude vyžadovať doplňujúce testovanie (*in vitro* a/alebo *in vivo*), aby bolo možné dospieť k definitívnemu záveru („bez kategórie“, kategória 2 alebo kategória 1 podľa GHS OSN/CLP), a to napríklad pomocou TM B.47, B.48, B.61 alebo B.68.

6. Účelom tejto testovacej metódy je opísať postup používaný na hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči, a to na základe jej schopnosti vyvolať cytotoxicitu v modeli tkaniva RhCE podľa merania na základe skúšky MTT (16) (pozri odsek 21). Životaschopnosť tkaniva RhCE po expozícii testovanej chemikálii sa určuje na základe porovnania s tkanivami ošetrenými látkou negatívnej kontroly (percentuálna miera životaschopnosti) a následne slúži ako predpoklad potenciálu nebezpečnosti testovanej chemikálie pre oči.

7. K dispozícii sú výkonnostné normy (17) s cieľom uľahčiť validáciu nových alebo upravených testov *in vitro* na základe RhCE, ktoré sú podobné testom EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT, a to v súlade so zásadami usmerňovacieho dokumentu OECD č. 34 (18), pričom umožňujú včasnú zmenu usmernenia OECD TG 492 na účely začlenenia týchto testov. Vzájomné uznávanie údajov (MAD) podľa dohody OECD bude možné garantovať len pri testoch validovaných podľa týchto výkonnostných noriem v prípade, že OECD tieto testy preskúmala a zaradila do príslušného usmernenia na vykonávanie testov.

VYMEDZENIE POJMOV

8. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

9. Táto testovacia metóda je založená na komerčných trojrozmerných modeloch tkaniva RhCE, ktoré sú vytvorené buď pomocou primárnych keratínocytov ľudskej epidermy (t. j. EpiOcular™ OCL-200), alebo ľudských imortalizovaných buniek epitelu rohovky (t. j. SkinEthic™ HCE/S). Modely tkaniva RhCE EpiOcular™ OCL-200 a SkinEthic™ HCE/S sú podobné trojrozmernej štruktúre epitelu rohovky *in vivo* a sú vytvorené pomocou buniek z druhov, ktoré sú predmetom záujmu (19) (20). Tieto testy okrem toho slúžia na priame meranie cytotoxicity v dôsledku preniknutia chemikálie cez rohovku a poškodenia buniek a tkaniva. Cytotoxická reakcia tak určuje celkový výsledok *in vivo* z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí. K poškodeniu buniek môže dôjsť viacerými spôsobmi účinku (pozri odsek 20), cytotoxicita však zohráva významnú, ak nie primárnu, mechanistickú úlohu pri určení celkovej reakcie spôsobenej chemikáliou z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí, ktorá sa prejavuje *in vivo* najmä zákalom rohovky, zápalom dúhovky, začervenaním spojoviek a/alebo chemózou spojoviek, a to bez ohľadu na fyzikálno-chemické procesy vedúce k poškodeniu tkaniva.

10. V rámci validačnej štúdie k tejto testovacej metóde sa testovalo široké spektrum chemikálií, ktoré zahŕňalo veľké množstvo chemických typov, chemických tried, molekulových hmotností, koeficientov LogP, chemických štruktúr atď. Validačná databáza testu EpiOcular™ EIT celkovo obsahuje 113 chemikálií, ktoré zahŕňajú 95 rozličných organických funkčných skupín podľa analýzy na základe množiny nástrojov OECD QSAR (8). Väčšinu z týchto chemikálií predstavovali jednozložkové látky, súčasťou štúdie však bolo aj viacero viaczložkových látok (vrátane 3 homopolymérov, 5 kopolymérov a 10 kvázipolymérov). Z hľadiska skupenstva a kategórií podľa GHS OSN/CLP bolo 113 testovaných chemikálií rozdelených takto: 13 kvapalín v kategórii 1, 15 tuhých látok v kategórii 1, 6 kvapalín v kategórii 2A, 10 tuhých látok v kategórii 2A, 7 kvapalín v kategórii 2B, 7 tuhých látok v kategórii 2B, 27 kvapalín „bez kategórie“ a 28 tuhých látok „bez kategórie“ (8). Validačná databáza testu SkinEthic™ HCE EIT celkovo obsahuje 200 chemikálií, ktoré zahŕňajú 165 rozličných organických funkčných skupín (8) (10) (11). Väčšinu z týchto chemikálií predstavovali jednozložkové látky, súčasťou štúdie však bolo aj viacero viaczložkových látok (vrátane 10 polymérov). Z hľadiska skupenstva a kategórií podľa GHS OSN/CLP bolo 200 testovaných chemikálií rozdelených takto: 27 kvapalín v kategórii 1, 24 tuhých látok v kategórii 1, 19 kvapalín v kategórii 2A, 10 tuhých látok v kategórii 2A, 9 kvapalín v kategórii 2B, 8 tuhých látok v kategórii 2B, 50 kvapalín „bez kategórie“ a 53 tuhých látok „bez kategórie“ (10) (11).

11. Táto testovacia metóda sa uplatňuje na látky a zmesi a na tuhé látky, kvapaliny, polotuhé látky a vosky. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné, tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Ak je to možné, tuhé látky sa pred aplikáciou rozomelú na jemný prášok; iná predpríprava vzorky nie je potrebná. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačnej štúdii. Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať technológiou RhCE, súčasná testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

12. Testované chemikálie, ktoré absorbujú svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT (prirodzene alebo po ošetrení), a testované chemikálie, ktoré dokážu priamo redukovať vitálne farbivo MTT (na formazán MTT), môžu ovplyvňovať merania životaschopnosti tkaniva a na účely korekcie sa pri nich vyžaduje použitie prispôsobených kontrol. Typ prispôsobených kontrol, ktoré sa môžu vyžadovať, sa bude líšiť v závislosti od typu interferencie vyvolanej testovanou chemikáliou a postupu, ktorý slúži na kvantifikovanie formazánu MTT (pozri odseky 36 – 42).

13. Na základe výsledkov získaných v predvalidačných (21) (22) a úplných validačných štúdiách (8) (10) (11) sa preukázalo, že testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT sú prenosné do laboratórií, ktoré nemajú skúsenosti s vykonávaním takýchto skúšok, a považujú sa za reprodukovateľné v rámci laboratórií aj medzi laboratóriami. Na základe týchto štúdií je úroveň reprodukovateľnosti rádovo 95 % v rámci laboratórií a 93 % medzi laboratóriami z hľadiska zhody predpokladov, ktoré možno očakávať pri teste EpiOcular™ EIT na základe údajov o 113 chemikáliách. Úroveň reprodukovateľnosti je rádovo 92 % v rámci laboratórií a 95 % medzi laboratóriami z hľadiska zhody predpokladov, ktoré možno očakávať pri teste SkinEthic™ HCE EIT na základe údajov o 120 chemikáliách.

14. Test EpiOcular™ EIT možno použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP. Vzhľadom na údaje získané v rámci validačnej štúdie (8) má test EpiOcular™ EIT celkovú presnosť 80 % (na základe 112 chemikálií), citlivosť 96 % (na základe 57 chemikálií), mieru falošnej negativity 4 % (na základe 57 chemikálií), špecifickosť 63 % (na základe 55 chemikálií) a mieru falošnej pozitivity 37 % (na základe 55 chemikálií) v porovnaní s údajmi referenčného očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14), ktoré sa klasifikovali podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP. V štúdii, v ktorej sa pomocou testu EpiOcular™ EIT testovalo 97 kvapalných agrochemických prípravkov, sa pri tomto type zmesí preukázala podobná výkonnosť tejto testovacej metódy, ako sa dosiahla vo validačnej štúdii (23). Týchto 97 prípravkov bolo rozdelených takto: 21 v kategórii 1, 19 v kategórii 2A, 14 v kategórii 2B a 43 „bez kategórie“ podľa klasifikácie v zmysle klasifikačného systému GHS OSN na základe údajov referenčného očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14). Dosiahla sa celková presnosť 82 % (na základe 97 prípravkov), citlivosť 91 % (na základe 54 prípravkov), miera falošnej negativity 9 % (na základe 54 prípravkov), špecifickosť 72 % (na základe 43 prípravkov) a miera falošnej pozitivity 28 % (na základe 43 prípravkov) (23).

15. Test SkinEthic™ HCE EIT možno použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP. Vzhľadom na údaje získané v rámci validačnej štúdie (10) (11) má test SkinEthic™ HCE EIT celkovú presnosť 84 % (na základe 200 chemikálií), citlivosť 95 % (na základe 97 chemikálií), mieru falošnej negativity 5 % (na základe 97 chemikálií), špecifickosť 72 % (na základe 103 chemikálií) a mieru falošnej pozitivity 28 % (na základe 103 chemikálií) v porovnaní s údajmi referenčného očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14), ktoré sa klasifikovali podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP.

16. Miery falošnej negativity zistené pri oboch testoch RhCE v prípade látok alebo zmesí sa nachádzajú v rozmedzí 12 % celkovej pravdepodobnosti toho, že pri opakovaných testoch budú chemikálie zaradené do kategórie 2 podľa GHS OSN a CLP alebo budú označené ako chemikálie bez kategórie podľa GHS OSN a CLP na základe Draizovho očného testu *in vivo*, čo je dôsledkom vnútornej variability v rámci testov pri tejto metóde (24). V kontexte tejto testovacej

metódy nie sú miery falošnej negativity zistené pri oboch testovacích metódach RhCE v prípade látok alebo zmesí kritické, keďže všetky testované chemikálie, ktoré vyvolávajú životaschopnosť tkaniva rovnakú alebo nižšiu ako stanovené hraničné hodnoty (pozri odsek 44), si budú vyžadovať ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód *in vitro* alebo, ako posledná možnosť, testovanie na králikoch v závislosti od regulatórnych požiadaviek, a to pomocou stratégie postupného testovania v rámci prístupu založeného na analýze váhy dôkazov. Tieto testovacie metódy možno použiť pri všetkých typoch chemikálií, pričom pri negatívnom výsledku sa chemikália nemá klasifikovať ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí a vážne poškodenie očí (bez kategórie podľa GHS OSN a CLP). Pred použitím testov EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT podľa iných klasifikačných schém než GHS OSN/CLP je potrebné sa obrátiť na príslušné regulačné orgány.

17. Obmedzením tejto testovacej metódy je to, že neumožňuje rozlišovanie medzi podráždením očí/vratnými účinkami na oči (kategória 2) a vážnym poškodením očí/nevratnými účinkami na oči (kategória 1), ako sa vymedzujú v zmysle GHS OSN a CLP, ani medzi látkami dráždivými pre oči (voliteľná kategória 2A) a látkami mierne dráždivými pre oči (voliteľná kategória 2B), ako sa vymedzujú v zmysle GHS OSN (1). Na tieto účely sa vyžaduje ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód *in vitro*.

18. Pojem „testovaná chemikália" sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje ([2]), a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy RhCE na testovanie látok a/alebo zmesí.

PRINCÍP TESTU

19. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje najmenej na dva trojrozmerné modely tkaniva RhCE a zmeria sa životaschopnosť tkaniva po expozícii a po uplynutí inkubačného času po ošetrení. Tkanivá RhCE sa rekonštruujú z primárnych keratínocytov ľudskej epidermy alebo ľudských imortalizovaných buniek epitelu rohovky, ktoré sa niekoľko dní kultivovali, aby vznikol viacradový dlaždicový epitel s vysokou mierou diferenciácie, ktorý je morfologicky podobný epitelu v ľudskej rohovke. Model tkaniva RhCE v teste EpiOcular™ obsahuje najmenej tri životaschopné vrstvy buniek a nekeratinizovaný povrch, pričom má štruktúru podobnú rohovke, ktorá je obdobná štruktúre *in vivo*. Model tkaniva RhCE v teste SkinEthic™ HCE obsahuje najmenej štyri životaschopné vrstvy buniek vrátane cylindrických bazálnych buniek, prechodných polyedrických buniek (tzv. wing cells) a povrchových dlaždicových buniek, ktoré sú podobné bunkám normálneho epitelu ľudskej rohovky (20) (26).

20. Vážne poškodenie očí/podráždenie očí vyvolané chemikáliou, ktoré sa prejavuje *in vivo* najmä zákalom rohovky, zápalom dúhovky, začervenaním spojoviek a/alebo chemózou spojoviek, je dôsledkom kaskády udalostí, ktoré sa začínajú prienikom chemikálie cez rohovku a/alebo spojovku a poškodením buniek. K poškodeniu buniek môže dôjsť viacerými spôsobmi účinku vrátane lýzy bunkovej membrány (napr. povrchovo aktívnymi látkami, organickými rozpúšťadlami), koagulácie makromolekúl (najmä bielkovín) (napr. povrchovo aktívnymi látkami, organickými rozpúšťadlami, alkáliami a kyselinami), zmydelnením lipidov (napr. alkáliami) a alkyláciou alebo inými kovalentnými interakciami s makromolekulami (napr. bielidlami, peroxidmi a alkylačnými činidlami) (15) (27) (28). Preukázalo sa však, že cytotoxicita zohráva významnú, ak nie primárnu, mechanistickú úlohu pri určení celkovej reakcie spôsobenej chemikáliou z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí, a to bez ohľadu na fyzikálno-chemické procesy vedúce k poškodeniu tkaniva (29) (30). Okrem toho sa potenciál chemikálie spôsobiť vážne poškodenie očí/podráždenie očí v zásade určuje na základe rozsahu počiatočného poranenia (31), ktoré koreluje s rozsahom bunkovej smrti (29) a s rozsahom následných reakcií a konečných následkov (32). Slabo dráždivé látky tak vo všeobecnosti ovplyvňujú len povrchový epitel rohovky, mierne a stredne dráždivé látky v zásade poškodzujú epitel a povrchovú strómu a silne dráždivé látky poškodzujú epitel, hlbokú strómu a niekedy aj endotel rohovky (30) (33). Pri meraní životaschopnosti modelu tkaniva RhCE po lokálnej expozícii testovanej chemikálii s cieľom identifikovať chemikálie, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce vážne poškodenie očí/podráždenie očí (bez kategórie podľa GHS OSN/CLP), sa vychádza z predpokladu, že všetky chemikálie vyvolávajúce vážne poškodenie očí alebo podráždenie očí budú vyvolávať cytotoxicitu v epiteli rohovky a/alebo spojovke.

([2]) V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí OECD dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných usmerneniach OECD na vykonávanie testov na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália".

21. Životaschopnosť tkaniva v modeloch RhCE sa štandardne meria na základe enzymatickej premeny vitálneho farbiva MTT [2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid, tiazolylová modrá tetrazólium-bromid, číslo CAS 298-93-1)] prostredníctvom životaschopných buniek tkaniva na modrú soľ formazánu MTT, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (16). Ako chemikálie, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie podľa GHS OSN/CLP (bez kategórie), sa označujú tie, ktoré nespôsobujú zníženie životaschopnosti tkaniva pod vymedzenú prahovú hodnotu (t. j. životaschopnosť tkaniva > 60 % v testoch EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EITL ([3]) alebo > 50 % v teste SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (pozri odsek 44).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

22. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testov RhCE na regulačné účely preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne stanovia predpoklady pre pätnásť chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 1. Tieto chemikálie boli zvolené spomedzi chemikálií použitých v rámci validačných štúdií metód VRM (8) (10) (11). Vo výbere sa v maximálnej možnej miere nachádzajú chemikálie, ktoré: i) zahŕňajú rôzne skupenstvá; ii) pokrývajú celý rozsah reakcií *in vivo* z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí na základe výsledkov s vysokou kvalitou, ktoré sa dosiahli v referenčnom očnom teste *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14), a na základe klasifikačného systému GHS OSN (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo bez kategórie) (1) a klasifikačného systému CLP (t. j. kategórie 1, 2 alebo bez kategórie); iii) pokrývajú rôzne faktory klasifikácie *in vivo* (24)(25); iv) reprezentujú chemické triedy použité vo validačnej štúdii (8) (10) (11); v) zabezpečujú vhodné a široké zastúpenie organických funkčných skupín (8) (10) (11); vi) majú dobre vymedzené chemické štruktúry (8) (10) (11); vii) sú farebné a/alebo priame redukčné činidlá MTT; viii) počas validácií vyvolávali reprodukovateľné výsledky v testovacích metódach RhCE; ix) počas validačných štúdií pri nich boli pomocou testovacích metód RhCE stanovené správne predpoklady; x) pokrývajú celý rozsah reakcií *in vitro* na základe údajov s vysokou kvalitou z testovacích metód RhCE (životaschopnosť 0 až 100 %); xi) sú komerčne dostupné a xii) nie sú spojené s neúmernými nákladmi na nadobudnutie a/alebo zneškodnenie. V situáciách, keď uvedená chemikália nie je k dispozícii alebo ju z oprávnených dôvodov nemožno použiť, sa môže použiť iná chemikália, ktorá spĺňa uvedené kritériá, napr. spomedzi chemikálií použitých pri validácii VRM. Takéto odchýlky je však potrebné zdôvodniť.

Tabuľka 1

Zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti

Chemický názov	Registračné číslo CAS	Organická funkčná skupina ([1])	Skupenstvo	Životaschopnosť pri VRM1 (%) ([2])	Životaschopnosť pri VRM2 (%) ([3])	Predpoklad pri VRM	Redukčné činidlo MTT	Farebná interferencia
Kategória 1 *in vivo* ([4])								
metyltioglykolát	2365-48-2	ester kyseliny karboxylovej; tioalkohol	kvapalné	10,9 ±6,4	5,5 ±7,4	predpoklad nie je možný	Áno (silné)	Nie
hydroxyetyl akrylát	818-61-1	akrylát; alkohol	kvapalné	7,5 ±4,7 ([5])	1,6 ±1,0	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
2,5-dimetyl-2,5-hexándiol	110-03-2	alkohol	tuhé	2,3 ±0,2	0,2 ±0,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
šťaveľan sodný	62-76-0	kyselina oxokarboxylová	tuhé	29,0 ±1,2	5,3 ±4,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
Kategória 2A in vivo ([4])								
2,4,11,13-tetraazatetradekándiimidamid, N,N″-bis(4-chlórfenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonát (20 %, vodný) ([6])	18472-51-0	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; dihydroxylová skupina; guanidín	kvapalné	4,0 ±1,1	1,3 ±0,6	predpoklad nie je možný	Nie	Áno (slabá)

([3]) EITL: test EIT pre kvapaliny v prípade SkinEthic™ HCE.
([4]) EITS: test EIT pre tuhé látky v prípade SkinEthic™ HCE.

Chemický názov	Registračné číslo CAS	Organická funkčná skupina ([1])	Skupenstvo	Životaschopnosť pri VRM1 (%) ([2])	Životaschopnosť pri VRM2 (%) ([3])	Predpoklad pri VRM	Redukčné činidlo MTT	Farebná interferencia
benzoan sodný	532-32-1	aryl; karboxylová kyselina	tuhé	3,5 ±2,6	0,6 ±0,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
Kategória* 2B *in vivo ([4])								
dietyltoluamid	134-62-3	benzamid	kvapalné	15,6 ±6,3	2,8 ±0,9	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
2,2-dimetyl-3-metylénbicyklo[2.2.1]heptán	79-92-5	alkán, rozvetvený s terciárnym uhlíkom; alkén; bicykloheptán, premostené kruhové karbocyklické zlúčeniny; cykloalkán	tuhé	4,7 ±1,5	15,8 ±1,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
„Bez kategórie“ *in vivo* ([4])								
1-etyl-3-metylimidazólium etylsulfát	342573-75-5	alkoxy; amónna soľ; aryl; imidazol; sulfát	kvapalné	79,9 ±6,4	79,4 ±6,2	bez kategórie	Nie	Nie
dikaprylyl éter	629-82-3	alkoxy; éter	kvapalné	97,8 ±4,3	95,2 ±3,0	bez kategórie	Nie	Nie
piperonylbutoxid	51-03-6	alkoxy; benzodioxol; benzyl; éter	kvapalné	104,2 ±4,2	96,5 ±3,5	bez kategórie	Nie	Nie
polyetylénglykol (PEG-40) s hydrogenovaným ricínovým olejom	61788-85-0	akylal; alkohol; alyl; éter	viskózne	77,6 ±5,4	89,1 ±2,9	bez kategórie	Nie	Nie
1-(4-chlórfenyl)-3-(3,4-dichlórfenyl) močovina	101-20-2	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; deriváty močoviny	tuhé	106,7 ±5,3	101,9 ±6,6	bez kategórie	Nie	Nie
2,2′-metylénbis(6-(2H-benztriazol-2-yl)-4(1,1,3,3-tetrametylbutyl)fenol)	103597-45-1	alkán rozvetvený s kvartérnym uhlíkom; fúzovaná karbocyklická aromatická látka; fúzované nasýtené heterocyklické látky; prekurzorové chinoidné zlúčeniny; terc-butyl	tuhé	102,7 ±13,-4	97,7 ±5,6	bez kategórie	Nie	Nie

Chemický názov	Registračné číslo CAS	Organická funkčná skupina ([1])	Skupenstvo	Životaschopnosť pri VRM1 (%) ([2])	Životaschopnosť pri VRM2 (%) ([3])	Predpoklad pri VRM	Redukčné činidlo MTT	Farebná interferencia
tetrafluórborát draselný	14075-53-7	anorganická soľ	tuhé	88,6 ±3,3	92,9 ±5,1	bez kategórie	Nie	Nie

Skratky:

Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); GHS OSN = Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizácie Spojených národov (1); VRM1 = validovaná referenčná metóda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validovaná referenčná metóda, SkinEthic™ HCE EIT; Farebná interferencia = farebná interferencia s meraním absorbancie štandardu [optickej hustoty (OD)] formazánu MTT.

([1]) Organická funkčná skupina priradená podľa vnorenej analýzy množiny nástrojov OECD Toolbox 3.1 (8).

([2]) Na základe výsledkov získaných pomocou testu EpiOcular™ EIT v rámci validačnej štúdie podráždenia očí (EIVS) uskutočnenej organizáciou EURL ECVAM/združením Cosmetics Europe (8).

([3]) Na základe výsledkov získaných pomocou testu SkinEthic™ HCE EIT v rámci validačnej štúdie (10) (11).

([4]) Na základe výsledkov z očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5/OECD TG 405) (2) (14) a podľa klasifikácie GHS OSN.

([5]) Na základe výsledkov získaných v rámci štúdie organizácie CEFIC CONsortium zameranej na stratégiu testovania podráždenia očí *in vitro* (CON4EI).

([6]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN na rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 1 z 3, resp. 2 z 3 zvierat s účinkami na 7. deň ako podmienka na klasifikáciu v kategórii 2A. Do štúdie *in vivo* boli zahrnuté 3 zvieratá. Všetky sledované parametre s výnimkou zákalu rohovky v prípade jedného zvieraťa sa do 7. dňa alebo skôr vrátili na nulovú hodnotu. Toto jedno zviera, ktoré sa do 7. dňa v plnej miere nezotavilo, vykazovalo (na 7. deň) zákal rohovky s hodnotou 1, ktorý sa na 9. deň vrátil na pôvodnú hodnotu.

23. Ako súčasť postupu overovania spôsobilosti sa odporúča, aby používatelia overili bariérové vlastnosti tkanív po ich doručení, ako to stanovuje výrobca modelu tkaniva RhCE (pozri odseky 25, 27 a 30). To je dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhého časového obdobia. Po úspešnom stanovení testu a nadobudnutí a preukázaní spôsobilosti na jeho použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri pravidelnom používaní testu sa však odporúča naďalej posudzovať bariérové vlastnosti v pravidelných intervaloch.

POSTUP

24. Táto testovacia metóda v súčasnosti zahŕňa vedecky platné testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), ktoré sa označujú ako validovaná referenčná metóda (VRM1, resp. VRM2). K testovacím metódam RhCE sú k dispozícii štandardné operačné postupy, ktoré sa majú používať pri zavádzaní a využívaní týchto testovacích metód v laboratóriu (34) (35). V nasledujúcich odsekoch a v dodatku 2 sú opísané hlavné zložky a postupy testov RhCE.

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY RHCE

Všeobecné podmienky

25. Na rekonštruovanie trojrozmerného epitelového tkaniva podobného ľudskej rohovke je potrebné použiť zodpovedajúce bunky získané z ľudského organizmu, pričom toto tkanivo má byť zložené z postupne vrstvených, nie však zrohovatených buniek. Model tkaniva RhCE sa pripravuje v podobe vložených častí s pórovitou syntetickou membránou, cez ktorú môžu k bunkám prenikať živiny. V rekonštruovanom epiteli podobnom rohovke sa majú nachádzať viaceré vrstvy životaschopných nekeratinizovaných epitelových buniek. Epitelový povrch v modeli tkaniva RhCE má byť v priamom kontakte so vzduchom, aby bola možná priama lokálna expozícia testovaným chemikáliám podobným spôsobom, ako by došlo k expozícii epitelu rohovky *in vivo*. Model tkaniva RhCE má predstavovať funkčnú bariéru, ktorá je dostatočne robustná na to, aby odolávala rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných látok, ako je napríklad Triton X-100 alebo dodecylsulfát sodný (SDS). Bariérovú funkciu treba preukázať a môže sa posudzovať buď stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti tkaniva o 50 % (ET_{50}) po aplikácii referenčnej látky s pevne určenou koncentráciou (napr. 100 µl látky Triton X-100 v koncentrácii 0,3 obj. %), alebo stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná látka znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase (napr. 30-minútové ošetrenie pomocou 50 µl SDS) (pozri odsek 30). Izolačné vlastnosti modelu tkaniva RhCE by mali zabrániť prieniku testovanej chemikálie okolo okraja životaschopného tkaniva, čo by mohlo viesť k chybnému modelovaniu expozície rohovky. Bunky získané z ľudského organizmu, ktoré slúžia na vytvorenie modelu tkaniva RhCE, by nemali byť kontaminované baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami. Je potrebné, aby dodávateľ overil sterilitu modelu tkaniva, čím sa potvrdí, že nie je kontaminovaný hubami a baktériami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

26. Na kvantifikovanie životaschopnosti tkaniva sa používa skúška MTT (16). Životaschopné bunky modelu tkaniva RhCE redukujú vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT, ktorý sa potom extrahuje

z tkaniva pomocou izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla). Extrahovaný formazán MTT možno kvantifikovať buď meraním absorbancie štandardu [optickej hustoty (OD)] alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (36). OD samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne nízka, t. j. OD < 0,1. Používatelia modelu tkaniva RhCE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža modelu tkaniva RhCE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu. Rozsahy prijateľnosti hodnôt OD pri negatívnej kontrole pre VRM sú uvedené v tabuľke 2. Používatelia HPLC/UPLC spektrofotometrie by mali používať rozsahy OD negatívnej kontroly uvedené v tabuľke 2 ako kritérium prijateľnosti pre negatívnu kontrolu. V správe o teste by sa malo zdokumentovať, že tkanivá ošetrené látkou, ktorá predstavuje negatívnu kontrolu, sú v expozičnom čase testu stabilné v kultúre (zabezpečujú podobné výsledky merania životaschopnosti tkaniva). Podobne má postupovať výrobca tkaniva v rámci uvoľnenia šarže tkaniva na účely kontroly kvality, v takom prípade sa však môžu uplatňovať iné kritériá prijateľnosti ako kritériá uvedené v tabuľke 2. Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole (v podmienkach testovacej metódy na účely kontroly kvality) stanovuje autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE.

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti hodnôt OD pri negatívnej kontrole (pre používateľov testu)

Test	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (protokoly pre kvapaliny aj tuhé látky)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (protokoly pre kvapaliny aj tuhé látky)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Pri tejto hranici prijateľnosti sa zohľadňuje možnosť predĺženého času prepravy/skladovania (napr. > 4 dni), pri ktorom sa preukázalo, že nemá vplyv na výkonnosť testovacej metódy (37).

Bariérová funkcia

27. Model tkaniva RhCE má byť dostatočne hrubý a robustný, aby odolával rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných látok, čo sa odhaduje napríklad na základe hodnôt ET_{50} (Triton X-100) alebo IC_{50} (SDS) (tabuľka 3). Autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE má pri dodaní tkanív koncovému používateľovi preukázať bariérovú funkciu každej použitej šarže modelu tkaniva RhCE (pozri odsek 30).

Morfológia

28. Na základe histologického vyšetrenia modelu tkaniva RhCE sa má preukázať štruktúra epitelu podobného ľudskej rohovke (vrátane najmenej troch vrstiev životaschopných epitelových buniek a nekeratinizovaného povrchu). V prípade metód VRM stanovil vhodnú morfológiu autor/dodávateľ, preto ju nemusí preukazovať používateľ testovacej metódy pre každú použitú šaržu tkaniva.

Reprodukovateľnosť

29. Výsledky pozitívnych kontrol a negatívnych kontrol testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť v čase.

Kontrola kvality (QC)

30. Model tkaniva RhCE sa má použiť, len ak autor/dodávateľ preukáže, že každá šarža modelu tkaniva RhCE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšími kritériami životaschopnosť (odsek 26) a bariérová funkcia (odsek 27). Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre bariérové funkcie, ktorý sa meria na základe hodnôt ET_{50} alebo IC_{50} (pozri odseky 25 a 26), stanovuje autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE. Rozsah prijateľnosti ET_{50} a IC_{50}, ktorý používa autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE (použitých v metódach VRM) ako kritériá kontroly kvality na uvoľnenie šarže, sa uvádza v tabuľke 3. Údaje preukazujúce súlad so všetkými kritériami na uvoľnenie do obehu má autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE poskytnúť používateľom testovacej metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. Len výsledky dosiahnuté prostredníctvom tkanív, ktoré vyhovujú všetkým týmto kritériám na uvoľnenie do obehu, možno akceptovať na stanovenie predpokladov pri chemikáliách, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí v súlade s GHS OSN/CLP.

Tabuľka 3

Kritérium kontroly kvality na uvoľnenie šarže

Test	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl látky Triton X-100 v koncentrácii 0,3 obj. %)	ET_{50} = 12,2 min.	ET_{50} = 37,5 min.
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30-minútové ošetrenie s 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplikácia testovanej chemikálie a kontrolných látok

31. V každom testovacom cykle sa pri každej testovanej chemikálii a každej kontrolnej látke majú použiť aspoň dva replikáty tkaniva. Používajú sa dva rôzne protokoly ošetrenia, jeden pre kvapalné testované chemikálie a druhý pre tuhé testované chemikálie (34) (35). Pri oboch metódach a protokoloch sa pred aplikáciou testovanej chemikálie povrch modelu tkaniva zvlhčí pomocou Dulbeccovho fosfátového tlmivého fyziologického roztoku bez obsahu vápnika a horčíka (ďalej len DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}) s cieľom napodobniť vlhkosť prítomnú v ľudskom oku. Ošetrenie tkanív sa začína expozíciou testovanej chemikálii (testovaným chemikáliám) a kontrolným látkam. Pri oboch protokoloch ošetrenia v oboch VRM je potrebné na celý povrch epitelu rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovanej chemikálie alebo kontrolnej látky, pričom je nutné sa vyhýbať aplikovaniu nekonečnej dávky (pozri odseky 32 a 33) (dodatok 2).

32. V rámci VRM sa s testovanými chemikáliami, ktoré možno pipetovať pri teplote 37 °C alebo nižšej (v prípade potreby pomocou výtlakovej piestovej pipety), narába ako s kvapalinami, v opačnom prípade sa s nimi narába ako s tuhými látkami (pozri odsek 33). V rámci VRM sa kvapalné testované chemikálie rovnomerne rozotrú na povrch tkaniva (t. j. aplikácia minimálne 60 µl/cm^2) [pozri dodatok 2, (33) (34)]. S cieľom zaručiť správne dávkovanie na tkanivo je potrebné v čo najväčšej miere predísť kapilárnym účinkom (účinkom v dôsledku povrchového napätia), ktoré sa môžu vyskytnúť v súvislosti s nízkymi objemami aplikovanými na vloženú časť. Tkanivá ošetrené kvapalnými testovanými chemikáliami sa 30 minút inkubujú pri štandardných kultivačných podmienkach (37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %). Na konci expozičného času sa kvapalná testovaná chemikália a kontrolné látky opatrne odstránia z povrchu tkaniva dôkladným opláchnutím pomocou DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} pri izbovej teplote. Po tomto opláchnutí nasleduje postexpozičné ponorenie do čerstvého média pri izbovej teplote (s cieľom odstrániť všetku testovanú chemikáliu absorbovanú do tkaniva) na vopred určený čas, ktorý sa líši v závislosti od použitej VRM. Postexpozičná inkubácia v čerstvom médiu pri štandardných kultivačných podmienkach sa pred uskutočnením skúšky MTT používa len v prípade VMR1 [pozri dodatok 2, (34) (35)].

33. S testovanými chemikáliami, ktoré nemožno pipetovať pri teplote do 37 °C, sa v rámci VRM narába ako s tuhými látkami. Aplikované množstvo testovanej chemikálie má byť dostatočné na to, aby sa pokryl celý povrch tkaniva, t. j. má sa aplikovať minimálne 60 mg/cm^2 (dodatok 2). Ak je to možné, tuhé látky by sa mali vždy testovať vo forme jemného prášku. Tkanivá ošetrené pomocou tuhých testovaných chemikálií sa inkubujú pri štandardných kultivačných podmienkach počas vopred určeného času (v závislosti od použitej VRM) [pozri dodatok 2, (34) (35)]. Na konci expozičného času sa tuhá testovaná chemikália a kontrolné látky opatrne odstránia z povrchu tkaniva dôkladným opláchnutím pomocou DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} pri izbovej teplote. Po tomto opláchnutí nasleduje postexpozičné ponorenie do čerstvého média pri izbovej teplote (s cieľom odstrániť všetku testovanú chemikáliu absorbovanú do tkaniva) na vopred určený čas, ktorý sa líši v závislosti od použitej VRM, a postexpozičná inkubácia v čerstvom médiu pri štandardných kultivačných podmienkach pred uskutočnením skúšky MTT [pozri dodatok 2, (34) (35)].

34. Súčasťou každého testovacieho cyklu majú byť súbežné negatívne a pozitívne kontroly, aby sa preukázalo, že životaschopnosť (určená na základe negatívnej kontroly) a citlivosť (určená na základe pozitívnej kontroly) tkanív sú v rámci rozsahov prijateľnosti určených na základe historických údajov. Na základe súbežnej negatívnej kontroly sa získava aj základná hodnota (100 % životaschopnosť tkaniva) na výpočet relatívnej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkanív ošetrených testovanou chemikáliou (hodnota $\%Viability_{test}$). Látka pozitívnej kontroly odporúčaná na použitie s týmito VRM je čistý metylacetát (č. CAS 79-20-9, komerčne dostupný napr. od spoločnosti Sigma-Aldrich, kat. č. 45997; kvapalina). Odporúčanými látkami negatívnej kontroly sú v prípade VRM1 ultračistá H_2O a v prípade VRM2 DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}. Tieto kontrolné látky sa použili pri validačných štúdiách týchto VRM a existuje pre ne najviac historických údajov. Použitie vhodných alternatívnych látok pozitívnej a negatívnej kontroly je potrebné vedecky a zodpovedajúcim spôsobom odôvodniť. Negatívne a pozitívne kontroly sa majú testovať pomocou rovnakých protokolov, aké sa použili pri testovaných chemikáliách v rámci príslušného testovacieho cyklu (t. j. pre kvapaliny a/alebo tuhé látky). Po aplikácii má podľa potreby nasledovať expozícia s ošetrením, opláchnutie, postexpozičné ponorenie a postexpozičná inkubácia podľa opisu pre kontroly vykonávané súbežne s kvapalnými testovanými chemikáliami (pozri odsek 32) alebo pre kontroly vykonávané súbežne s tuhými testovanými chemikáliami (pozri odsek 33) pred uskutočnením skúšky MTT (pozri odsek 35) (34) (35). Pre všetky testované chemikálie s rovnakým skupenstvom (kvapaliny alebo tuhé látky), ktoré sú súčasťou rovnakého testovacieho cyklu, postačuje jedna samostatná množina negatívnych a pozitívnych kontrol.

Meranie životaschopnosti tkaniva

35. Skúška MTT je štandardizovaná kvantitatívna metóda (16), ktorá sa má používať na meranie životaschopnosti tkaniva v rámci tejto testovacej metódy. Je vhodná na použitie v trojrozmernom modeli tkaniva. Skúška MTT sa vykonáva bezprostredne po uplynutí postexpozičného inkubačného času. V rámci VRM sa vzorka modelu tkaniva umiestni do 0,3 ml roztoku MTT v koncentrácii 1 mg/ml na 180 ±15 minút pri štandardných kultivačných podmienkach. Životaschopné bunky modelu tkaniva RhCE redukujú vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT. Vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT sa potom extrahuje z tkaniva pomocou vhodného objemu izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla) (34) (35). Pri tkanivách testovaných s kvapalnými testovanými chemikáliami sa extrakcia uskutočňuje z vrchnej aj zo spodnej strany tkaniva, zatiaľ čo pri tkanivách testovaných s tuhými testovanými chemikáliami a farebnými kvapalinami sa extrakcia uskutočňuje len zo spodnej strany tkaniva (aby sa minimalizovala potenciálna kontaminácia extrakčného roztoku izopropanolu akoukoľvek testovanou chemikáliou, ktorá by mohla zostať v tkanive). Pri tkanivách testovaných s kvapalnými testovanými chemikáliami, ktoré nemožno jednoducho zmyť, sa extrakcia môže takisto uskutočňovať len zo spodnej strany tkaniva. So súbežne testovanými látkami negatívnej a pozitívnej kontroly sa zaobchádza podobne ako s testovanými chemikáliami. Extrahovaný formazán MTT možno kvantifikovať buď meraním absorbancie štandardu (OD) pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou filtra pásma priepustnosti s maximálnou odchýlkou ±30 nm alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (pozri odsek 42) (11) (36).

36. Optické vlastnosti testovanej chemikálie alebo jej chemický účinok na MTT môžu interferovať s meraním formazánu MTT, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti tkaniva. Testované chemikálie môžu interferovať s meraním formazánu MTT priamou redukciou MTT na modrý formazán MTT a/alebo farebnou interferenciou, ak pri testovaných chemikáliách prirodzene alebo v dôsledku postupov ošetrenia dochádza k absorpcii v rovnakom rozsahu OD ako pri formazáne MTT (t. j. približne 570 nm). Pred testovaním sa má uskutočniť predbežné overenie, aby bolo možné identifikovať možné priame redukčné činidlá MTT a/alebo chemikálie spôsobujúce farebnú interferenciu, pričom je potrebné použiť dodatočné kontroly s cieľom rozpoznať potenciálne interferencie spôsobené takýmito testovanými chemikáliami a skúšku vzhľadom na tieto interferencie korigovať (pozri odseky 37 – 41). Obzvlášť dôležité je to vtedy, keď sa špecifická testovaná chemikália opláchnutím úplne neodstráni z modelu tkaniva RhCE alebo keď prenikne do epitelu podobného rohovke a je tak prítomná v modeloch tkaniva RhCE počas vykonávania skúšky MTT. V prípade testovaných chemikálií, ktoré absorbujú svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT (prirodzene alebo po ošetrení) a pri ktorých nemožno použiť meranie absorbancie štandardu (OD) formazánu MTT v dôsledku príliš silnej interferencie, t. j. silnej absorpcie v rozsahu 570 ±30 nm, možno na meranie formazánu MTT použiť spektrofotometriu HPLC/UPLC (pozri odseky 41 a 42) (11) (36). V štandardných pracovných postupoch VRM (34) (35) sa nachádza podrobný opis detekcie priamej redukcie MTT a interferencií spôsobených farbivami, ako aj následnej korekcie skúšky. Ilustratívne vývojové diagramy poskytujúce usmernenie o tom, ako možno identifikovať a zohľadniť priame redukčné činidlá MTT a/alebo chemikálie spôsobujúce farebnú interferenciu pri VRM1 a VRM2, sa uvádzajú aj v dodatku III, resp. IV.

37. S cieľom identifikovať potenciálnu interferenciu spôsobenú testovanými chemikáliami, ktoré absorbujú svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT (prirodzene alebo po ošetrení), a prijať rozhodnutie o tom, či sú potrebné dodatočné kontroly, sa testovaná chemikália pridá do vody a/alebo izopropanolu a primeraný čas sa inkubuje pri izbovej teplote [pozri dodatok 2, (34) (35)]. Ak testovaná chemikália vo vode a/alebo izopropanole absorbuje dostatok svetla v rozsahu 570 ±20 nm v prípade VRM1 (pozri dodatok 3) alebo ak vznikne zafarbený roztok pri zmiešaní testovanej chemikálie s vodou v prípade VRM2 (pozri dodatok 4), predpokladá sa, že dochádza k interferencii testovanej chemikálie s meraním absorbancie štandardu (OD) formazánu MTT, a je potrebné uskutočniť ďalšie kontroly s farbivami alebo sa má prípadne použiť spektrofotometria HPLC/UPLC v prípade, že sa tieto kontroly nevyžadujú (pozri odseky 41 a 42 a dodatky III a IV) (34) (35). Pri meraní absorbancie štandardu (OD) sa každá testovaná chemikália spôsobujúca interferenciu aplikuje najmenej na dva životaschopné replikáty tkaniva, pri ktorých sa uskutoční celý postup testovania, ale počas kroku MTT inkubácie sa namiesto roztokom MTT inkubujú s médiom, aby sa získala kontrola s nešpecifickou farbou v živých tkanivách (kontrola NSC_{living}) (34) (35). Kontrolu NSC_{living} je potrebné uskutočniť súbežne s testovaním farebnej testovanej chemikálie a v prípade viacnásobného testovania je potrebné uskutočniť nezávislú kontrolu NSC_{living} pri každom uskutočnenom teste (v každom testovacom cykle) vzhľadom na inherentnú biologickú variabilitu živých tkanív. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii spôsobujúcej interferenciu a inkubovaných s roztokom MTT (tzn. hodnota $\%Viability_{test}$) mínus percentuálny podiel pri kontrole s nešpecifickou farbou získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii spôsobujúcej interferenciu a inkubovaných v médiu bez MTT, pričom táto kontrola sa uskutoční súbežne s korigovaným testom (tzn. hodnota $\% NSC_{living}$), t. j. skutočná životaschopnosť tkaniva = $[\%Viability_{test}] - [\%NSC_{living}]$.

38. S cieľom identifikovať priame redukčné činidlá MTT sa každá testovaná chemikália pridá do čerstvo pripraveného roztoku MTT. K roztoku MTT sa pridá primerané množstvo testovanej chemikálie a zmes sa približne 3 hodiny inkubuje v štandardných kultivačných podmienkach (pozri dodatky III a IV) (34) (35). Ak sa zmes MTT obsahujúca testovanú chemikáliu (alebo suspenzia v prípade nerozpustných testovaných chemikálií) sfarbí na modro/fialovo, predpokladá sa, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT, a je potrebné uskutočniť ďalšiu funkčnú kontrolu na neživotaschopných modeloch tkaniva RhCE, a to nezávisle od použitia merania absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometrie HPLC/UPLC. Pri tejto dodatočnej funkčnej kontrole sa využívajú usmrtené tkanivá, ktoré majú len zvyškovú metabolickú aktivitu, ale absorbujú a zadržiavajú testovanú chemikáliu podobne ako životaschopné tkanivá. Usmrtené tkanivá sa v prípade VRM1 pripravujú vystavením nízkej teplote („usmrtené zmrazením“). Usmrtené tkanivá sa v prípade VRM2 pripravujú predĺženou inkubáciou (napr. aspoň 24 ±1 h) vo vode a následným uložením pri nízkej teplote („usmrtené vodou“). Každá testovaná chemikália redukujúca MTT sa aplikuje najmenej na dva repliká ty usmrteného tkaniva, pri ktorých sa uskutoční celý postup testovania, aby sa získala kontrola s nešpecifickou redukciou MTT (kontrola NSMTT) (34) (35) Bez ohľadu na počet uskutočnených nezávislých testov/testovacích cyklov je dostatočná jedna kontrola NSMTT na testovanú chemikáliu. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených chemikálii redukujúcej MTT (tzn. hodnota $\%Viability_{test}$) mínus percentuálny podiel nešpecifickej redukcie MTT získaný z usmrtených tkanív vystavených tej istej chemikálii redukujúcej MTT, počítané vzhľadom na negatívnu kontrolu uskutočnenú súbežne s korigovaným testom (tzn. hodnota %NSMTT), t. j. skutočná životaschopnosť tkaniva = $[\%Viability_{test}] - [\%NSMTT]$.

39. V prípade testovaných chemikálií, pri ktorých sa zistilo, že vyvolávajú farebnú interferenciu (pozri odsek 37) aj priamu redukciu MTT (pozri odsek 38), sa bude pri vykonávaní merania absorbancie štandardu (OD) vyžadovať aj tretia množina kontrol popri kontrolách NSMTT a NSC_{living} opísaných v predchádzajúcich odsekoch. Platí to zvyčajne pri tmavo sfarbených testovaných chemikáliách, ktoré absorbujú svetlo v rozsahu 570 ±30 nm (napr. modré, fialové, čierne), pretože ich vlastná farba bráni posúdeniu ich schopnosti priamo redukovať MTT podľa opisu v odseku 38. Z toho dôvodu sa štandardne vyžaduje použitie kontrol NSMTT spolu s kontrolami NSC_{living}. Testované chemikálie, pre ktoré sa uskutočňujú kontroly NSMTT aj NSC_{living}, môžu byť absorbované a zadržiavané v živých aj usmrtených tkanivách. V tomto prípade preto kontrola NSMTT môže nielen umožniť korekciu vzhľadom na potenciálnu priamu redukciu MTT testovanou chemikáliou, ale aj vzhľadom na farebnú interferenciu, ku ktorej dochádza v dôsledku absorpcie a zadržiavania testovanej chemikálie v usmrtených tkanivách. Mohlo by to viesť k dvojitej korekcii vzhľadom na farebnú interferenciu, keďže pomocou kontrol NSC_{living} sa už umožňuje zohľadňovať farebnú interferenciu, ku ktorej dochádza v dôsledku absorpcie a zadržiavania testovanej chemikálie v usmrtených tkanivách. S cieľom predísť možnej dvojitej korekcii vzhľadom na farebnú interferenciu je potrebné uskutočniť tretiu kontrolu

s nešpecifickou farbou v usmrtených tkanivách (NSC_{killed}) (pozri dodatky III a IV) (34) (35). Pri tejto dodatočnej kontrole sa testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, pri ktorých sa uskutoční celý postup testovania, ale ktoré sa počas kroku MTT inkubácie namiesto roztokom MTT inkubujú s médiom. Bez ohľadu na počet uskutočnených nezávislých testov/testovacích cyklov je dostatočná jedna kontrola NSC_{killed} na testovanú chemikáliu, má sa však uskutočniť súbežne s kontrolou NSMTT a s rovnakou šaržou tkaniva. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii (tzn. hodnota $\%Viability_{test}$) mínus hodnota %NSMTT mínus hodnota $\%NSC_{living}$ plus percentuálny podiel kontroly s nešpecifickou farbou získaný z usmrtených tkanív vystavených testovanej chemikálii spôsobujúcej interferenciu a inkubovaných v médiu bez MTT, počítané vzhľadom na negatívnu kontrolu uskutočnenú súbežne s korigovaným testom (tzn. hodnota $\%NSC_{killed}$), t. j. skutočná životaschopnosť tkaniva = $[\%Viability_{test}] - [\%NSMTT] - [\%NSC_{living}] + [\%NSC_{killed}]$.

40. Je dôležité poznamenať, že nešpecifická redukcia MTT a nešpecifické farebné interferencie môžu zvýšiť OD (pri meraniach absorbancie štandardu) extraktu tkaniva nad rozsah linearity spektrofotometra a že nešpecifická redukcia MTT takisto môže pri extrakte tkaniva zvýšiť plochu píku formazánu MTT (pri meraniach pomocou spektrofotometrie HPLC/UPLC) nad rozsah linearity spektrofotometra. Vzhľadom na to je dôležité, aby každé laboratórium pred začatím testovania testovaných chemikálií na regulačné účely určilo rozsah linearity OD/plochy píku svojho spektrofotometra, napríklad s použitím formazánu MTT (č. CAS 57360-69-7), ktorý je komerčne dostupný napríklad od spoločnosti Sigma-Aldrich (kat. č. M2003).

41. Meranie absorbancie štandardu (OD) pomocou spektrofotometra je vhodné na posúdenie chemikálií priamo redukujúcich MTT a testovaných chemikálií spôsobujúcich farebnú interferenciu v prípade, že pozorovaná interferencia s meraním formazánu MTT nie je príliš silná (t. j. hodnoty OD extraktov tkanív získané pri použití testovanej chemikálie bez akejkoľvek korekcie vzhľadom na priamu redukciu MTT a/alebo farebnú interferenciu sa nachádzajú v lineárnom rozsahu spektrofotometra). V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú hodnoty %NSMTT a/alebo $\%NSC_{living} \geq 60\ \%$ (VRM1 a v prípade protokolu pre kvapaliny aj VRM2) alebo 50 % (VRM2 v prípade protokolu pre tuhé látky) negatívnej kontroly, je potrebné k výsledkom pristupovať obozretne, keďže je to stanovená hraničná hodnota, ktorá sa v rámci VRM používa na rozlišovanie medzi klasifikovanými a neklasifikovanými chemikáliami (pozri odsek 44). Meranie absorbancie štandardu (OD) však nie je možné v prípade príliš silnej interferencie s meraním formazánu MTT (t. j. takej, ktorá vedie k tomu, že nekorigované hodnoty OD extraktov testovaných tkanív sa nachádzajú mimo lineárneho rozsahu spektrofotometra). Farebné testované chemikálie alebo testované chemikálie, ktoré sa sfarbia pri kontakte s vodou alebo izopropanolom, pri ktorých dochádza k príliš silnej interferencii s meraním absorbancie štandardu (OD) formazánu MTT, je možné napriek tomu posúdiť pomocou spektrofotometrie HPLC/UPLC (pozri dodatky III a IV). Dôvodom je, že systém HPLC/UPLC umožňuje separáciu formazánu MTT od chemikálie pred jej kvantifikáciou (36). Preto sa pri použití HPLC/UPLC spektrofotometrie nikdy nevyžadujú kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to bez ohľadu na testovanú chemikáliu. Kontroly NSMTT sa však majú použiť, ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT (podľa postupu opísaného v odseku 38). Kontroly NSMTT sa majú použiť aj v prípade testovaných chemikálií, ktoré majú farbu (vlastnú alebo objavujúcu sa pri kontakte s vodou), ktorá bráni posúdeniu ich schopnosti priamo redukovať MTT podľa opisu v odseku 38. Pri použití HPLC/UPLC spektrofotometrie na meranie formazánu MTT sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným zo súbežnej negatívnej kontroly. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú schopné priamo redukovať MTT, sa skutočná životaschopnosť tkaniva vypočíta takto: hodnota $\%Viability_{test}$ mínus hodnota %NSMTT podľa opisu v poslednej vete odseku 38. Na záver je potrebné poznamenať, že pomocou testovacích metód RhCE nemožno posudzovať priame redukčné činidlá MTT ani priame redukčné činidlá MTT spôsobujúce zároveň farebnú interferenciu, ktoré sú po ošetrení zadržiavané v tkanivách a redukujú MTT natoľko výrazne, že sa hodnoty OD (pomocou štandardného merania OD) alebo plochy píku (pomocou UPLC/HPLC spektrofotometrie) testovaných extraktov tkaniva nachádzajú v dôsledku toho mimo rozsahu linearity spektrofotometra. Očakáva sa však, že k tomu dôjde len vo veľmi zriedkavých situáciách.

42. Na meranie formazánu MTT možno HPLC/UPLC spektrofotometriu použiť pri všetkých typoch testovaných chemikálií (zafarbené, nezafarbené, pôsobiace aj nepôsobiace ako reduktanty MTT) (11) (36). Vzhľadom na rôznorodosť systémov HPLC/UPLC spektrofotometrie nie je možné, aby každý používateľ vytvoril presne rovnaké systémové podmienky. Je preto potrebné preukázať kvalifikáciu systému HPLC/UPLC spektrofotometrie pred jeho použitím na kvantifikovanie formazánu MTT z extraktov tkaniva, a to splnením kritérií prijateľnosti pre množinu štandardných kvalifikačných parametrov na základe parametrov opísaných v usmernení Amerického úradu pre potraviny a lieky o validácii bioanalytických metód pre príslušné odvetvie (36) (38). Tieto kľúčové parametre a kritériá prijateľnosti sú uvedené v dodatku 5. Po splnení kritérií prijateľnosti uvedených v dodatku 5 sa systém HPLC/UPLC spektrofotometrie považuje za vyhovujúci a pripravený na meranie formazánu MTT za pokusných podmienok opísaných v tejto testovacej metóde.

Kritériá prijateľnosti

43. Pri každom testovacom cykle s využitím šarží tkaniva RhCE, ktoré vyhovujú kontrole kvality (pozri odsek 30), by tkanivá ošetrené látkou negatívnej kontroly mali vykazovať optickú hustotu (OD), ktorá odráža kvalitu tkanív po krokoch zaslania a prijatia a po všetkých procesoch protokolu a ktorá by nemala byť mimo historicky stanovených hraníc opísaných v tabuľke 2 (pozri odsek 26). Podobne by tkanivá ošetrené látkou pozitívnej kontroly, napr. metylacetátom, mali vykazovať strednú životaschopnosť tkaniva < 50 % vzhľadom na negatívnu kontrolu v rámci VRM1 pri protokole pre kvapaliny alebo tuhé látky a ≤ 30 % (protokol pre kvapaliny) alebo ≤ 20 % (protokol pre tuhé látky) vzhľadom na negatívnu kontrolu v rámci VRM2, čo vyjadruje schopnosť tkanív reagovať na dráždivú testovanú chemikáliu v podmienkach tejto testovacej metódy (34) (35). Variabilita medzi tkanivovými replikátmi testovaných chemikálií a kontrolných látok by mala byť v rámci uznaných limitov [t. j. rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 % alebo štandardná odchýlka (SD) medzi tromi replikátmi tkaniva nemá prekročiť 18 %]. Ak je negatívna kontrola alebo pozitívna kontrola v rámci testovacieho cyklu mimo uznaných rozsahov, pokus sa považuje za nevyhovujúci a je potrebné ho zopakovať. Ak je variabilita medzi tkanivovými replikátmi testovanej chemikálie mimo uznaného rozsahu, test sa musí považovať za nevyhovujúci a testovanú chemikáliu je potrebné testovať znova.

Interpretácia výsledkov a prognostický model

44. Hodnoty OD/plochy píku získané pomocou replikovaných extraktov tkaniva pre každú testovanú chemikáliu sa použijú na výpočet strednej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva (stredná hodnota medzi replikátmi tkaniva) normalizovanej podľa negatívnej kontroly, ktorá je stanovená na 100 %. Hraničné percentuálne hodnoty životaschopnosti tkaniva na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN a CLP), sa uvádzajú v tabuľke 4. Výsledky sa interpretujú takto:

— Testovaná chemikália sa považuje za chemikáliu, ktorá si nevyžaduje klasifikáciu a označovanie podľa GHS OSN a CLP („bez kategórie“), ak stredná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva po expozícii a postexpozičnej inkubácii je vyššia ako (>) stanovená hraničná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva, ako sa uvádza v tabuľke 4. V tomto prípade sa nevyžaduje ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód.

— Ak stredná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva po expozícii a postexpozičnej inkubácii je nižšia alebo rovnaká ako (≤) stanovená hraničná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva, predpoklad nie je možný, ako sa uvádza v tabuľke 4. V tomto prípade sa vyžaduje ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód, pretože testovacie metódy RhCE vykazujú určitý počet falošne pozitívnych výsledkov (pozri odseky 14 – 15) a neumožňujú rozlišovať medzi kategóriou 1 a 2 podľa GHS OSN a CLP (pozri odsek 17).

Tabuľka 4

Prognostické modely podľa klasifikácie GHS OSN a CLP

VRM	„Bez kategórie“	Predpoklad nie je možný
VRM1 – EpiOcular™ EIT (pre oba protokoly)	stredná životaschopnosť tkaniva > 60 %	stredná životaschopnosť tkaniva ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pre protokol pre kvapaliny)	stredná životaschopnosť tkaniva > 60 %	stredná životaschopnosť tkaniva ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pre protokol pre tuhé látky)	stredná životaschopnosť tkaniva > 50 %	stredná životaschopnosť tkaniva ≤ 50 %

45. V prípade testovanej chemikálie s jednoznačným výsledkom by mal byť postačujúci jeden test, ktorý zahŕňa použitie aspoň dvoch replikátov tkaniva. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replikátov a/alebo ak sa stredná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva rovná 60 ±5 % (VRM1 a v prípade protokolu pre kvapaliny aj VRM2) alebo 50 ±5 % (VRM2 v prípade protokolu pre tuhé látky), však treba zvážiť vykonanie druhého testu, ako aj tretieho testu, ak sa výsledky z prvých dvoch testov nezhodujú.

46. Vo vhodných a v odôvodnených prípadoch možno pre špecifické typy zmesí zvážiť odlišné hraničné percentuálne hodnoty životaschopnosti tkaniva, na základe ktorých sa rozlišuje medzi klasifikovanými a neklasifikovanými testovanými chemikáliami, aby sa zvýšila celková výkonnosť tejto testovacej metódy pri týchto typoch zmesí (pozri odsek 14). Referenčné chemikálie môžu byť užitočné na posudzovanie potenciálu neznámych testovaných chemikálií alebo triedy výrobkov spôsobiť vážne poškodenie očí/podráždenie očí, alebo na posudzovanie potenciálu relatívnej toxicity pre oči v prípade klasifikovanej chemikálie v rámci špecifického rozsahu kladných reakcií.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

47. Údaje z jednotlivých replikovaných tkanív v testovacom cykle (napr. hodnoty OD/plochy píku formazánu MTT a vypočítané údaje o percentuálnych hodnotách životaschopnosti tkaniva pre testovanú chemikáliu a kontroly, ako aj konečný predpoklad na základe testovacej metódy RhCE) je potrebné zaznamenať do tabuľky pre každú testovanú chemikáliu, podľa potreby vrátane údajov z opakovaných testov. Okrem toho je potrebné uviesť strednú percentuálnu hodnotu životaschopnosti tkaniva a rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva (ak n = 2 replikované tkanivá) alebo SD (ak n ≥ 3 replikované tkanivá) pre každú jednotlivú testovanú chemikáliu a kontrolu. Pre každú testovanú chemikáliu je potrebné uviesť akékoľvek pozorované interferencie testovanej chemikálie s meraním formazánu MTT v dôsledku priamej redukcie MTT a/alebo farebnej interferencie.

Správa o teste

48. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, registračné čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— skupenstvo, prchavosť, pH, koeficient LogP, molekulová hmotnosť, chemická trieda a v dostupnom rozsahu ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— skupenstvo a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu.

Látky pozitívnej a negatívnej kontroly

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, registračné čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— skupenstvo, prchavosť, molekulová hmotnosť, chemická trieda a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie použitia odlišnej negatívnej kontroly než ultračistej H_2O alebo DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}, ak sa uplatňuje,

— odôvodnenie použitia odlišnej pozitívnej kontroly než čistého metylacetátu, ak sa uplatňuje,

— odkaz na historické výsledky pre pozitívne a negatívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie.

— *Model tkaniva RhCE a použitý protokol (podľa potreby poskytujúci odôvodnenie rozhodnutí)*

Podmienky testovacej metódy

— použitý model tkaniva RhCE vrátane čísla šarže,

— vlnová dĺžka a pásmový priepust (ak sa uplatňuje) používané pri kvantifikácii formazánu MTT a rozsah linearity meracieho zariadenia (napr. spektrofotometra),

— opis metódy použitej na kvantifikáciu formazánu MTT,

— opis použitého systému HPLC/UPLC spektrofotometrie, ak sa uplatňuje,

— úplné podporné údaje o použitom modeli tkaniva RhCE vrátane jeho výkonnosti. Údaje by mali predovšetkým zahŕňať:

  i) kontrolu kvality z hľadiska životaschopnosti (dodávateľ);

  ii) životaschopnosť v podmienkach testovacej metódy (používateľ);

  iii) kontrolu kvality bariérovej funkcie;

  iv) morfológiu, ak je k dispozícii;

  v) reprodukovateľnosť a schopnosť stanoviť predpoklad;

  vi) ďalšie kontroly kvality (QC) modelu tkaniva RhCE, ak sú dostupné;

— odkaz na historické údaje o modeli tkaniva RhCE; Údaje by mali predovšetkým zahŕňať: prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach,

— vyhlásenie o tom, že testovacie zariadenie preukázalo spôsobilosť pri používaní testovacej metódy pred začatím bežného používania otestovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti.

Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu a testu

— stredné hodnoty a rozsahy prijateľnosti pozitívnych a negatívnych kontrol na základe historických údajov,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva pre pozitívne a negatívne kontroly,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva pre testovanú chemikáliu.

Testovací postup

— podrobné informácie o použitom testovacom postupe,

— použité dávky testovanej chemikálie a kontrolných látok,

— trvanie a teplota počas doby expozície, postexpozičného ponorenia a postexpozičnej inkubácie (podľa potreby),

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— uvedenie kontrol použitých pre priame redukčné činidlá MTT a/alebo zafarbené testované chemikálie, ak je to možné,

— počet použitých replikátov tkaniva na každú testovanú chemikáliu a kontroly (pozitívna kontrola, negatívna kontrola, NSMTT, NSC_{living} a NSC_{killed}, ak sa uplatňujú).

Výsledky

— tabuľky s údajmi z jednotlivých testovaných chemikálií a kontrolných látok pre každý testovací cyklus (v relevantných prípadoch vrátane opakovaných pokusov) a každé meranie replikátu vrátane hodnoty OD alebo plochy píku formazánu MTT, percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva, strednej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva, rozdielu medzi replikátmi tkaniva alebo SD a konečného predpokladu,

— ak je to možné, výsledky kontrol použitých v prípade chemikálií priamo redukujúcich MTT a/alebo zafarbených testovaných chemikálií vrátane hodnoty OD alebo plochy píku formazánu MTT, hodnôt %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, rozdielu medzi replikátmi tkaniva alebo SD, konečnej správnej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva a konečného predpokladu,

— výsledky získané na základe testovaných chemikálií a kontrolných látok vzhľadom na určené kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu a testu,

— opis ďalších pozorovaných účinkov, napr. zafarbenia tkanív farebnou testovanou chemikáliou.

Diskusia o výsledkoch

Záver

LITERATÚRA

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitola B.5 tejto prílohy, Akútne podráždenie/poleptanie oka.

(3) Kapitola B.47 tejto prílohy, Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí

(4) Kapitola B.48 tejto prílohy, Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu.

(5) Kapitola B.61 tejto prílohy, Testovacia metóda úniku fluoresceínu na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok.

(6) Kapitola B.68 tejto prílohy, Testovacia metóda krátkodobej expozície *in vitro* na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. K dispozícii na adrese: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. K dispozícii na adrese: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. K dispozícii na adrese: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

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

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, s. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, s. 749-815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, s. 665-697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. K dispozícii na adrese: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. K dispozícii na adrese: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

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

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (18).

Referenčná chemikália: chemikália, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou chemikáliou. Referenčná chemikália by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentné a spoľahlivé zdroje na identifikáciu a charakterizáciu; ii) štruktúrnu, funkčnú a/alebo chemickú podobnosť alebo podobnosť z hľadiska triedy výrobku s chemikáliami, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej reakcie.

Prístup zdola nahor: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že si nevyžaduje klasifikáciu a označovanie ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií nevyžadujúcich klasifikáciu a označovanie (negatívny výsledok) od ostatných chemikálií (pozitívny výsledok).

Chemikália: látka alebo zmes.

Zhoda: Pozri „presnosť“.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

CV: variačný koeficient.

Dev: odchýlka.

EIT: test očnej dráždivosti.

EURL ECVAM: referenčné laboratórium Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách.

Podráždenie očí: vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne vratné. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „vratné účinky na oči“ a kategóriou 2 podľa GHS OSN/CLP.

ET_{50}: expozičný čas potrebný na zníženie životaschopnosti tkaniva o 50 % pri použití referenčnej chemikálie v špecifickej pevne určenej koncentrácii.

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

HCE: epitel ľudskej rohovky SkinEthic™.

HPLC: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

IC_{50}: koncentrácia, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % po pevne stanovenom expozičnom čase (napr. po 30-minútovom ošetrení pomocou SDS).

Nekonečná dávka: množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na model tkaniva RhCE, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu epitelu.

Nevratné účinky na oči: pozri „vážne poškodenie očí".

LLOQ: dolný limit kvantifikácie.

LogP: logaritmus rozdeľovacieho koeficientu oktanol/voda.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

MTT: 2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid, tiazolylová modrá tetrazólium-bromid.

Negatívna kontrola: vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a ošetrená látkou, ktorá je známa tým, že nevyvoláva pozitívnu reakciu v testovacom systéme. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou, ako aj inými kontrolnými vzorkami a slúži na určenie 100 % životaschopnosti tkaniva.

Neklasifikované: chemikálie neklasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí (kategória 2 podľa GHS OSN/CLP, kategória 2A alebo 2B podľa GHS OSN) alebo vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP). Pojem možno použiť zameniteľne s označením „bez kategórie" podľa GHS OSN/CLP.

NSC_{killed}: nešpecifická farba v usmrtených tkanivách.

NSC_{living}: nešpecifická farba v živých tkanivách.

NSMTT: nešpecifická redukcia MTT.

OD: optická hustota.

Výkonnostné normy: normy založené na validovanej testovacej metóde, ktorá sa považovala za vedecky platnú, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (18).

Pozitívna kontrola: vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a ošetrená látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu v testovacom systéme. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou a inými kontrolnými vzorkami. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, rozsah pozitívnej reakcie by nemal byť nadmerný.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (18).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (18).

Náhradný test: test navrhnutý ako náhrada za test, ktorý sa bežne používa, ktorý je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zvýšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testované situácie a chemikálie (18).

Reprodukovateľnosť: zhoda výsledkov získaných opakovaným testovaním tej istej testovanej chemikálie s použitím toho istého testovacieho protokolu (pozri „spoľahlivosť“) (18).

Vratné účinky na oči: pozri „podráždenie očí“.

RhCE: rekonštruovaný epitel podobný ľudskej rohovke.

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s negatívnou kontrolou a s pozitívnou kontrolou.

SD: štandardná odchýlka.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (18).

Vážne poškodenie očí: poškodenie očného tkaniva alebo veľmi výrazné zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po aplikácii. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmami „nevratné účinky na oči“ a „kategória 1 podľa GHS OSN/CLP“.

Štandardné operačné postupy (SOP): formálne písomné postupy, ktoré podrobne opisujú, ako sa vykonávajú konkrétne laboratórne operácie – bežné aj špecifické pre príslušný test. Vyžadujú sa v rámci správnej laboratórnej praxe.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (18).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Test: jedna testovaná chemikália, ktorá sa súbežne testuje najmenej v dvoch replikátoch tkaniva, ako sa vymedzuje v príslušných SOP.

Životaschopnosť tkaniva: parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie v rekonštruovanom tkanive z hľadiska schopnosti buniek redukovať vitálne farbivo MTT, ktorý v závislosti od meraného sledovaného parametra a od použitej koncepcie testu zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Prístup zhora nadol: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (pozitívny výsledok) od ostatných chemikálií (negatívny výsledok).

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa testovacie metódy používajú postupne. Všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii sa kontrolujú na jednotlivých úrovniach analýzou váhy dôkazov, pričom sa pred prechodom na ďalšiu úroveň v rámci stratégie zisťuje, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti. Ak potenciál nebezpečnosti/potenciu testovanej chemikálie možno stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie (18).

ULOQ: horný limit kvantifikácie.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

Kategória 1 podľa GHS OSN a CLP: pozri „vážne poškodenie očí“.

Kategória 2 podľa GHS OSN a CLP: pozri „podráždenie očí“.

„Bez kategórie“ podľa GHS OSN a CLP: chemikálie, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu v kategórii 1 alebo 2 podľa GHS OSN/CLP (prípadne v kategórii 2A alebo 2B podľa GHS OSN). Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „neklasifikované“.

UPLC: ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

UVCB:: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platná testovacia metóda: testovacia metóda, ktorá sa na daný účel považuje za dostatočne relevantnú a spoľahlivú a ktorá je založená na vedecky podložených zásadách. Testovacia metóda nie je nikdy platná v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (18).

Validovaná testovacia metóda: testovacia metóda, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (18).

VRM: validovaná referenčná metóda.

VRM1: test EpiOcular™ EIT sa označuje ako validovaná referenčná metóda 1.

VRM2: test SkinEthic™ HCE EIT sa označuje ako validovaná referenčná metóda 2.

Analýza váhy dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podloženie záveru, pokiaľ ide o potenciál nebezpečnosti testovanej látky.

Dodatok 2

HLAVNÉ TESTOVACIE ZLOŽKY TESTOV RHCE VALIDOVANÝCH NA IDENTIFIKÁCIU CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU A OZNAČOVANIE AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoly	Kvapaliny (umožňujúce pipetovanie pri teplote 37 ±1 °C alebo nižšej počas 15 minút)	Tuhé látky (neumožňujúce pipetovanie)	Kvapaliny a viskózne látky (umožňujúce pipetovanie)	Tuhé látky (neumožňujúce pipetovanie)
Povrch modelu	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Počet replikátov tkaniva	najmenej 2	najmenej 2	najmenej 2	najmenej 2
Predbežné overenie výskytu farebnej interferencie	50 µl + 1 ml H_2O na 60 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % (bezfarebné testované chemikálie) alebo 50 µl + 2 ml izopropanolu na 2 – 3 h pri izbovej teplote (farebné testované chemikálie) → Ak je OD testovanej chemikálie pri vlnovej dĺžke 570 ±20 nm po odpočítaní OD izopropanolu alebo vody > 0,08 (čo zodpovedá približne 5 % strednej hodnoty OD negatívnej kontroly), je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.	50 mg + 1 ml H_2O na 60 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % (bezfarebné testované chemikálie) a/alebo 50 mg + 2 ml izopropanolu na 2 – 3 h pri izbovej teplote (farebné a bezfarebné testované chemikálie) → Ak je OD testovanej chemikálie pri vlnovej dĺžke 570 ±20 nm po odpočítaní OD izopropanolu alebo vody > 0,08 (čo zodpovedá približne 5 % strednej hodnoty OD negatívnej kontroly), je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.	10 µl + 90 µl H_2O s miešaním počas 30 ±2 min. pri izbovej teplote (18 – 28 °C) → Ak je testovaná chemikália farebná, je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.	10 mg + 90 µl H_2O s miešaním počas 30 ±2 min. pri izbovej teplote → Ak je testovaná chemikália farebná, je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Predbežné overenie priamej redukcie MTT	50 µl + 1 ml roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením (ako negatívna kontrola sa používa 50 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)	50 mg + 1 ml roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením (ako negatívna kontrola sa používa 50 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)	30 µl + 300 µl roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené vo vode (ako negatívna kontrola sa používa 30 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)	30 mg + 300 µl roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené vo vode (ako negatívna kontrola sa používa 30 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)
Predpríprava	20 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} počas 30 ±2 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %, chránené pred svetlom.	20 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} počas 30 ±2 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %, chránené pred svetlom.	—	—
Dávky pri ošetrení a aplikácia	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) pomocou kalibrovaného nástroja (napr. zarovnanej lyžičky kalibrovanej tak, aby obsahovala 50 mg chloridu sodného).	10 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ±2 µl (60 µl/cm^2) V prípade viskóznych látok použite nylonové sitko	30 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ±2 mg (60 mg/cm^2)
Expozičný čas a teplota	30 min. (±2 min.) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	6 hodín (±0,25 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	30 min. (±2 min.) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	4 hodiny (±0,1 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %

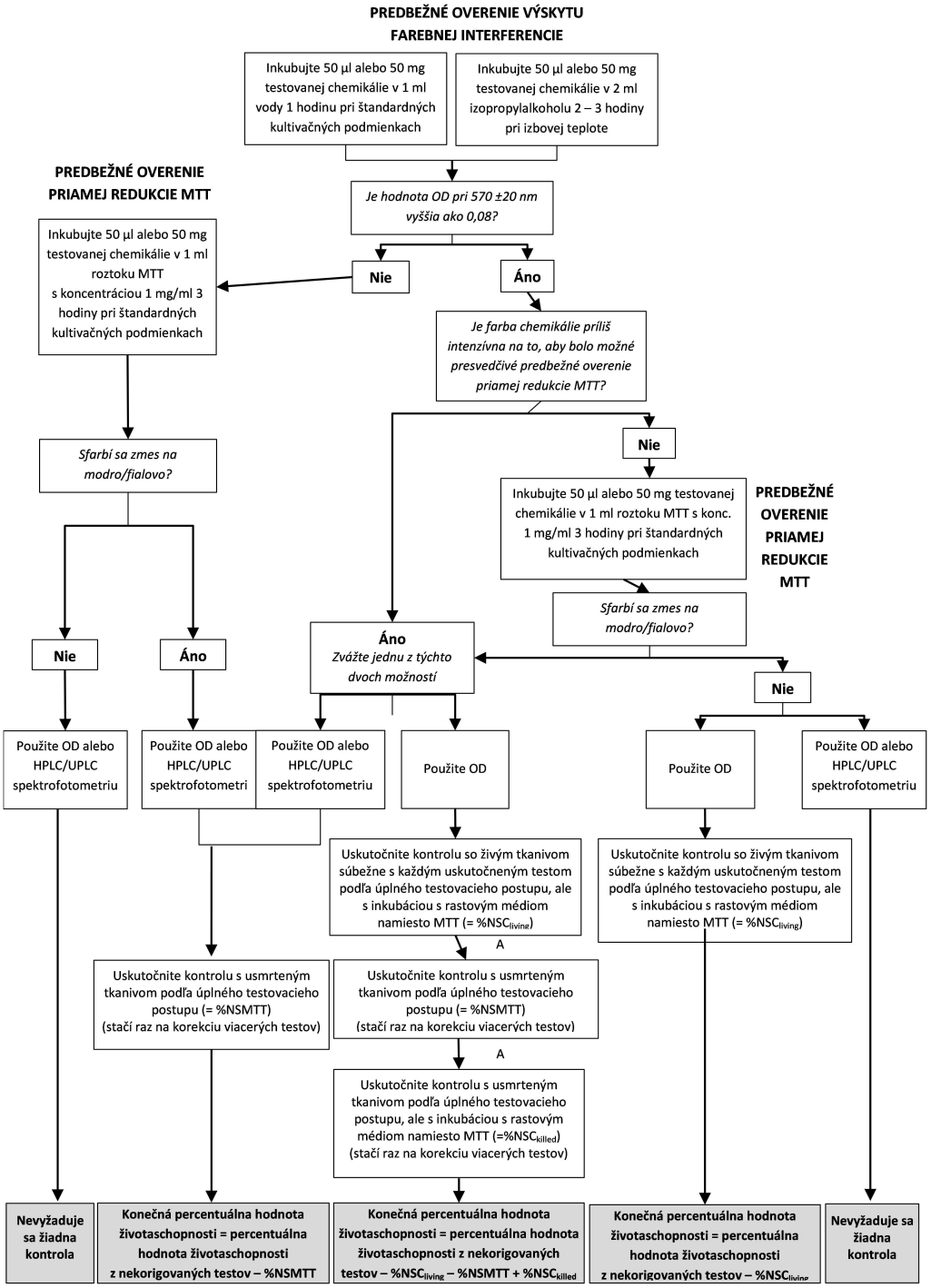
Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Preplachovanie pri izbovej teplote	Trikrát v 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	Trikrát v 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Postexpozičné ponorenie	12 min. (±2 min.) pri izbovej teplote v kultivačnom médiu	25 min. (±2 min.) pri izbovej teplote v kultivačnom médiu	30 min. (±2 min.) pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relatívnej vlhkosti v kultivačnom médiu	30 min. (±2 min.) pri izbovej teplote v kultivačnom médiu
Postexpozičná inkubácia	120 min. (±15 min.) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	18 h (±0,25 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	žiadna	18 h (±0,5 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %
Negatívna kontrola	50 µl H_2O Testované súbežne	50 µl H_2O Testované súbežne	30 ±2 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Testované súbežne	30 ±2 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Testované súbežne
Pozitívna kontrola	50 µl metylacetátu Testované súbežne	50 µl metylacetátu Testované súbežne	30 ±2 µl metylacetátu Testované súbežne	30 ±2 µl metylacetátu Testované súbežne

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Roztok MTT	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml
Inkubačný čas a teplota pri použití MTT	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %
Extrakčné rozpúšťadlo	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti prepichnutím tkaniva)	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti prepichnutím tkaniva)	1,5 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)	1,5 ml izopropanolu (extrakcia zo spodnej vloženej časti)
Čas extrakcie a teplota	2 – 3 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote alebo do ďalšieho dňa pri teplote 4 – 10 °C	2 – 3 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote alebo do ďalšieho dňa pri teplote 4 – 10 °C	4 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote alebo najmenej do ďalšieho dňa bez pretrepávania pri teplote 4 – 10 °C	Najmenej 2 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote
Určenie hodnoty OD	570 nm (550 – 590 nm) bez referenčného filtra	570 nm (550 – 590 nm) bez referenčného filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez referenčného filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez referenčného filtra
Kontrola kvality tkaniva	Ošetrenie pomocou 100 µl látky Triton X-100 s koncentráciou 0,3 obj. % 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	Ošetrenie pomocou 100 µl látky Triton X-100 s koncentráciou 0,3 obj. % 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	30-minútové ošetrenie pomocou SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30-minútové ošetrenie pomocou SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kritériá prijateľnosti	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 0,8 a < 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 30 minút pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť < 50 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 0,8 a < 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 6 hodín pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť < 50 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 30 minút pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť ≤ 30 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 4 hodiny pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť ≤ 20 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.

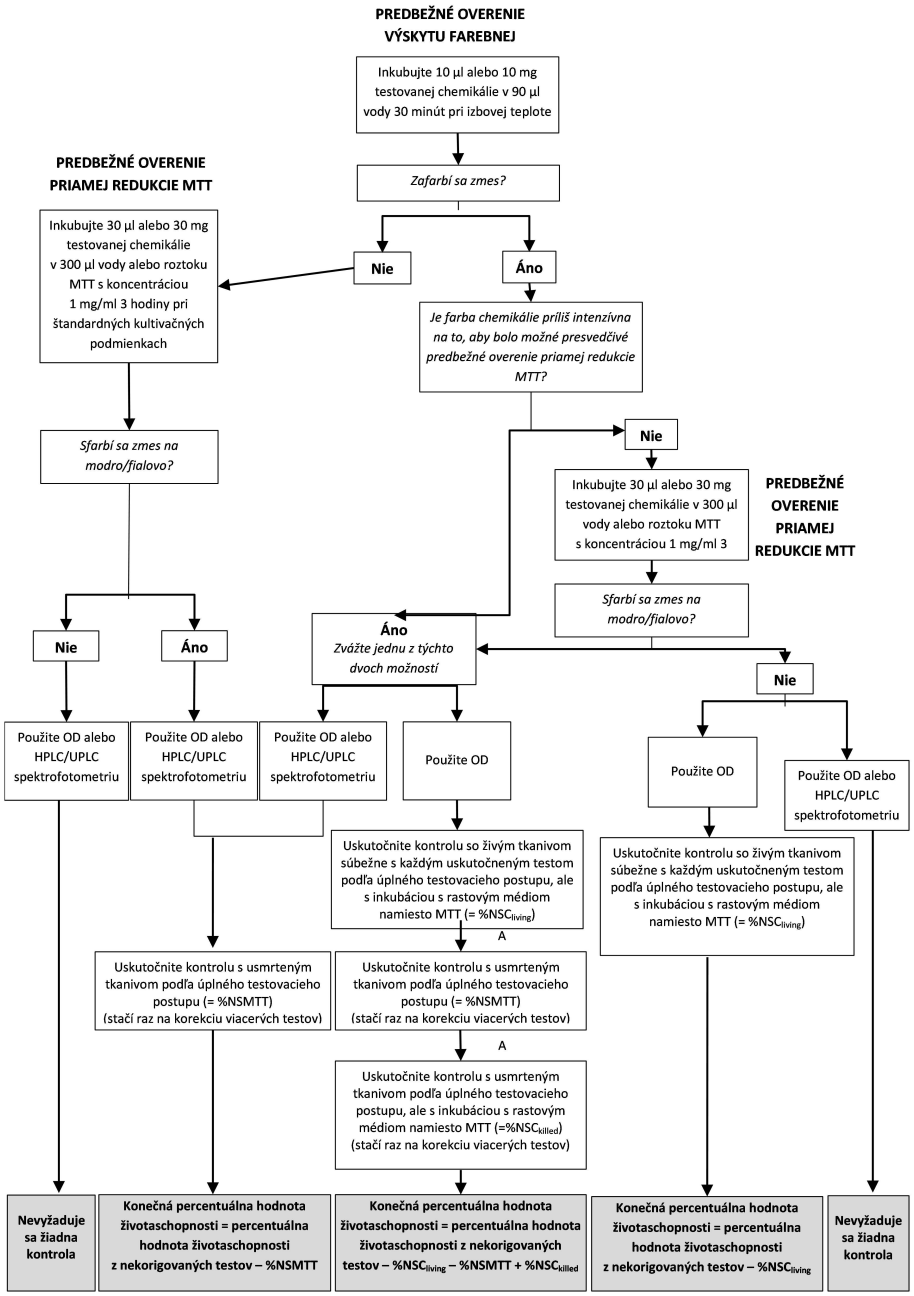
Dodatok 3

ILUSTRATÍVNE VÝVOJOVÉ DIAGRAMY POSKYTUJÚCE USMERNENIE O TOM, AKO IDENTIFIKOVAŤ A ZOHĽADNIŤ PRIAME REDUKČNÉ ČINIDLÁ MTT A/ALEBO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE FAREBNÚ INTERFERENCIU NA ZÁKLADE ŠTANDARDNÝCH OPERAČNÝCH POSTUPOV PRE VRM1



Dodatok 4

ILUSTRATÍVNE VÝVOJOVÉ DIAGRAMY POSKYTUJÚCE USMERNENIE O TOM, AKO IDENTIFIKOVAŤ A ZOHĽADNIŤ PRIAME REDUKČNÉ ČINIDLÁ MTT A/ALEBO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE FAREBNÚ INTERFERENCIU NA ZÁKLADE ŠTANDARDNÝCH OPERAČNÝCH POSTUPOV PRE VRM2



Dodatok 5

KĽÚČOVÉ PARAMETRE A KRITÉRIÁ PRIJATEĽNOSTI NA KVALIFIKÁCIU SYSTÉMU HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIE NA MERANIE FORMAZÁNU MTT ZÍSKANÉHO Z MODELOV TKANIVA RHCE

Parameter	Protokol odvodený z usmernenia FDA (36) (38)	Kritériá prijateľnosti
Selektívnosť	Analýza izopropanolu, living blank (izopropanolový extrakt zo živých modelov tkanív RhCE bez ošetrenia), dead blank (izopropanolový extrakt z usmrtených modelov tkanív RhCE bez ošetrenia) a farbiva (napr. metylénová modrá)	Plocha interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % plochy LLOQ ($Area_{LLOQ}$) ([1])
Exaktnosť	Kontroly kvality (t. j. formazán MTT v objeme 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v izopropanole (n = 5)	CV ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Presnosť	Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	% Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Matricový efekt	Kontroly kvality v living blank (n = 5)	85 % ≤ % matricového efektu ≤ 115 %
Prenos	Analýza izopropanolu podľa normy ULOQ ([2])	Plocha interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % plochy LLOQ ($Area_{LLOQ}$)
Reprodukovateľnosť (v priebehu dňa)	3 nezávislé kalibračné krivky (na základe 6 po sebe nasledujúcich riedení formazánu MTT v izopropanole v pomere 1:3, začínajúc pri ULOQ, t. j. 200 µg/ml); Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	Kalibračné krivky: % Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ Kontroly kvality: % Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovateľnosť (v priebehu dní)	Deň 1: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 2: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 3: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhCE	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanej v deň prípravy a po 24 hodinách skladovania pri izbovej teplote	% Dev ≤ 15 %
Dlhodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhCE, ak je to potrebné	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanej v deň prípravy a po niekoľkých dňoch skladovania pri teplote −20 °C	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: dolný limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby zahŕňal 1 – 2 % životaschopnosť tkaniva, t. j. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: horný limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby bol najmenej dvojnásobne vyšší než najvyššia očakávaná koncentrácia formazánu MTT v extraktoch izopropanolu z negatívnych kontrol (~70 µg/ml pri VRM), t. j. 200 µg/ml.

B.70 **SKÚŠKY *IN VITRO* S VYUŽITÍM ĽUDSKÉHO REKOMBINANTNÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA (hrER) NA ZISŤOVANIE CHEMIKÁLIÍ S AFINITOU K ESTROGÉNOVÉMU RECEPTORU**

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Usmernenia OECD na vykonávanie testov výkonnosti

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 493 (2015). TG 493 je usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti (PBTG), v ktorom sa opisuje metodika ľudských rekombinantných skúšok *in vitro* na zisťovanie látok s afinitou k estrogénovému receptoru (skúšky väzby na hrER). Obsahuje dve mechanicky a funkčne podobné skúšky na identifikáciu látok vytvárajúcich väzbu na estrogénový receptor (t. j. ERα) a malo by uľahčiť vývoj nových podobných alebo modifikovaných skúšok v súlade so zásadami validácie stanovenými v usmerňovacom dokumente OECD o validácii a medzinárodnom uznávaní nových a aktualizovaných testovacích metód na posúdenie nebezpečnosti (1). Plne validované referenčné testovacie metódy (dodatok 2 a dodatok 3), ktoré poskytujú základ pre toto PBTG, sú:

— Freybergerova-Wilsonova (FW) skúška *in vitro* väzby na estrogénový receptor (ER) pomocou úplného ľudského rekombinantného ERα (2) a

— skúška *in vitro* väzby na estrogénový receptor (ER) organizácie CERI (Chemicals Evaluation and Research Institute) pomocou ľudskej rekombinantnej bielkoviny s doménou viažucou ligand (2).

K dispozícii sú výkonnostné normy (PS) (3) s cieľom uľahčiť vývoj a validáciu podobných testovacích metód pre rovnaký sledovaný parameter nebezpečnosti, ktoré umožňujú včasnú zmenu PBTG 493 tak, aby bolo možné k aktualizovanému PBTG pridať nové podobné skúšky. Podobné testovacie skúšky sa však pridajú až po preskúmaní a súhlase zo strany OECD, že sú splnené výkonnostné normy. Skúšky zahrnuté do TG 493 môžu byť použité bez rozdielu na riešenie požiadaviek členských štátov OECD týkajúcich sa výsledkov testov v súvislosti s väzbou na estrogénový receptor, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

Súvislosti a zásady skúšok zahrnutých do tejto testovacej metódy

2. OECD v roku 1998 začala činnosť s vysokou prioritou s cieľom vykonať revíziu existujúcich usmernení a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie potenciálnych endokrinných disruptorov bol revidovaný v roku 2012. Pôvodné a revidované koncepčné rámce sú zahrnuté ako prílohy k usmerňovaciemu dokumentu o štandardizovaných usmerneniach na vykonávanie testov na hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov (4). Koncepčný rámec tvorí päť úrovní, každá úroveň zodpovedá odlišnej úrovni biologickej zložitosti. Skúšky väzby na ER opísané v tejto testovacej metóde predstavujú úroveň 2, čo zahŕňa *„skúšky in vitro poskytujúce údaje o vybraných endokrinných mechanizmoch/dráhach“*. Táto testovacia metóda je určená pre receptorové testy *in vitro* s cieľom identifikovať ligandy pre ľudský estrogénový receptor alfa (ERα).

3. Relevantnosť skúšky väzby na ER *in vitro* vzhľadom na biologické funkcie bola jednoznačne preukázaná. Skúšky väzby na ER sú určené na identifikovanie chemikálií, ktoré môžu potenciálne narušiť dráhu estrogénových hormónov, a v uplynulých dvoch desaťročiach sa vo veľkej miere používali na charakterizovanie distribúcie ER v tkanive, ako aj na identifikovanie agonistov/antagonistov ER. Tieto skúšky sa týkajú interakcie medzi ligandom a receptorom, ktorá je počiatočným krokom signálnej dráhy estrogénu a je nevyhnutná pre reprodukčnú funkciu všetkých stavovcov.

4. Interakcia estrogénov s estrogénovými receptormi môže ovplyvniť transkripciu génov riadených estrogénom a vyvolať účinky nesúvisiace s genómom, čo môže viesť k indukcii alebo inhibícii bunkových procesov vrátane tých, ktoré sú potrebné na proliferáciu buniek, normálny vývoj plodu a reprodukčnú funkciu (5) (6) (7). Porušenie normálnych estrogénových systémov môže potenciálne spustiť nežiaduce účinky na normálny vývoj (ontogenézu), reprodukčné zdravie a integritu reprodukčného systému. Neprimeraná signalizačná funkcia ER môže viesť k účinkom, ako sú zvýšené riziko karcinómov závislých od hormónov, oslabená plodnosť a zmeny v raste a vývoji plodu (8).

5. Skúšky väzby *in vitro* sú založené na priamej interakcii látky so špecifickým miestom viazania ligandu a receptora, ktorým sa reguluje génová transkripcia. Hlavná zložka skúšky väzby na ľudský rekombinantný estrogénový receptor alfa (hrERα) slúži na meranie schopnosti ligandu označeného rádioizotopom ([^{3}H]17β-estradiol) viazať sa na ER v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie (t. j. konkurenta). Testované chemikálie, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou k ER, si konkurujú s ligandom označeným rádioizotopom pri nižšej koncentrácii v porovnaní s chemikáliami, ktorých afinita k receptoru je nižšia. Táto skúška obsahuje dve hlavné zložky: pokus na základe saturačnej väzby, ktorým sa charakterizujú parametre interakcie medzi receptorom a ligandom a určuje sa špecifickosť ER, po ktorom nasleduje pokus na základe kompetitívnej väzby, ktorým sa charakterizuje vzájomné konkurovanie si testovanej chemikálie a ligandu označeného rádioizotopom pri snahe o naviazanie sa na ER.

6. Validačné štúdie skúšok CERI a FW preukázali ich relevantnosť a spoľahlivosť, pokiaľ ide o ich určený účel (2).

7. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

Rozsah a obmedzenia týkajúce sa receptorových testov

8. Tieto skúšky sa navrhujú na účely skríningu a stanovovania priorít, ale môžu poskytnúť aj informácie týkajúce sa molekulárnych iniciačných udalostí (MIE), ktoré možno použiť v analýze váhy dôkazov. Týkajú sa chemickej väzby na doménu viažucu ligand ERα v systéme *in vitro*. Výsledky by teda nemali byť priamo extrapolované na komplexnú signalizáciu a reguláciu intaktného endokrinného systému *in vivo*.

9. Naviazanie prirodzeného ligandu, 17β-estradiolu, je počiatočným krokom postupnosti molekulárnych udalostí, ktorým sa aktivuje transkripcia cieľových génov, čo v konečnom dôsledku vedie k fyziologickej zmene (9). Vznik väzby na doménu viažucu ligand ERα sa tak považuje za jeden z kľúčových mechanizmov narušenia endokrinného systému (ED) sprostredkovaného estrogénovým receptorom, hoci existujú aj iné mechanizmy, prostredníctvom ktorých môže dôjsť k narušeniu endokrinného systému, okrem iného napríklad prostredníctvom i) interakcií s inými miestami ERα než s miestom viažucim ligand; ii) interakcií s inými receptormi relevantnými pre estrogénovú signalizáciu, s estrogénovým receptorom spojeným s ERβ a G-bielkovinami, inými receptormi a enzýmovými systémami v rámci endokrinného systému; iii) hormónovej syntézy; iv) metabolickej aktivácie a/alebo inaktivácie hormónov; v) distribúcie hormónov do cieľových tkanív a vi) vylúčenia hormónov z tela. Žiadna zo skúšok v rámci tejto testovacej metódy sa netýka týchto spôsobov účinku.

10. Táto testovacia metóda sa týka schopnosti chemikálií viazať sa na ľudský ERα a nemožno pomocou nej rozlišovať medzi agonistami alebo antagonistami ERα. Tieto skúšky sa netýkajú ďalších následných udalostí, napríklad génovej transkripcie alebo fyziologických zmien. Vzhľadom na to, že počas validácie boli použité iba jednotlivé jednozložkové látky, neriešila sa použiteľnosť na testovanie zmesí. Tieto skúšky sú napriek tomu teoreticky použiteľné aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje na zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

11. Bezbunkové receptorové systémy nemajú schopnosť vlastného metabolizmu a neboli validované v kombinácii so systémami s využitím metabolických enzýmov. Mohlo by byť možné začleniť metabolickú aktivitu do návrhu štúdie, vyžadovalo by si to však ďalšie úsilie z hľadiska validácie.

12. Chemikálie, ktoré môžu spôsobovať denaturáciu príslušnej bielkoviny (t. j. receptorovej bielkoviny), napríklad povrchovo aktívne látky alebo chemikálie, ktoré môžu meniť hodnotu pH tlmivého skúšobného roztoku, testovať nemožno, prípadne ich možno testovať len v koncentráciách, pri ktorých nedochádza k takýmto interakciám. Rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, ktorý možno testovať pri týchto skúškach, je inak obmedzený jej rozpustnosťou v tlmivom skúšobnom roztoku.

13. Na informačné účely tabuľka 1 poskytuje výsledky testov pre 24 látok, ktoré boli testované v obidvoch plne validovaných skúškach opísaných v tejto testovacej metóde. Z týchto látok je 17 klasifikovaných ako látky vytvárajúce väzbu na ER a 6 je klasifikovaných ako látky nevytvárajúce väzbu na ER na základe publikovaných správ vrátane skúšok *in vitro* transkripčnej aktivácie a/alebo uterotrofickej skúšky (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). V súvislosti s údajmi zhrnutými v tabuľke 1 existovala takmer 100 % zhoda medzi oboma skúškami, pokiaľ ide o klasifikáciu všetkých látok do 10^{-4} M, pričom každá látka bola správne klasifikovaná ako látka vytvárajúca alebo nevytvárajúce väzbu na ER. Doplňujúce informácie o tejto skupine látok, ako aj o ďalších látkach testovaných v skúškach väzby na ER počas validačných štúdií sú uvedené vo výkonnostných normách pre skúšku väzby na hrER (3) v dodatku 2 (tabuľky 1, 2 a 3).

Tabuľka 1

Klasifikácia látok ako látok vytvárajúcich alebo nevytvárajúcich väzbu na ER pri testovaní v skúškach FW a CERI väzby na hrER spolu s porovnaním s očakávanou reakciou

	Názov látky	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia	Skúška FW		Skúška CERI		Chemická trieda podľa MESH	Trieda výrobku
				Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia	Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia		
1	17β-estradiol	50-28-2	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
2	noretynodrel	68-23-5	*látka vytvárajúca väzbu*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
3	noretindrón	68-22-4	*látka vytvárajúca väzbu*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
4	di-*n*-butyl ftalát	84-74-2	*látka nevytvárajúca väzbu* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu (**) ()	uhľovodík (cyklický), ester	zmäkčovadlo, chemický medziprodukt
5	DES	56-53-1	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
6	17α-etinylestradiol	57-63-6	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
7	mezo-hexestrol	84-16-2	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
8	genisteín	446-72-0	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (heterocyklický), flavonoid	prírodný produkt
9	ekvol	531-95-3	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	metabolit fytoestrogénu	prírodný produkt
10	butylparabén (*n* butyl-4-hydroxybenzoát)	94-26-8	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	parabén	konzervačná látka

	Názov látky	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia	Skúška FW		Skúška CERI		Chemická trieda podľa MESH	Trieda výrobku
				Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia	Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia		
11	nonylfenol (zmes)	84852-15-3	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	alkylfenol	medziprodukt
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	organochlórová zlúčenina	insekticíd
13	kortikosterón	50-22-6	*látka nevytvárajúca väzbu* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	steroid	prírodný produkt
14	zearalenón	17924-92-4	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (heterocyklický), laktón	prírodný produkt
15	tamoxifén	10540-29-1	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (cyklický)	liek, veterinárne činidlo
16	5α-dihydrotestosterón	521-18-6	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	steroid, nefenolový	prírodný produkt
17	bisfenol A	80-05-7	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	fenol	chemický medziprodukt
18	4-*n*-heptylfenol	1987-50-4	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	nejednoznačné ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	alkylfenol	medziprodukt
19	kepon (chlórdekón)	143-50-0	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (halogénovaný)	pesticíd
20	benz(a)antracén	56-55-3	*látka nevytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu ([b])	aromatický uhľovodík	medziprodukt
21	enterolaktón	78473-71-9	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	fytoestrogén	prírodný produkt
22	progesterón	57-83-0	*látka nevytvárajúca väzbu* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	steroid	prírodný produkt

	Názov látky	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia	Skúška FW		Skúška CERI		Chemická trieda podľa MESH	Trieda výrobku
				Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia	Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia		
23	oktyltrietoxysilán	2943-75-1	*látka nevytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu	silán	látka na povrchovú úpravu
24	atrazín	1912-24-9	*látka nevytvárajúca väzbu* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	heterocyklická zlúčenina	herbicíd

(*) Limit rozpustnosti < 1×10^{-4} M.

(**) Použitie a klasifikácia di-n-butyl ftalátu (DBP) ako látky nevytvárajúcej väzbu vychádza z testovania do 10^{-4} M, pretože na základe pozorovania počas predvalidačných štúdií sa v niektorých laboratóriách zistilo, že táto látka je nerozpustná pri 10^{-3} M (napr. zakalenie).

(+) Počas validačnej štúdie sa di-*n*-butyl ftalát (DBP) testoval ako kódovaná testovaná látka pri koncentráciách do 10^{-3} M. Pri týchto podmienkach sa v niektorých laboratóriách pozoroval pokles viazania rádioaktívneho ligandu pri najvyššej koncentrácii (10^{-3} M) a/alebo nejednoznačný priebeh zostrojenej krivky. V prípade týchto testovacích cyklov sa DBP klasifikoval ako „nejednoznačný“ alebo ako „látka vytvárajúca väzbu“ v 3 z 5 laboratórií, ktoré používali skúšku CERI, a v 5 zo 6 laboratórií, ktoré používali skúšku FW [pozri odkaz (2), časti IV.B.3a,b a VI.A].

([a]) Klasifikácia nebola v súlade s očakávanou klasifikáciou. Klasifikácia 4-*n*-heptylfenolu ako „nejednoznačného“ alebo ako „látky nevytvárajúcej väzbu“ v 3 z 5 laboratórií viedla k priemernej klasifikácii s nejednoznačným výsledkom. Pri podrobnejšom skúmaní sa preukázalo, že to bolo spôsobené obmedzeniami chemickej rozpustnosti, ktoré znemožňovali vytvorenie úplnej väzbovej krivky.

([b]) Počas validačnej štúdie došlo k zmene klasifikácie benz(a)antracénu na látku nevytvárajúcu väzbu (t. j. negatívnu) na základe publikovanej literatúry, keď sa preukázalo, že estrogénové pôsobenie *in vitro* uvádzané pre túto látku (16) primárne závisí od jej metabolickej aktivácie (17)(18). Enzymatická metabolická aktivácia látky by sa nepredpokladala v bezbunkových skúškach väzby na hrER, aké sa používali v tejto medzilaboratórnej validačnej štúdii. Táto látka je preto správne klasifikovaná ako „látka nevytvárajúca väzbu“ pri použití v experimentálnych podmienkach pre skúšky FW a CERI.

ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER

Základné zložky skúšky

14. Táto testovacia metóda sa týka skúšok využívajúcich receptor ER a vhodne silný ligand k tomuto receptoru, ktorý možno použiť ako marker/značkovaciu látku pre túto skúšku a pri ktorom môže dochádzať k premiestneniu zvyšujúcimi sa koncentráciami testovanej chemikálie. Skúšky väzby sa skladajú z týchto hlavných zložiek: 1. saturačná väzba a 2. kompetitívna väzba. Skúška saturačnej väzby slúži na potvrdenie špecifickosti a pôsobenia prípravkov s receptorom, zatiaľ čo pokus s kompetitívnou väzbou slúži na vyhodnotenie schopnosti testovanej chemikálie viazať sa na hrER.

Kontroly

15. Je potrebné opísať základ navrhovaného súbežného referenčného estrogénu a kontrol. Súbežné kontroly [rozpúšťadlo (nosič), pozitívne (látka vytvárajúca väzbu na ER; silná a slabá afinita), negatívne (látka nevytvárajúca väzbu na ER)] podľa potreby slúžia ako ukazovateľ toho, že skúška je funkčná za podmienok testovania, a poskytujú základ pre porovnania medzi jednotlivými pokusmi. Obvykle sú súčasťou kritérií prijateľnosti pre daný pokus (1). Úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (t. j. látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú používať na jednej mikrotitračnej platničke pri každom testovacom cykle. Všetky ostatné mikrotitračné platničky majú obsahovať: 1. vysokú (približne úplné premiestnenie ligandu označeného rádioizotopom) a strednú (približne na úrovni IC_{50}) koncentráciu E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to každú z nich trojmo; 2. kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifickú väzbu, každú z nich trojmo.

Štandardné postupy kontroly kvality

16. Štandardné postupy kontroly kvality sa majú vykonať podľa príslušných pokynov pre každú skúšku, aby sa zabezpečilo, že aktívne receptory, správne chemické koncentrácie a tolerančné hranice zostanú počas viacerých replikácií stabilné a schopné poskytovať v priebehu času očakávané reakcie z hľadiska väzby na ER.

Preukázanie spôsobilosti laboratória

17. Pred testovaním neznámych chemikálií pomocou ktorejkoľvek skúšky v rámci tejto testovacej metódy by každé laboratórium malo preukázať spôsobilosť na používanie skúšky, a to uskutočnením saturačných skúšok na potvrdenie špecifickosti a pôsobenia prípravku ER a skúšok kompetitívnej väzby s referenčným estrogénom a kontrolami (látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu). Laboratórium má vytvoriť historickú databázu s výsledkami pre referenčný estrogén a kontroly, ktoré sa získajú z 3 – 5 nezávislých pokusov uskutočnených v rôznych dňoch. Tieto pokusy budú predstavovať základ pre referenčný estrogén a historické kontroly príslušného laboratória a použijú sa na čiastočné posúdenie prijateľnosti skúšky pri budúcich testovacích cykloch.

18. Vnímavosť testovacieho systému sa overí aj na základe testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 2. Zoznam látok na preukázanie spôsobilosti je podsúborom referenčných látok uvedených vo výkonnostných normách pre skúšky väzby na ER (3). Tieto látky sú komerčne dostupné, predstavujú triedy chemikálií bežne spojené s vytváraním väzieb na estrogénové receptory, majú vhodný rozsah potencie očakávanej pri látkach vytvárajúcich väzbu na estrogénové receptory (t. j. od silnej po slabú potenciu) a pri látkach nevytvárajúcich väzbu (t. j. negatívnych látkach). Pri každej látke na preukázanie spôsobilosti majú testované koncentrácie zahŕňať rozsah uvedený v tabuľke 2. Pre každú látku sa uskutočnia najmenej tri pokusy, pričom výsledky majú byť v súlade s očakávaným chemickým pôsobením. Jednotlivé pokusy sa uskutočňujú nezávisle (t. j. s čerstvo pripravenými riedeniami receptora, chemikálií a reagentu), pričom pre každú koncentráciu sa použijú tri replikáty. Spôsobilosť sa preukazuje správnou klasifikáciou (pozitívna/negatívna) každej látky na preukázanie spôsobilosti. Testovanie spôsobilosti by mal uskutočniť každý laboratórny technik pri učení sa skúšok.

Tabuľka 2

Zoznam kontrol a látok na preukázanie spôsobilosti pre skúšky kompetitívnej väzby na hrER (1)

Č.	Názov látky	Registračné číslo CAS (2)	Očakávaná reakcia (3) (4)	Rozsah testovaných koncentrácií (M)	Chemická trieda podľa MeSH (5)	Trieda výrobku (6)
Kontroly (referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu, látka nevytvárajúca väzbu)						
1	17–εστραδιολ	50-28-2	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
2	noretynodrel (alebo) noretindrón	68-23-5 (alebo) 68-22-4	látka vytvárajúca väzbu	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
3	oktyltrietoxysilán	2943-75-1	látka nevytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	silán	látka na povrchovú úpravu
Látky na preukázanie spôsobilosti (6)						
4	dietylstilbestrol	56-53-1	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
5	17α-etinylestradiol	57-63-6	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
6	mezo-hexestrol	84-16-2	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
7	tamoxifén	10540-29-1	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	uhľovodík (cyklický)	liek, veterinárne činidlo
8	genisteín	446-72-0	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	heterocyklická zlúčenina, flavonoid	prírodný produkt

Č.	Názov látky	Registračné číslo CAS (2)	Očakávaná reakcia (3) (4)	Rozsah testovaných koncentrácií (M)	Chemická trieda podľa MeSH (5)	Trieda výrobku (6)
9	bisfenol A	80-05-7	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	fenol	chemický medziprodukt
10	zearalenón	17924-92-4	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	heterocyklická zlúčenina, laktón	prírodný produkt
11	butylparabén	94-26-8	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	karboxylová kyselina, fenol	konzervačná látka
12	atrazín	1912-24-9	látka nevytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	heterocyklická zlúčenina	herbicíd
13	di-n-butyl ftalát (DBP) (7)	84-74-2	látka nevytvárajúca väzbu (8)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	uhľovodík (cyklický), ester	zmäkčovadlo, chemický medziprodukt
14	kortikosterón	50-22-6	látka nevytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	steroid	prírodný produkt

(1) Ak látka na preukázanie spôsobilosti už nie je komerčne dostupná, možno použiť látku s rovnakou klasifikáciou z hľadiska väzby na ER, porovnateľnou potenciou a chemickou triedou.
(2) Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service).
(3) Klasifikácia látok ako látok vytvárajúcich alebo nevytvárajúcich väzbu na ERα počas validačnej štúdie pri skúškach FW a CERI väzby na hrER (2).
(4) Určenie vytvárania väzby na ER vychádzalo z podkladových kontrolných dokumentov (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre skúšky väzby na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (TA) (9), ako aj z empirických údajov a ďalších informácií získaných z referenčných štúdií, ktoré boli publikované a revidované (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný štandardizovaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).
(7) DBP možno použiť ako alternatívnu kontrolnú látku nevytvárajúcu väzbu, testovanú pri maximálnej koncentrácii 10^{-4} M.
(8) Limit rozpustnosti tejto látky je 10^{-4} M. Použitie a klasifikácia di-n-butyl-ftalátu (DBP) ako látky nevytvárajúcej väzbu vychádza z testovania do 10^{-4} M, pretože na základe pozorovania počas predvalidačných štúdií sa v niektorých laboratóriách zistilo, že táto látka je nerozpustná pri 10^{-3} M (napr. zakalenie).

Testovanie rozpustnosti a zisťovanie rozsahu koncentrácií testovaných chemikálií

19. Je potrebné vykonať predbežný test s cieľom určiť limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie a stanoviť vhodný rozsah koncentrácií, ktorý sa má používať pri vykonávaní testu. Limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie sa určí najskôr v rozpúšťadle a následne sa potvrdí v podmienkach skúšky. Konečná koncentrácia testovaná v rámci skúšky nemá prekročiť 1 mM. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu je kontrola s aplikáciou rozpúšťadla spolu s ôsmimi logaritmickými sériovými riedeniami, pričom sa začína pri maximálnej prijateľnej koncentrácii (napr. 1 mM alebo nižšej podľa limitu rozpustnosti) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny. Koncentrácie v druhom a treťom pokuse sa príslušne upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

Kritériá prijateľnosti testovacích cyklov

20. Prijatie alebo zamietnutie testovacieho cyklu je založené na hodnotení výsledkov získaných pri referenčnom estrogéne a kontrole, ktoré sa použili pri jednotlivých pokusoch. Po prvé, na mikrotitračnej platničke 1 majú úplné krivky koncentrácie pre referenčné kontroly z jednotlivých pokusov spĺňať miery výkonnosti s parametrami zostrojenia krivky [napr. IC_{50} a sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)] na základe výsledkov uvádzaných pre príslušné protokoly skúšok CERI a FW (dodatok 2 a 3) a údajov o historických kontrolách z laboratória, ktoré vykonáva test. Všetky kontroly (referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú pri každom pokuse správne klasifikovať. Po druhé, je potrebné posúdiť kontroly na ďalších mikrotitračných platničkách z hľadiska konzistentnosti s mikrotitračnou platničkou 1. Je potrebné použiť dostatočný rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, aby bolo možné jednoznačne určiť vrchol krivky kompetitívnej väzby. Variabilita medzi replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie, ako aj medzi tromi nezávislými testovacími cyklami má byť primeraná a vedecky odôvodniteľná. Schopnosť konzistentne vykonávať skúšku by sa mala preukázať vytvorením a udržiavaním historickej databázy referenčného estrogénu a kontrol. Na meranie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti možno použiť štandardné odchýlky (SD) alebo variačné koeficienty (CV) pre stredné hodnoty parametrov na zostrojenie krivky referenčného estrogénu a kontrolnej látky vytvárajúcej slabú väzbu z viacerých pokusov. Pri posudzovaní výsledkov kontrol na mikrotitračnej platničke pri jednotlivých testovacích cykloch, ako aj pri jednotlivých testovaných chemikáliách je potrebné postupovať na základe odborného úsudku.

Okrem toho by mali byť splnené tieto zásady týkajúce sa kritérií prijateľnosti:

— údaje majú byť dostatočné na kvantitatívne posúdenie väzby na ER,

— testované koncentrácie majú zostať v rozsahu rozpustnosti testovanej chemikálie.

Analýza údajov

21. Stanovený postup analýzy údajov v prípade údajov o saturačnej a kompetitívnej väzbe má byť v súlade s hlavnými zásadami na charakterizovanie interakcií medzi ligandom a receptorom. Údaje týkajúce sa saturačnej väzby sa zvyčajne analyzujú pomocou modelu nelineárnej regresie, ktorý zahŕňa celkovú aj nešpecifickú väzbu. Pri určovaní hodnôt B_{max} a K_d môže byť potrebná korekcia pre prípad zníženia počtu ligandov [napr. Swillens, 1995 (19)]. Údaje zo skúšok kompetitívnej väzby sa zvyčajne transformujú [napr. percentuálna hodnota špecifickej väzby a koncentrácia testovanej chemikálie (logM)]. Odhady $\log(IC_{50})$ pre každú testovanú chemikáliu sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami. Po počiatočnej analýze sa uskutoční stanovenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje o väzbe zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby. V niektorých prípadoch môže byť potrebná dodatočná analýza na optimálne zostrojenie krivky [napr. obmedzenie vrchnej a/alebo spodnej časti krivky, použitie pravidla 10 %, pozri dodatok 4 a odkaz 2 (časť III.A.2)].

22. Splnenie kritérií prijateľnosti (odsek 20) naznačuje, že skúšobný systém funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testu vyplynú presné údaje. Zopakovanie správnych výsledkov prvého testu je najlepší ukazovateľ toho, že boli generované presné údaje.

Všeobecné kritériá interpretácie údajov

23. V súčasnosti neexistuje všeobecne dohodnutá metóda na interpretáciu údajov o väzbe na ER. Oba typy posudzovania pôsobenia, ktoré sprostredkúva hrER, t. j. kvalitatívne hodnotenie (napr. či látka vytvára/nevytvára väzbu) aj kvantitatívne hodnotenie [napr. hodnota $\log IC_{50}$, relatívna afinita (RBA)], by však mali byť založené na empirických údajoch a spoľahlivom vedeckom úsudku.

Správa o teste

24. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Skúška:

— použitá skúška.

Kontrolná/referenčná/testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— charakterizácia (povaha, dodávateľ a šarža),

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Receptory:

— zdroj receptorov (dodávateľ, katalógové číslo, šarža, druh receptora, aktívna koncentrácia receptora uvedená dodávateľom, certifikácia od dodávateľa),

— charakterizácia receptorov (vrátane výsledkov saturačnej väzby): K_d, B_{max},

— skladovanie receptorov,

— ligand označený rádioizotopom:

— dodávateľ, katalógové číslo, šarža, špecifická aktivita.

Podmienky testovania:

— obmedzenia rozpustnosti v podmienkach skúšky,

— zloženie tlmivého roztoku na stanovenie väzby,

— koncentrácia receptora,

— koncentrácia značkovacej látky (t. j. ligandu označeného rádioizotopom),

— koncentrácie testovanej chemikálie,

— percentuálny podiel nosiča v konečnej skúške,

— inkubačná teplota a čas,

— metóda oddelenia viazaných/voľných zložiek,

— pozitívne a negatívne kontroly/referenčné látky,

— kritériá, podľa ktorých sa testy považujú za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné.

Kontrola prijateľnosti:

— skutočné hodnoty IC_{50} a sklonu krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope) pre súbežné pozitívne kontroly/referenčné látky.

Výsledky:

— nespracované údaje a údaje o viazaných/voľných zložkách,

— kontrola na potvrdenie denaturácie, ak je to vhodné,

— najnižšia účinná koncentrácia (LEC), ak existuje,

— hodnoty RBA a/alebo IC_{50}, ak je to vhodné,

— vzťah medzi koncentráciou a reakciou, ak ho možno určiť,

— štatistické analýzy, ak existujú, spolu s meraním chyby a spoľahlivosti (napr. SEM, SD, CV alebo 95 % CI) a opis spôsobu získania týchto hodnôt.

Diskusia o výsledkoch:

— uplatňovanie pravidla 10 %

Záver

LITERATÚRA

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

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20 – 6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): s. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): s. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. s. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV A SKRATKY

Pravidlo 10 %: možnosť vylúčiť z analýzy údajové body, pri ktorých stredná hodnota replikátov v prípade percentuálnej hranice špecifickej pre [^{3}H]17β-estradiol najmenej o 10 % presahuje úroveň pozorovanú v prípade strednej hodnoty pri nižšej koncentrácii (pozri dodatok 4).

Kritériá prijateľnosti: minimálne normy výkonnosti kontrol a referenčných štandardov v rámci pokusu. Všetky kritériá prijateľnosti majú byť splnené, aby sa pokus považoval za platný.

Presnosť (zhoda): miera zhody výsledkov skúšky s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti skúšky a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov skúšky (1).

CF: koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

Chemikália: látka alebo zmes.

CV: variačný koeficient

E2: 17β-estradiol

ED: narušenie endokrinného systému

hERα: ľudský estrogénový receptor alfa

ER: estrogénový receptor

Estrogénové pôsobenie: schopnosť chemikálie napodobniť 17β-estradiol v jeho schopnosti viazať estrogénové receptory. Vytvorenie väzby na hERα možno zistiť pomocou tejto testovacej metódy.

IC_{50}: polovičná maximálna účinná koncentrácia inhibičnej testovanej chemikálie.

ICCVAM: Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov predvalidácie a validácie a udáva sa ňou rozsah, v akom možno skúšku úspešne preniesť medzi laboratóriami. Označuje sa aj ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (1).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto sa označuje ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (1).

LEC: najnižšia účinná koncentrácia – je to najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá vyvoláva reakciu (t. j. najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je násobná indukcia štatisticky odlišná od súbežnej kontroly s nosičom).

Test Me-too: hovorový názov skúšky, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Môže sa používať namiesto výrazu podobná testovacia metóda.

PBTG: usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti.

Výkonnostné normy: normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej skúšky, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: 1. nevyhnutné zložky skúšky; 2. minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a 3. porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná skúška mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (1).

Látky na preukázanie spôsobilosti: podskupina referenčných látok zahrnutých do výkonnostných noriem, ktorú môžu laboratóriá použiť na preukázanie technickej spôsobilosti na vykonávanie štandardizovanej skúšky. Kritériá výberu pre tieto látky zvyčajne zahŕňajú podmienku, že látky predstavujú daný rozsah reakcií, sú komerčne dostupné a sú o nich k dispozícii referenčné údaje vysokej kvality.

Spôsobilosť: preukázaná schopnosť správne vykonať skúšku pred testovaním neznámych látok.

Referenčný estrogén: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenčné testovacie metódy: skúšky, o ktoré sa PBTG 493 opiera.

RBA: relatívna afinita. RBA látky sa vypočíta ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) príslušnej látky vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol.

Relevantnosť: opis vzťahu skúšky k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa skúškou správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) skúšky (1).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže skúška počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti.

SD: štandardná odchýlka.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Validovaná testovacia metóda: skúška, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (1).

Validácia: proces, ktorým sa stanovuje spoľahlivosť a relevantnosť určitého prístupu, metódy, skúšky, postupu alebo posúdenia na vymedzený účel (1).

Dodatok 2

FREYBERGEROVE-WILSONOVE SKÚŠKY IN VITRO SATURAČNEJ A KOMPETITÍVNEJ VÄZBY NA ESTROGÉNOVÝ RECEPTOR (ERα) S VYUŽITÍM ÚPLNÉHO REKOMBINANTNÉHO ERα

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške *in vitro* saturačnej a kompetitívnej väzby na estrogénový receptor (ERα) sa využíva úplný ľudský receptor ERα (hrERα), ktorý sa vytvára v bunkách hmyzu infikovaných bakulovírusom, z ktorých sa izoluje. Protokol, ktorý vytvorili Freyberger a Wilson, sa posudzoval v rámci medzinárodnej medzilaboratórnej validačnej štúdie (2), ktorou sa preukázala jeho relevantnosť a spoľahlivosť na zamýšľaný účel tejto skúšky.

2. Táto skúška predstavuje skríningový postup na identifikovanie látok, ktoré sa dokážu viazať na úplný ľudský estrogénový receptor hrERα. Slúži na stanovenie schopnosti testovanej chemikálie konkurovať 17β-estradiolu pri viazaní sa na hrERα. Súčasťou kvantitatívnych výsledkov skúšky môže byť hodnota IC_{50} (miera koncentrácie testovanej chemikálie, ktorá je potrebná na premiestnenie polovice [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relatívne afinity testovaných chemikálií k hrERα v porovnaní so 17β-estradiolom. Na účely skríningu chemikálií môžu prijateľné kvalitatívne výsledky skúšky zahŕňať klasifikáciu testovaných chemikálií ako látok vytvárajúcich väzbu na hrERα, látok nevytvárajúcich väzbu alebo nejednoznačných látok na základe kritérií opísaných pre väzbové krivky.

3. Pri skúške sa používa ligand označený rádioizotopom, laboratórium preto musí mať povolenie na prácu s rádioaktívnymi materiálmi. Pri všetkých postupoch s rádioizotopmi a nebezpečnými chemikáliami je potrebné dodržiavať nariadenia a postupy opísané vo vnútroštátnych právnych predpisoch.

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti **VŠEOBECNÝ ÚVOD** a **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER**. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tomto usmernení na vykonávanie testov sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍPY SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. V rámci skúšky väzby na hrERα sa meria schopnosť ligandu označeného rádioizotopom ([^{3}H]17β-estradiol) viazať sa na ER v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie (t. j. konkurenta). Testované chemikálie, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou k ER, si konkurujú s ligandom označeným rádioizotopom pri nižšej koncentrácii v porovnaní s chemikáliami, ktorých afinita k receptoru je nižšia.

6. Táto skúška obsahuje dve hlavné zložky: pokus na základe saturačnej väzby, ktorým sa charakterizujú parametre interakcie medzi receptorom a ligandom, po ktorom nasleduje pokus na základe kompetitívnej väzby, ktorým sa charakterizuje vzájomné konkurovanie si testovanej chemikálie a ligandu označeného rádioizotopom pri snahe o naviazanie sa na ER.

7. Účelom pokusu na základe saturačnej väzby je charakterizovať konkrétnu šaržu receptorov z hľadiska afinity a počtu v prípravku pre pokus na základe kompetitívnej väzby. Pri pokuse na základe saturačnej väzby sa v rovnovážnych podmienkach meria afinita pevne stanovenej koncentrácie estrogénového receptora k svojmu prirodzenému ligandu (vyjadruje ju disociačná konštanta, K_d) a koncentrácia aktívnych miest receptora (B_{max}).

8. Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria afinita látky z hľadiska konkurovania si s [^{3}H]17β-estradiolom pri viazaní sa na ER. Afinita sa kvantifikuje na základe koncentrácie testovanej chemikálie, pri ktorej v rovnovážnom stave dochádza k inhibícii 50 % špecifickej väzby [^{3}H]17β-estradiolu (označuje sa ako „inhibičná koncentrácia 50 %“ alebo IC_{50}). Vyhodnotenie je možné aj pomocou relatívnej afinity (RBA, vzhľadom na hodnotu IC_{50} estradiolu pri samostatnom meraní v tom istom testovacom cykle). Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria viazanie sa [^{3}H]17β-estradiolu v pevnej stanovenej koncentrácii v prítomnosti širokého rozsahu (osem rádov) koncentrácií testovanej chemikálie. Tieto údaje sa potom prispôsobia, ak je to možné, podobe Hillovej rovnice (Hill, 1910), ktorou sa opisuje premiestnenie rádioaktívneho ligandu látkou vytvárajúcou väzbu, ktorá mu konkuruje na jednom mieste. Rozsah premiestnenia estradiolu označeného rádioizotopom v rovnovážnom stave slúži na charakterizovanie testovanej chemikálie ako látky vytvárajúcej väzbu, nevytvárajúcej väzbu alebo spôsobujúcej nejednoznačnú reakciu.

POSTUP

Preukázanie prijateľnej výkonnosti bielkoviny hrERα

9. Pred bežným vykonávaním skúšok saturačnej a kompetitívnej väzby je potrebné preukázať správnu výkonnosť každej novej šarže hrERα v laboratóriu, v ktorom sa bude používať. Na preukázanie výkonnosti sa použije dvojstupňový postup. Skladá sa z týchto krokov:

— Uskutoční sa skúška saturačnej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu s cieľom preukázať špecifickosť a saturáciu hrERα. Na základe nelineárnej regresnej analýzy týchto údajov (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a následného Scatchardovho znázornenia sa zdokumentuje afinita [^{3}H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorov (B_{max}) pre každú šaržu hrERα.

— Uskutoční sa skúška kompetitívnej väzby pomocou kontrolných látok [referenčný estrogén (17β-estradiol)], látka vytvárajúca slabú väzbu (napr. noretynodrel alebo noretindrón) a látka nevytvárajúca väzbu (oktyltrietoxysilán, OTES). Každé laboratórium si vytvorí historickú databázu na zdokumentovanie konzistentnosti hodnoty IC_{50} a iných relevantných hodnôt pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu medzi pokusmi a rôznymi šaržami hrERα. Parametre kriviek kompetitívnej väzby pre kontrolné látky majú byť v rámci hraníc 95 % intervalu spoľahlivosti (pozri tabuľku 1), ktoré sa vytvorili na základe údajov z laboratórií zapojených do validačnej štúdie tejto skúšky (2).

Tabuľka 1

Kritériá výkonnosti vytvorené pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu, skúška FW väzby na hrER

Látka	Parameter	Stredná hodnota [a]	Štandardná odchýlka (n)	95 % intervaly spoľahlivosti [b]	
				Dolná hranica	Horná hranica
17β-estradiol	Horný bod (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dolný bod (%)	0,29	1,25 (67)	−0,01	0,60
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)	−1,06	0,20 (67)	−1,11	−1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	−8,92 [c]	0,18 (67)	−8,97	−8,88
Noretynodrel	Horný bod (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dolný bod (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)	−1,01	0,38 (68)	−1,10	−0,92
	$LogIC_{50}$ (M)	−6,39	0,27 (68)	−6,46	−6,33
Noretindrón [c]	Horný bod (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dolný bod (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)	−1,41	0,32 (27)	−1,53	−1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	−5,73	0,27 (27)	−5,84	−5,62

[a] Stredná hodnota (n) ± štandardná odchýlka (SD) sa vypočítali pomocou odhadov parametrov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v štyroch laboratóriách počas validačnej štúdie (pozri prílohu N v odkaze 2).

[b] 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú ako usmernenie pre kritériá prijateľnosti.

[c] V rámci čiastkovej úlohy 4 počas validačnej štúdie bolo testovanie noretindrónu voliteľné (pozri odkaz 2, pozri čiastkovú úlohu 4). Stredné hodnoty ± SD (n) sa tak vypočítali pomocou odhadov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v dvoch laboratóriách.
Rozsah IC_{50} *bude závisieť od hodnoty* K_d *prípravku s receptorom a od koncentrácie ligandu označeného rádioizotopom, ktorá sa používala v jednotlivých laboratóriách. Prijateľná bude vhodná úprava z hľadiska rozsahu* IC_{50} *na základe podmienok použitých pri uskutočnení štúdie.*

Preukázanie spôsobilosti laboratória

10. Pozri odseky 17 a 18 a tabuľku 2 v časti **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER** tejto testovacej metódy. Každá skúška (pre saturačnú a kompetitívnu väzbu) sa skladá z troch nezávislých testovacích cyklov (t. j. s čerstvo pripravenými riedeniami receptora, chemikálií a reagentu) uskutočnených v rôznych dňoch, pričom každý testovací cyklus obsahuje tri replikáty.

Stanovenie koncentrácie receptora (hrERα)

11. Koncentrácia aktívneho receptora sa mierne líši v závislosti od šarže a podmienok skladovania. Je preto potrebné stanoviť koncentráciu aktívneho receptora pri jeho prijatí od dodávateľa. Zistí sa tak vhodná koncentrácia aktívneho receptora v čase testovacieho cyklu.

12. V podmienkach zodpovedajúcich kompetitívnej väzbe (t. j. [^{3}H]-estradiol s koncentráciou 1 nM) sa nominálne koncentrácie 0,25, 0,5, 0,75 a 1 nM receptora inkubujú bez prítomnosti (celková väzba) a v prítomnosti (nešpecifická väzba) neoznačeného estradiolu s koncentráciou 1 μM. Špecifická väzba vypočítaná ako rozdiel celkovej a nešpecifickej väzby sa znázorní v závislosti od nominálnej koncentrácie receptora. Koncentrácia receptora, ktorá poskytuje hodnoty špecifickej väzby zodpovedajúce 20 % pridaného rádioaktívneho indikátora, súvisí so zodpovedajúcou nominálnou koncentráciou receptora a táto koncentrácia receptora sa má použiť pre pokusy na základe saturačnej a kompetitívnej väzby. Táto podmienka bude často splnená pri konečnej koncentrácii hrER na úrovni 0,5 nM.

13. Ak toto 20 % kritérium opakovane nemožno splniť, je potrebné skontrolovať výskyt potenciálnych chýb v pokusnom systéme. Nesplnenie 20 % kritéria môže signalizovať, že sa v rekombinantnej šarži nachádza veľmi malé množstvo aktívneho receptora. V takom prípade je potrebné zvážiť použitie inej šarže receptora.

Saturačná skúška

14. Osem zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]17β-estradiolu sa vyhodnocuje trojmo pri týchto troch podmienkach (pozri tabuľku 2):

— bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Stanovuje sa tak celková väzba meraním rádioaktivity v jamkách, v ktorých sa nachádza len [^{3}H]17β-estradiol,

— v prítomnosti 1000-násobnej nadmernej koncentrácie neoznačeného 17β-estradiolu oproti označenému 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Zámerom tejto podmienky je saturovať aktívne väzbové miesta neoznačeným 17β-estradiolom a určiť nešpecifickú väzbu meraním rádioaktivity v jamkách. Pri všetkom zvyšnom označenom estradiole, ktorý sa môže naviazať na receptor, sa predpokladá, že sa viaže na nešpecifické miesto, keďže neoznačený estradiol má takú vysokú koncentráciu, že sa viaže na všetky dostupné špecifické miesta na receptore,

— bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a bez prítomnosti ER (stanovenie celkovej rádioaktivity).

Príprava roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu a neoznačeného 17β-estradiolu

15. Riedenia [^{3}H]-17β-estradiolu sa pripravia pridaním tlmivého skúšobného roztoku do zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 12 nM, čím sa dosiahnu koncentrácie v pôvodnom rozsahu od 0,12 nM do 12 nM. Pridaním 40 μl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (v konečnom objeme 160 μl) sa získajú konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,03 do 3,0 nM. Príprava tlmivého skúšobného roztoku, zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu a riedení a stanovenie koncentrácií sa podrobne opisujú v protokole skúšky FW (2).

16. Riedenia etanolových roztokov 17β-estradiolu sa pripravia pridaním tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahlo osem zvyšujúcich sa koncentrácií v pôvodnom rozsahu od 0,06 μM do 6 μM. Pridaním 80 μl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (v konečnom objeme 160 μl) sa získajú konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,03 μM do 3 μM. Konečná koncentrácia neoznačeného 17β-estradiolu v jednotlivých jamkách v rámci skúšky nešpecifickej väzby má byť 1000-násobok koncentrácie označeného [^{3}H]-17β-estradiolu. Príprava riedení neoznačeného 17β-estradiolu sa podrobne opisuje v protokole skúšky FW (2).

17. Použije sa nominálna koncentrácia receptora so špecifickou väzbou na úrovni 20 ±5 % (pozri odseky 12 – 13). Roztok hrERα sa musí pripraviť bezprostredne pred použitím.

18. 96-jamkové mikrotitračné platničky sa pripravia podľa znázornenia v tabuľke 2, pričom na každú koncentráciu sa použijú 3 replikáty. Príklad priradenia koncentrácií a objemov [^{3}H]-17β-estradiolu, neoznačeného 17β-estradiolu, tlmivého roztoku a receptora na mikrotitračnej platničke sa uvádza v dodatku 2.2.

Tabuľka 2

Rozloženie pri skúške saturačnej väzby na mikrotitračnej platničke

	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			Celková väzba (rozpúšťadlo)
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 E2			Nešpecifická väzba
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: estrogénový receptor
E2: neoznačený 17β-estradiol

19. Skúšobné mikrotitračné platničky sa inkubujú 16 až 20 hodín pri teplote 2 až 8 °C a počas inkubačného času sú umiestnené v rotátore.

Meranie [3H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol viazaný na hrERα sa separuje od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 80 μl studenej suspenzie DCC do každej jamky, pričom sa mikrotitračné platničky 10 minút pretrepávajú a 10 minút odstreďujú približne pri 2500 ot./min. S cieľom minimalizovať disociáciu naviazaného [^{3}H]-17β-estradiolu od hrERα počas tohto postupu je mimoriadne dôležité, aby mali tlmivé roztoky a skúšobné jamky teplotu 2 až 8 °C a aby sa jednotlivé kroky vykonali rýchlo. Na účinné a rýchle spracovanie mikrotitračných platničiek sa vyžaduje trepačka.

21. 50 μl supernatantu obsahujúceho [^{3}H]-17β-estradiol naviazaný na hrERα sa potom veľmi opatrne odoberie, aby nedošlo ku kontaminácii jamiek dotykom DCC, a umiestni sa na druhú mikrotitračnú platničku.

22. Ďalej sa do každej jamky (A1 – B12 a D1 až E12) pridá 200 μl scintilačnej kvapaliny so schopnosťou premieňať kinetickú energiu nukleárneho žiarenia na svetelnú energiu. Jamky G1 – H12 (označené ako jamky na určenie celkového počtu rozpadov za minútu – dpm) predstavujú sériové riedenia [^{3}H]-17β-estradiolu (40 μl), ktoré sa majú preniesť priamo do scintilačnej kvapaliny v jamkách na meracej mikrotitračnej platničke podľa tabuľky 3, t. j. tieto jamky obsahujú iba 200 μl scintilačnej kvapaliny a vhodné riedenie [3H]-17β-estradiolu. Na základe uvedených mier sa preukazuje množstvo [^{3}H]-17β-estradiolu vyjadrené ako počet rozpadov za minútu, ktoré sa pridalo do každej množiny jamiek na určenie celkovej väzby, resp. nešpecifickej väzby.

Tabuľka 3

Rozloženie pri skúške saturačnej väzby na mikrotitračnej platničke, meranie rádioaktivity

	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			Celková väzba (rozpúšťadlo)
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			Nešpecifická väzba
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 (celková hodnota dpm)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Celková hodnota dpm (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[3H] E2: [3H]-17β-estradiol
ER: estrogénový receptor
E2: neoznačený 17β-estradiol
dpm: počet rozpadov za minútu
(*) Sériové riedenia estradiolu rádioaktívne označeného pomocou [^{3}H] sa tu priamo pridajú do 200 μl scintilačnej kvapaliny v jamkách G1 – H12.

23. Meranie sa začne najmenej po dvojhodinovej prestávke a čas počítania je 40 minút na jamku. Na stanovenie hodnoty dpm/jamka s korekciu strát sa použije scintilačný spektrometer mikrotitračných platničiek. Prípadne možno na meranie vzoriek použiť konvenčný čítač, pokiaľ nie je scintilačný spektrometer k dispozícii. Pri takýchto podmienkach možno zvážiť skrátenie času počítania.

Skúška kompetitívnej väzby

24. Pri skúške kompetitívnej väzby sa meria väzba jednej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie. V rámci jedného testovacieho cyklu sa pri každej koncentrácii použijú tri súbežné replikáty. Okrem toho sa pri každej testovanej chemikálii uskutočnia tri nesúbežné testovacie cykly. Skúška sa pripraví v jednej alebo vo viacerých 96-jamkových mikrotitračných platničkách.

Kontroly

25. Pri vykonávaní skúšky je súčasťou každého pokusu súbežné rozpúšťadlo a kontroly (t. j. referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu). Úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (t. j. látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú používať na jednej mikrotitračnej platničke pri každom testovacom cykle. Všetky ostatné platničky obsahujú i) vysokú (maximálna miera premiestnenia) a strednú (približne na úrovni IC_{50}) koncentráciu E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to každú z nich trojmo; ii) kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifickú väzbu, každú z nich najmenej trojmo. Postupy prípravy tlmivého skúšobného roztoku, kontrol, roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a testovanej chemikálie sú opísané v odkaze 2 (príloha K, pozri protokol skúšky FW).

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla:

26. Pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa preukazuje, že rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom nepôsobia, a meria sa aj celková väzba (TB). Uprednostňovaným rozpúšťadlom je etanol. Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v etanole, možno prípadne použiť DMSO. Koncentrácia etanolu alebo DMSO, ak sa použije, v konečných skúšobných jamkách je 1,5 % a nesmie prekročiť 2 %.

Kontrola s tlmivým roztokom:

27. Kontrola s tlmivým roztokom (BC) nemá obsahovať rozpúšťadlo ani testovanú chemikáliu, ale má obsahovať všetky ostatné zložky skúšky. Výsledky kontroly s tlmivým roztokom sa porovnajú s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém.

Látka vytvárajúca silnú väzbu (referenčný estrogén)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogénny ligand a s vysokou afinitou sa viaže na podtyp alfa estrogénového receptora. Pre každú skúšku kompetitívnej väzby na hrERα sa pripraví štandardná krivka pomocou neoznačeného 17β-estradiolu, aby bolo možné posúdiť variabilitu pri vykonávaní skúšky v priebehu času v rovnakom laboratóriu. Pripraví sa osem roztokov neoznačeného 17β-estradiolu v etanole s koncentráciami v skúšobných jamkách v rozsahu od 100 nM do 10 pM (–7[logM] až –11[logM]) s takýmito rozstupmi: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Najvyššia koncentrácia neoznačeného 17β-estradiolu (1 μM) slúži aj ako indikátor nešpecifickej väzby. Táto koncentrácia je v tabuľke 4 odlíšená značkou „NSB“, hoci je takisto súčasťou štandardnej krivky.

Látka vytvárajúca slabú väzbu

29. Použije sa aj látka vytvárajúca slabú väzbu [noretynodrel (CAS 68-23-5) alebo noretindrón (CAS 68-22-4)] s cieľom preukázať citlivosť jednotlivých pokusov a umožniť posúdenie variability pri vykonávaní skúšky v priebehu času. Pripraví sa osem roztokov látky vytvárajúcej slabú väzbu v etanole s koncentráciami v skúšobných jamkách v rozsahu od 3 nM do 30 μM (–8,5[logM] až –4,5[logM]) s takýmito rozstupmi: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Látka nevytvárajúca väzbu

30. Oktyltrietoxysilán (OTES, CAS 2943-75-1) sa použije ako negatívna kontrola (látka nevytvárajúca väzbu). Poskytuje istotu, že sa pri uskutočnenej skúške rozpozná, keď sa testované chemikálie neviažu na hrERα. Pripraví sa osem roztokov látky nevytvárajúcej väzbu v etanole s koncentráciami v skúšobných jamkách v rozsahu od 0,1 nM do 1000 μM (–10[logM] až –3[logM]) s logaritmickými prírastkami. Di-*n*-butyl-ftalát (DBP) možno použiť ako alternatívnu kontrolnú látku nevytvárajúcu väzbu. Jeho maximálna preukázaná rozpustnosť je –4[logM].

Koncentrácia hrERα

31. Použije sa také množstvo receptora, aké poskytuje špecifickú väzbu 20 ±5 % rádioaktívneho ligandu s koncentráciou 1 nM (pozri odseky 12 – 13 dodatku 2). Roztok hrERα sa musí pripraviť bezprostredne pred použitím.

[3H]-17β-estradiol

32. Koncentrácia [^{3}H]-17β-estradiolu v skúšobných jamkách má byť 1,0 nM.

Testované chemikálie

33. V prvom rade je potrebné vykonať test rozpustnosti s cieľom určiť limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie a stanoviť vhodný rozsah koncentrácií, ktorý sa má používať pri vykonávaní testovacieho protokolu. Limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie sa určí najskôr v rozpúšťadle a následne sa potvrdí v podmienkach skúšky. Konečná koncentrácia testovaná v rámci skúšky nemá prekročiť 1 mM. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu je kontrola s aplikáciou rozpúšťadla spolu s 8 logaritmickými sériovými riedeniami, pričom sa začína pri maximálnej prijateľnej koncentrácii (napr. 1 mM alebo nižšej podľa limitu rozpustnosti) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny (pozri aj odsek 35). Testovaná chemikália sa má testovať pomocou kriviek s odstupmi zodpovedajúcimi 8 logaritmickým koncentráciám, ako boli vymedzené v predchádzajúcom teste na zistenie rozsahu. Koncentrácie v druhom a treťom pokuse sa príslušne upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

34. Riedenia testovanej chemikálie sa pripravia v príslušnom rozpúšťadle (pozri odsek 26 dodatku 2). Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v etanole ani v DMSO a pri pridaní ďalšieho rozpúšťadla by jeho koncentrácia v konečnej vzorke prekročila prijateľný limit, najvyššia koncentrácia sa môže znížiť na nasledujú nižšiu koncentráciu. V takom prípade možno za najnižšiu zo série koncentrácií doplniť dodatočnú koncentráciu. Ostatné koncentrácie v sérii zostávajú nezmenené.

35. Roztoky s testovanou chemikáliou je potrebné pri pridávaní do skúšobnej jamky pozorne sledovať, pretože testovaná chemikália sa pri pridaní do skúšobnej jamky môže zraziť. Údaje pre všetky jamky, ktoré obsahujú zrazeninu, sa vylúčia spomedzi údajov použitých na zostrojenie krivky a uvedie sa dôvod vylúčenia.

36. Ak existujú predchádzajúce informácie z iných zdrojov, na základe ktorých možno získať hodnotu log(IC_{50}) testovanej chemikálie, riedenia môže byť vhodné geometricky rozmiestniť [t. j. po 0,5 logaritmickej jednotky okolo očakávanej hodnoty log(IC_{50})]. Z konečného výsledku by malo vyplývať dostatočné rozpätie koncentrácií po oboch stranách hodnoty log(IC_{50}), a to vrátane horného a dolného bodu, aby bolo možné dostatočne charakterizovať väzbovú krivku.

Usporiadanie skúšobnej mikrotitračnej platničky

37. Pripravia sa označené mikrotitračné platničky, pričom sa zohľadní použitie šesťnásobných inkubácií s kódmi pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, najvyššiu koncentráciu referenčného estrogénu, ktorá slúži aj ako indikátor nešpecifickej väzby (NSB), a kontrolu s tlmivým roztokom, ako aj použitie trojnásobných inkubácií s kódmi pre každú z ôsmich koncentrácií kontroly nevytvárajúcej väzbu (oktyltrietoxysilán), každú zo siedmich nižších koncentrácií referenčného estrogénu, každú z ôsmich úrovní koncentrácie dávky pre látku vytvárajúcu slabú väzbu a každú z ôsmich koncentrácií každej testovanej chemikálie (TC). V tabuľke 4 ďalej sa uvádza schéma mikrotitračnej platničky s príkladom rozloženia pre úplné krivky koncentrácie referenčného estrogénu a kontroly. Ďalšie mikrotitračné platničky sa použijú pre testované chemikálie, pričom ich súčasťou sú kontroly na mikrotitračnej platničke, t. j. 1. vysoká (maximálna miera premiestnenia) a stredná (približne na úrovni IC_{50}) koncentrácia E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to každá z nich trojmo; 2. kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifická väzba, každá z nich šesťkrát (tabuľka 5). Príklad pracovného listu s rozložením na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby pri použití troch neznámych testovaných chemikálií sa uvádza v dodatku 2.3. Koncentrácie uvedené v tabuľkách 4 a 5 predstavujú konečné koncentrácie skúšky. Maximálna koncentrácia E2 má byť 1×10^{-7} M a v prípade látky vytvárajúcej slabú väzbu sa použije najvyššia koncentrácia pre danú látku vytvárajúcu slabú väzbu na mikrotitračnej platničke 1. Koncentráciu IC_{50} musí stanoviť laboratórium na základe svojej databázy historických kontrol. Očakáva sa, že táto hodnota bude podobná ako hodnota zistená pri validačných štúdiách (pozri tabuľku 1).

Tabuľka 4

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby, úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (mikrotitračná platnička 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (len rozpúšťadlo)			TB (len rozpúšťadlo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepý pokus (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slepý pokus (pre označené) (**)			Slepý pokus (pre označené) (**)			Kontrola s tlmivým roztokom			Kontrola s tlmivým roztokom		

V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).
(*) skutočný slepý pokus, jamka sa nepoužíva.
(**) slepý pokus, ktorý sa nepoužíva počas inkubácie, ale slúži na potvrdenie celkovej pridanej rádioaktivity.

Tabuľka 5

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby, úplné krivky koncentrácie pre testované chemikálie a kontroly na mikrotitračnej platničke

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (len rozpúšťadlo)			TB (len rozpúšťadlo)			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 ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).

Dokončenie skúšky kompetitívnej väzby

38. Ako sa uvádza v tabuľke 6, do jamiek sa pridá 80 µl kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, kontroly s tlmivým roztokom, referenčného estrogénu, látky vytvárajúcej slabú väzbu, látky nevytvárajúcej väzbu a testovaných chemikálií pripravených v tlmivom skúšobnom roztoku. Potom sa do každej jamky pridá 40 µl roztoku [3H]-17β-estradiolu s koncentráciou 4 nM. Po miernom otáčaní počas 10 až 15 minút pri teplote 2 až 8 °C sa pridá 40 µl roztoku hrERα. Skúšobné mikrotitračné platničky sa inkubujú 16 až 20 hodín pri teplote 2 až 8 °C a počas inkubačného času sú umiestnené v rotátore.

Tabuľka 6

Objem zložiek skúšky kompetitívnej väzby na hrER, mikrotitračné platničky

Objem (µl)	Zložka
80	neoznačený 17β-estradiol, noretynodrel, OTES, testované chemikálie, rozpúšťadlo alebo tlmivý roztok
40	roztok [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 4 nM
40	roztok hrERα v stanovenej koncentrácii
160	***celkový objem v každej skúšobnej jamke***

39. Ďalej sa po separácii [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 80 µl studenej suspenzie DCC do každej jamky uskutoční kvantifikácia tohto [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα, ako sa opisuje v odsekoch 20 – 23 pre skúšku saturačnej väzby.

40. Jamky H1 – 6 [uvedené v tabuľke 4 ako slepý pokus (pre označené)] predstavujú hodnotu dpm estradiolu označeného pomocou [^{3}H] v objeme 40 µl. Alikvotná časť v objeme 40 µl sa prenesie priamo do scintilačnej kvapaliny v jamkách H1 – H6.

Kritériá Prijateľnosti

Skúška saturačnej väzby

41. Pri použití zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu má krivka špecifickej väzby dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom, čo potvrdzuje, že došlo k saturácii hrERα ligandom.

42. Špecifická väzba pri koncentrácii 1 nM [3H]-17β-estradiolu má byť v rámci prijateľného rozsahu 15 % až 25 % priemernej nameranej celkovej rádioaktivity pridanej v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny a zopakovať skúšku saturácie.

43. Na základe údajov má vzniknúť lineárne Scatchardovo znázornenie.

44. Nešpecifická väzba nemá byť nadmerná. Hodnota nešpecifickej väzby má zvyčajne predstavovať < 35 % celkovej väzby. Pri meraní veľmi nízkej hodnoty dpm pre najnižšiu testovanú koncentráciu 17β-estradiolu označeného rádioizotopom však môže príslušný pomer príležitostne prekročiť tento limit.

Skúška kompetitívnej väzby

45. Pri zvyšujúcich sa koncentráciách neoznačeného 17β-estradiolu má dôjsť k premiestneniu [^{3}H]-17β-estradiolu z receptora spôsobom, ktorý zodpovedá kompetitívnej väzbe na jedno miesto.

46. Hodnota IC_{50} pre referenčný estrogén (t. j. 17β-estradiol) sa má približne rovnať súčtu molárnej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu a hodnoty K_d určenej v skúške saturačnej väzby.

47. Celková špecifická väzba má byť konzistentne v prijateľnom rozsahu 20 ±5 % v prípade priemernej nameranej koncentrácie celkovej rádioaktivity pridanej do každej jamky na úrovni 1 nM v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny.

48. Rozpúšťadlo nemá meniť citlivosť ani reprodukovateľnosť skúšky. Výsledky kontroly s aplikáciou rozpúšťadla (jamky TB) sa porovnajú s kontrolou s tlmivým roztokom s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém. Ak nedochádza k vplyvu rozpúšťadla na skúšku, výsledky kontroly TB a kontroly s tlmivým roztokom majú byť porovnateľné.

49. Látka nevytvárajúca väzbu nemá premiestniť z hrERα viac než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu pri testovaní do 10^{-3} M (OTES) alebo 10^{-4} M (DBP).

50. Boli vytvorené kritériá výkonnosti pre referenčný estrogén a dve látky vytvárajúce slabú väzbu (napr. noretynodrel, noretindrón) pomocou údajov z validačnej štúdie skúšky FW väzby na hrER (príloha N v odkaze 2). 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú pre priemer (n) +/– SD pre všetky kontrolné testovacie cykly v laboratóriách zapojených do validačnej štúdie. 95 % intervaly spoľahlivosti sa vypočítali pre parametre zostrojenia krivky [t. j. horný bod, dolný bod, sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope), logIC_{50}] pre referenčný estrogén a látky vytvárajúce slabú väzbu a pre $\log_{10}$RBA látok vytvárajúcich slabú väzbu vzhľadom na referenčný estrogén a uvádzajú sa ako kritériá výkonnosti pre pozitívne kontroly. V tabuľke 1 sa uvádzajú očakávané rozsahy pre parametre zostrojenia krivky, ktoré možno použiť ako kritériá výkonnosti. V praxi sa rozsah IC_{50} môže mierne líšiť na základe hodnoty K_d prípravku s receptorom a koncentrácie ligandu.

51. Pokiaľ ide o testované chemikálie, neboli pre ne vytvorené žiadne kritériá výkonnosti pre parametre zostrojenia krivky, a to vzhľadom na široké spektrum existujúcich potenciálnych testovaných chemikálií a variabilitu potenciálnych afinít a výsledkov (napr. úplná krivka, čiastočná krivka, nemožnosť zostrojenia krivky). Pri posudzovaní výsledkov v prípade testovanej chemikálie z jednotlivých testovacích cyklov je však potrebné postupovať na základe odborného úsudku. Je potrebné použiť dostatočný rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, aby bolo možné jednoznačne určiť vrchol (napr. 90 – 100 % väzby) krivky kompetitívnej väzby. Variabilita medzi replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie, ako aj medzi tromi nesúbežnými testovacími cyklami má byť primeraná a vedecky odôvodniteľná. Kontroly z jednotlivých testovacích cyklov testovanej chemikálie sa majú približovať mieram výkonnosti uvádzaným pre túto skúšku FW a majú byť v súlade s údajmi o historických kontrolách z jednotlivých príslušných laboratórií.

ANALÝZA ÚDAJOV

Skúška saturačnej väzby

52. Meria sa celková väzba, ako aj nešpecifická väzba. Z týchto hodnôt sa vypočíta špecifická väzba zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu v rovnovážnych podmienkach, a to odpočítaním hodnoty nešpecifickej väzby od celkovej väzby. Graf špecifickej väzby vzhľadom na koncentráciu [^{3}H]-17β-estradiolu by mal dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom pri maximálnej špecifickej väzbe, čo signalizuje saturáciu hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Okrem toho by sa analýzou údajov malo zdokumentovať naviazanie [^{3}H]-17β-estradiolu na jedno väzbové miesto s vysokou afinitou. Na krivke saturačnej väzby sa má znázorniť nešpecifická, celková a špecifická väzba. Pri ďalšej analýze týchto údajov sa použije nelineárna regresná analýza (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením týchto údajov v podobe Scatchardovho znázornenia.

53. Pri analýze údajov sa údaje B_{max} a K_d určujú len z údajov o celkovej väzbe, a to na základe predpokladu, že nešpecifická väzba je lineárna, pokiaľ nie je odôvodnené použitie odlišnej metódy. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má okrem toho použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Zvolenú metódu spoľahlivej regresie je potrebné uviesť. Pri určovaní hodnôt B_{max} a K_d z údajov o saturačnej väzbe sa má vždy použiť korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov (napr. pomocou Swillensovej metódy, 1995).

Skúška kompetitívnej väzby

54. Krivka kompetitívnej väzby sa zostrojí tak, aby vyjadrovala vzťah medzi špecifickou väzbou [^{3}H]-17β-estradiolu a koncentráciou (jednotky dekadického logaritmu) konkurenta. Koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % maximálnej špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu, predstavuje hodnotu IC_{50}.

55. Odhady hodnôt log(IC_{50}) pre pozitívne kontroly (napr. referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu) sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Horný bod, dolný bod, sklon a hodnota log(IC_{50}) majú pri zostrojovaní týchto kriviek zostať vo všeobecnosti bez obmedzení. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Nepoužíva sa korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov. Po počiatočnej analýze sa každá väzbová krivka posúdi, aby sa zabezpečilo, že je primerane zostrojená podľa modelu. Relatívna afinita (RBA) látky vytvárajúcej slabú väzbu sa vypočíta ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) látky vytvárajúcej slabú väzbu vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol. Výsledky z pozitívnych kontrol a z kontroly s látkou nevytvárajúcou väzbu sa vyhodnotia pomocou meraní výkonnosti skúšky uvedených v odsekoch 45 – 50 v tomto dodatku 2.

56. Na analýzu údajov pre všetky testované chemikálie sa použije prístup v postupných krokoch, aby sa zabezpečila primeraná analýza všetkých údajov a správna klasifikácia jednotlivých kriviek kompetitívnej väzby. Odporúča sa, aby sa pri každom testovacom cykle pre testovanú chemikáliu uskutočnila štandardizovaná analýza údajov, ktorá sa zhoduje s analýzou použitou v prípade kontrol s referenčným estrogénom a látkou vytvárajúcou slabú väzbu (pozri odsek 55). Po jej dokončení sa uskutoční technické posúdenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby pri každom testovacom cykle. Vhodným ukazovateľom správneho uskutočnenia skúšky a analýz údajov počas tohto technického posúdenia je to, keď sa pozoruje zníženie percentuálneho podielu špecificky viazaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti od koncentrácie, nízka variabilita medzi technickými replikátmi pri jednotlivých chemických koncentráciách a konzistentnosť parametrov zostrojenia medzi tromi testovacími cyklami.

Interpretácia údajov

57. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku vytvárajúcu väzbu na hrERα, ak možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 % (obrázok 1).
58. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku nevytvárajúcu väzbu na hrERα, ak:
    — možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 % alebo
    — nemožno zostrojiť väzbovú krivku a najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.
59. Testovaná chemikália sa pokladá za nejednoznačnú, ak nie je splnená ani jedna z uvedených podmienok (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

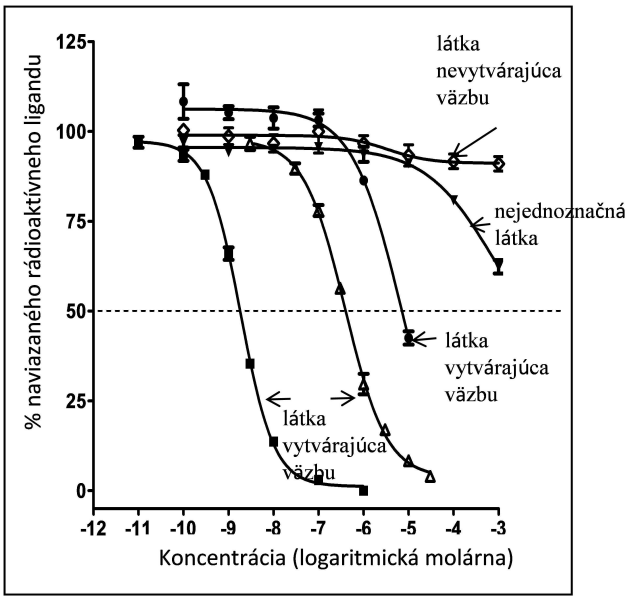
Tabuľka 7

Kritériá na priradenie klasifikácie na základe krivky kompetitívnej väzby testovanej chemikálie

Klasifikácia	Kritériá
Látka vytvárajúca väzbu[a]	Je možné zostrojiť väzbovú krivku. **Najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 %.**
Látka nevytvárajúca väzbu[b]	Ak je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.** Ak nie je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.**
Nejednoznačná látka[c]	Akýkoľvek uskutočniteľný testovací cyklus, ktorého výsledkom nie je látka vytvárajúca väzbu ani látka nevytvárajúca väzbu (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

Obrázok 1

Príklady klasifikácie testovanej chemikálie pomocou krivky kompetitívnej väzby.



60. Viaceré testovacie cykly uskutočnené pre určitú testovanú chemikáliu v rámci laboratória sa skombinujú tak, že sa každému testovaciemu cyklu priradí číselná hodnota a stanoví sa priemer za testovacie cykly podľa znázornenia v tabuľke 8. Výsledky kombinovaných testovacích cyklov v rámci jednotlivých laboratórií sa porovnajú s očakávanou klasifikáciou jednotlivých testovaných chemikálií.

Tabuľka 8

Metóda klasifikácie testovanej chemikálie pomocou viacerých testovacích cyklov v rámci laboratória

Priradenie hodnoty každému testovaciemu cyklu:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	2
nejednoznačná látka	1
látka nevytvárajúca väzbu	0
Klasifikácia priemeru číselných hodnôt medzi testovacími cyklami:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	priemer ≥ 1,5
nejednoznačná látka	0,5 ≤ priemer < 1,5
látka nevytvárajúca väzbu	priemer < 0,5

SPRÁVA O TESTE

61. Pozri odsek 24 v časti **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER** tejto testovacej metódy.

Dodatok 2.1

ZOZNAM TERMÍNOV

[^{3}H]E2: 17β-estradiol rádioaktívne označený tríciom

DCC: uhlie povrchovo upravené dextránom

E_2: neoznačený 17β-estradiol (inertný)

Tlmivý skúšobný roztok: tris 10 mM, bovinný sérový albumín 10 mg/ml, DTT 2 mM, glycerol 10 %, leupeptín 0,2 mM, pH 7,5

hrERα: ľudský rekombinantný estrogénový receptor alfa

Replikát: jedna z viacerých jamiek, ktoré obsahujú rovnaký obsah v rovnakých koncentráciách a skúšajú sa súbežne v rámci jedného testovacieho cyklu. V tomto protokole sa každá koncentrácia testovanej chemikálie testuje trojmo, t. j. existujú tri replikáty, ktoré sa skúšajú súbežne pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací cyklus: úplná množina súbežne spracúvaných skúšobných jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá poskytuje všetky informácie potrebné na charakterizovanie väzby testovanej chemikálie na hrERα (t. j. celkový [^{3}H]-17β-estradiol pridaný do skúšobnej jamky, maximálna väzba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nešpecifická väzba a celková väzba pri rôznych koncentráciách testovanej chemikálie). Testovací cyklus by mohol obsahovať len jednu skúšobnú jamku (t. j. replikát) na koncentráciu, ale vzhľadom na to, že v rámci tohto protokolu sa vyžaduje skúšanie trojmo, každý testovací cyklus obsahuje tri skúšobné jamky na koncentráciu. Okrem toho sa v tomto protokole vyžadujú tri nezávislé (t. j. nesúbežné) testovacie cykly na chemikáliu.

Dodatok 2.2

TYPICKÁ SATURAČNÁ SKÚŠKA [^{3}H]-17B-ESTRADIOLU S TROMI JAMKAMI S REPLIKÁTMI

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi											
Pozícia	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Objem označeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem neoznačeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem tlmivého roztoku (µl)**	**Objem receptora (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
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

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi											
Pozícia	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Objem označeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem neoznačeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem tlmivého roztoku (µl)**	**Objem receptora (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
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

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi											
Pozícia	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Objem označeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem neoznačeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem tlmivého roztoku (µl)**	**Objem receptora (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
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	Označené	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Označené	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Označené	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Označené	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Označené	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Označené	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Označené	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Označené	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Označené	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Označené	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Označené	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Označené	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Označené	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Označené	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Označené	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Označené	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi

Pozícia	Replikát	Kód typu jamky	Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)	Objem označeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)	Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem neoznačeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem receptora (µl)	Celkový objem v jamkách
H5	2	Označené	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Označené	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Označené	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Označené	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Označené	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Označené	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Označené	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Označené	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

„Označené“ jamky sú počas inkubácie prázdne. Objem 40 µl sa pridáva len na účely scintilačnej spektroskopie.

Dodatok 2.3

ROZLOŽENIE JAMIEK PRI SKÚŠKE KOMPETITÍVNEJ VÄZBY

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	A1	1	celková väzba	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	celková väzba	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	celková väzba	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	celková väzba	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	celková väzba	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	celková väzba	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A8	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A9	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	B1	1	neoznačený E2	S	S1	2,00E–07	40	—	40	80	160	1,0E–07
S	B2	2	neoznačený E2	S	S1	2,00E–07	40	—	40	80	160	1,0E–07
S	B3	3	neoznačený E2	S	S1	2,00E–07	40	—	40	80	160	1,0E–07
S	B4	1	neoznačený E2	S	S2	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	B5	2	neoznačený E2	S	S2	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	B6	3	neoznačený E2	S	S2	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	B7	1	neoznačený E2	S	S3	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	B8	2	neoznačený E2	S	S3	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	B9	3	neoznačený E2	S	S3	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	B10	1	neoznačený E2	S	S4	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	B11	2	neoznačený E2	S	S4	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	B12	3	neoznačený E2	S	S4	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	C1	1	neoznačený E2	S	S5	6,00E–10	40	—	40	80	160	3,0E–10
S	C2	2	neoznačený E2	S	S5	6,00E–10	40	—	40	80	160	3,0E–10
S	C3	3	neoznačený E2	S	S5	6,00E–10	40	—	40	80	160	3,0E–10
S	C4	1	neoznačený E2	S	S6	2,00E–10	40	—	40	80	160	1,0E–10
S	C5	2	neoznačený E2	S	S6	2,00E–10	40	—	40	80	160	1,0E–10
S	C6	3	neoznačený E2	S	S6	2,00E–10	40	—	40	80	160	1,0E–10
S	C7	1	neoznačený E2	S	S7	2,00E–11	40	—	40	80	160	1,0E–11
S	C8	2	neoznačený E2	S	S7	2,00E–11	40	—	40	80	160	1,0E–11
S	C9	3	neoznačený E2	S	S7	2,00E–11	40	—	40	80	160	1,0E–11
S	C10	1	slepý pokus	blank	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	slepý pokus	blank	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	slepý pokus	blank	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	D2	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	D3	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E–05	40	—	40	80	160	1,0E–05
S	D5	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E–05	40	—	40	80	160	1,0E–05
S	D6	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E–05	40	—	40	80	160	1,0E–05

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	D7	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E–06	40	—	40	80	160	3,0E–06
S	D8	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E–06	40	—	40	80	160	3,0E–06
S	D9	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E–06	40	—	40	80	160	3,0E–06
S	D10	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	D11	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	D12	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	E1	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E–07	40		40	80	160	3,0E–07
S	E2	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E–07	40		40	80	160	3,0E–07
S	E3	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E–07	40		40	80	160	3,0E–07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP	2,00E–07	40		40	80	160	1,0E–07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP	2,00E–07	40		40	80	160	1,0E–07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP	2,00E–07	40		40	80	160	1,0E–07
S	E7	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E–08	40	—	40	80	160	3,0E–08
S	E8	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E–08	40	—	40	80	160	3,0E–08
S	E9	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E–08	40	—	40	80	160	3,0E–08
S	E10	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	E11	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	E12	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E–03	40	—	40	80	160	1,0E–03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E–03	40	—	40	80	160	1,0E–03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E–03	40	—	40	80	160	1,0E–03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E–04	40	—	40	80	160	1,0E–04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E–04	40	—	40	80	160	1,0E–04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E–04	40	—	40	80	160	1,0E–04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E–07	40	—	40	80	160	3,0E–07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E–07	40	—	40	80	160	3,0E–07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E–07	40	—	40	80	160	3,0E–07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E–10	40	—	40	—	160	1,0E–10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E–10	40	—	40	—	160	1,0E–10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E–10	40	—	40	—	160	1,0E–10
S	H1	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

„Označené“ jamky sú počas inkubácie prázdne. Objem 40 µl sa pridáva len na účely scintilačnej spektroskopie.

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	A1	1	celková väzba	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	celková väzba	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	celková väzba	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	celková väzba	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	celková väzba	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	celková väzba	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A8	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A9	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	B1	1	Testovaná chemikália 1	TC1	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	B2	2	Testovaná chemikália 1	TC1	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	B3	3	Testovaná chemikália 1	TC1	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	B4	1	Testovaná chemikália 1	TC1	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	B5	2	Testovaná chemikália 1	TC1	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	B6	3	Testovaná chemikália 1	TC1	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	B7	1	Testovaná chemikália 1	TC1	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	B8	2	Testovaná chemikália 1	TC1	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	B9	3	Testovaná chemikália 1	TC1	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	B10	1	Testovaná chemikália 1	TC1	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	B11	2	Testovaná chemikália 1	TC1	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	B12	3	Testovaná chemikália 1	TC1	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	C1	1	Testovaná chemikália 1	TC1	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	C2	2	Testovaná chemikália 1	TC1	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	C3	3	Testovaná chemikália 1	TC1	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	C4	1	Testovaná chemikália 1	TC1	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	C5	2	Testovaná chemikália 1	TC1	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	C6	3	Testovaná chemikália 1	TC1	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	C7	1	Testovaná chemikália 1	TC1	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	C8	2	Testovaná chemikália 1	TC1	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	C9	3	Testovaná chemikália 1	TC1	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	C10	1	Testovaná chemikália 1	TC1	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	C11	2	Testovaná chemikália 1	TC1	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	C12	3	Testovaná chemikália 1	TC1	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	D1	1	Testovaná chemikália 2	TC2	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	D2	2	Testovaná chemikália 2	TC2	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	D3	3	Testovaná chemikália 2	TC2	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	D4	1	Testovaná chemikália 2	TC2	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	D5	2	Testovaná chemikália 2	TC2	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	D6	3	Testovaná chemikália 2	TC2	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	D7	1	Testovaná chemikália 2	TC2	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	D8	2	Testovaná chemikália 2	TC2	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	D9	3	Testovaná chemikália 2	TC2	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	D10	1	Testovaná chemikália 2	TC2	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	D11	2	Testovaná chemikália 2	TC2	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	D12	3	Testovaná chemikália 2	TC2	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	E1	1	Testovaná chemikália 2	TC2	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	E2	2	Testovaná chemikália 2	TC2	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	E3	3	Testovaná chemikália 2	TC2	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	E4	1	Testovaná chemikália 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	E5	2	Testovaná chemikália 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	E6	3	Testovaná chemikália 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	E7	1	Testovaná chemikália 2	TC2	7	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	E8	2	Testovaná chemikália 2	TC2	7	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	E9	3	Testovaná chemikália 2	TC2	7	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	E10	1	Testovaná chemikália 2	TC2	8	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	E11	2	Testovaná chemikália 2	TC2	8	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	E12	3	Testovaná chemikália 2	TC2	8	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	F1	1	Testovaná chemikália 3	TC3	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	F2	2	Testovaná chemikália 3	TC3	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	F3	3	Testovaná chemikália 3	TC3	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	F4	1	Testovaná chemikália 3	TC3	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	F5	2	Testovaná chemikália 3	TC3	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	F6	3	Testovaná chemikália 3	TC3	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	F7	1	Testovaná chemikália 3	TC3	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	F8	2	Testovaná chemikália 3	TC3	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	F9	3	Testovaná chemikália 3	TC3	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	F10	1	Testovaná chemikália 3	TC3	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	F11	2	Testovaná chemikália 3	TC3	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	F12	3	Testovaná chemikália 3	TC3	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	G1	1	Testovaná chemikália 3	TC3	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	G2	2	Testovaná chemikália 3	TC3	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	G3	3	Testovaná chemikália 3	TC3	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	G4	1	Testovaná chemikália 3	TC3	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	G5	2	Testovaná chemikália 3	TC3	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	G6	3	Testovaná chemikália 3	TC3	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	G7	1	Testovaná chemikália 3	TC3	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	G8	2	Testovaná chemikália 3	TC3	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	G9	3	Testovaná chemikália 3	TC3	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	G10	1	Testovaná chemikália 3	TC3	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	G11	2	Testovaná chemikália 3	TC3	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	G12	3	Testovaná chemikália 3	TC3	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	H1	1	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretynodrel	NE		1,00E–4,-5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretynodrel	NE		1,00E–4,-5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretynodrel	NE		1,00E–4,-5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neoznačený E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neoznačený E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neoznačený E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neoznačený E2 S			1,00E–7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neoznačený E2 S			1,00E–7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neoznačený E2 S			1,00E–7	40	0	40	80	160	

Dodatok 3

SKÚŠKA *IN VITRO* VÄZBY NA ESTROGÉNOVÝ RECEPTOR ORGANIZÁCIE CERI (CHEMICALS EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE) POMOCOU ĽUDSKEJ REKOMBINANTNEJ BIELKOVINY ERA S DOMÉNOU VIAŽUCOU LIGAND

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške *in vitro* saturačnej a kompetitívnej väzby na estrogénový receptor (ERα) sa využíva doména viažuca ligand (LBD) ľudského estrogénového receptora ERα (hrERα). Tento model bielkoviny, ktorý vytvorila japonská organizácia CERI (Chemicals Evaluation Research Institute), existuje v podobe fúzneho proteínu glutatión-S-transferázy (GST) a je exprimovaný v *E. coli*. Protokol CERI sa posudzoval v rámci medzinárodnej medzilaboratórnej validačnej štúdie (2), ktorou sa preukázala jeho relevantnosť a spoľahlivosť na zamýšľaný účel tejto skúšky.

2. Táto skúška predstavuje skríningový postup na identifikovanie látok, ktoré sa dokážu viazať na hrERα. Slúži na stanovenie schopnosti testovanej chemikálie konkurovať 17β-estradiolu pri viazaní sa na hrERα-LBD. Súčasťou kvantitatívnych výsledkov skúšky môže byť hodnota IC_{50} (miera koncentrácie testovanej chemikálie, ktorá je potrebná na premiestnenie polovice [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relatívne afinity testovaných chemikálií k hrERα v porovnaní so 17β-estradiolom. Na účely skríningu chemikálií môžu prijateľné kvalitatívne výsledky skúšky zahŕňať klasifikáciu testovaných chemikálií ako látok vytvárajúcich väzbu na hrERα, látok nevytvárajúcich väzbu alebo nejednoznačných látok na základe kritérií opísaných pre väzbové krivky.

3. Pri skúške sa používa ligand označený rádioizotopom, laboratórium preto musí mať povolenie na prácu s rádioaktívnymi materiálmi. Pri všetkých postupoch s rádioizotopmi a nebezpečnými chemikáliami je potrebné dodržiavať nariadenia a postupy opísané vo vnútroštátnych právnych predpisoch.

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti **VŠEOBECNÝ ÚVOD** a **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER**. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tomto usmernení na vykonávanie testov sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍPY SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. V rámci skúšky väzby na hrERα sa meria schopnosť ligandu označeného rádioizotopom ([^{3}H]17β-estradiol) viazať sa na ER v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie (t. j. konkurenta). Testované chemikálie, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou k ER, si konkurujú s ligandom označeným rádioizotopom pri nižšej koncentrácii v porovnaní s chemikáliami, ktorých afinita k receptoru je nižšia.

6. Táto skúška obsahuje dve hlavné zložky: pokus na základe saturačnej väzby, ktorým sa charakterizujú parametre interakcie medzi receptorom a ligandom, po ktorom nasleduje pokus na základe kompetitívnej väzby, ktorým sa charakterizuje vzájomné konkurovanie si testovanej chemikálie a ligandu označeného rádioizotopom pri snahe o naviazanie sa na ER.

7. Účelom pokusu na základe saturačnej väzby je charakterizovať konkrétnu šaržu receptorov z hľadiska afinity a počtu v prípravku pre pokus na základe kompetitívnej väzby. Pri pokuse na základe saturačnej väzby sa v rovnovážnych podmienkach meria afinita pevne stanovenej koncentrácie estrogénového receptora k svojmu prirodzenému ligandu (vyjadruje ju disociačná konštanta, K_d) a koncentrácia aktívnych miest receptora (B_{max}).

8. Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria afinita látky z hľadiska konkurovania si s [^{3}H]17β-estradiolom pri viazaní sa na ER. Afinita sa kvantifikuje na základe koncentrácie testovanej chemikálie, pri ktorej v rovnovážnom stave dochádza k inhibícii 50 % špecifickej väzby [^{3}H]17β-estradiolu (označuje sa ako „inhibičná koncentrácia 50 %“ alebo IC_{50}). Vyhodnotenie je možné aj pomocou relatívnej afinity (RBA, vzhľadom na hodnotu IC_{50} estradiolu pri samostatnom meraní v tom istom testovacom cykle). Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria viazanie sa [^{3}H]17β-estradiolu v pevnej stanovenej koncentrácii v prítomnosti širokého rozsahu (osem rádov) koncentrácií testovanej chemikálie. Tieto údaje sa potom prispôsobia, ak je to možné, podobe Hillovej rovnice (Hill, 1910), ktorou sa opisuje premiestnenie rádioaktívneho ligandu látkou vytvárajúcou väzbu, ktorá mu konkuruje na jednom mieste. Rozsah premiestnenia estradiolu označeného rádioizotopom v rovnovážnom stave slúži na charakterizovanie testovanej chemikálie ako látky vytvárajúcej väzbu, nevytvárajúcej väzbu alebo spôsobujúcej nejednoznačnú reakciu.

POSTUP

Preukázanie prijateľnej výkonnosti bielkoviny hrERα

9. Pred bežným vykonávaním skúšok saturačnej a kompetitívnej väzby je potrebné preukázať správnu výkonnosť každej novej šarže hrERα v laboratóriu, v ktorom sa bude používať. Na preukázanie výkonnosti sa použije dvojstupňový postup. Skladá sa z týchto krokov:
   — Uskutoční sa skúška saturačnej väzby [3H]-17β-estradiolu s cieľom preukázať špecifickosť a saturáciu hrERα. Na základe nelineárnej regresnej analýzy týchto údajov (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a následného Scatchardovho znázornenia sa zdokumentuje afinita [3H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorov (B_{max}) pre príslušnú šaržu hrERα.
   — Uskutoční sa skúška kompetitívnej väzby pomocou kontrolných látok [referenčný estrogén (17β-estradiol), látka vytvárajúca slabú väzbu (napr. noretynodrel alebo noretindrón) a látka nevytvárajúca väzbu (oktyltrietoxysilán, OTES)]. Každé laboratórium si vytvorí historickú databázu na zdokumentovanie konzistentnosti hodnoty IC_{50} a relevantných hodnôt pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu medzi pokusmi a rôznymi šaržami hrERα. Okrem toho majú byť parametre kriviek kompetitívnej väzby pre kontrolné látky v rámci hraníc 95 % intervalu spoľahlivosti (pozri tabuľku 1), ktoré sa vytvorili na základe údajov z laboratórií zapojených do validačnej štúdie tejto skúšky (2).

Tabuľka 1

Kritériá výkonnosti vytvorené pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu, skúška CERI väzby na hrER

Látka	parameter	Stredná hodnota [a]	Štandardná odchýlka (n)	95 % intervaly spoľahlivosti [b]	
				Dolná hranica	Horná hranica
17β-estradiol	Horný bod	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dolný bod	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretynodrel	Horný bod	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dolný bod	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindrón [c]	Horný bod	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dolný bod	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Stredná hodnota ± štandardná odchýlka (SD) s veľkosťou vzorky (n) sa vypočítali pomocou odhadov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v štyroch laboratóriách počas validačnej štúdie (pozri prílohu N v odkaze 2).

[b] 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú ako usmernenie pre kritériá prijateľnosti.

[c] V rámci čiastkovej úlohy 4 počas validačnej štúdie bolo testovanie noretindrónu voliteľné (pozri odkaz 2, pozri čiastkovú úlohu 4). Stredné hodnoty ± SD (n) sa tak vypočítali pomocou odhadov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v dvoch laboratóriách.
Rozsah IC_{50} bude závisieť od hodnoty K_d prípravku s receptorom a od koncentrácie ligandu označeného rádioizotopom, ktorá sa používala v jednotlivých laboratóriách. Prijateľná bude vhodná úprava z hľadiska rozsahu IC_{50} na základe podmienok použitých pri uskutočnení štúdie.

Preukázanie spôsobilosti laboratória

10. Pozri odseky 17 a 18 a tabuľku 2 v časti **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER** tejto testovacej metódy. Každá skúška (pre saturačnú a kompetitívnu väzbu) sa skladá z troch nezávislých testovacích cyklov (t. j. s čerstvo pripravenými riedeniami receptora, chemikálií a reagentu) uskutočnených v rôznych dňoch, pričom každý testovací cyklus obsahuje tri replikáty.

Stanovenie koncentrácie receptora (hrERα)

11. Koncentrácia aktívneho receptora sa mierne líši v závislosti od šarže a podmienok skladovania. Je preto potrebné stanoviť koncentráciu aktívneho receptora pri jeho prijatí od dodávateľa. Zistí sa tak vhodná koncentrácia aktívneho receptora v čase testovacieho cyklu.

12. V podmienkach zodpovedajúcich kompetitívnej väzbe (t. j. [^{3}H]-estradiol s koncentráciou 0,5 nM) sa nominálne koncentrácie 0,1, 0,2, 0,4 a 0,6 nM receptora inkubujú bez prítomnosti (celková väzba) a v prítomnosti (nešpecifická väzba) neoznačeného estradiolu s koncentráciou 1 µM. Špecifická väzba vypočítaná ako rozdiel celkovej a nešpecifickej väzby sa znázorní v závislosti od nominálnej koncentrácie receptora. Koncentrácia receptora, ktorá poskytuje hodnoty špecifickej väzby zodpovedajúce 40 % pridaného rádioaktívneho indikátora, súvisí so zodpovedajúcou koncentráciou receptora a táto koncentrácia receptora sa má použiť pre pokusy na základe saturačnej a kompetitívnej väzby. Táto podmienka bude často splnená pri konečnej koncentrácii hrER na úrovni 0,2 nM.

13. Ak toto 40 % kritérium opakovane nemožno splniť, je potrebné skontrolovať výskyt potenciálnych chýb v pokusnom systéme. Nesplnenie 40 % kritéria môže signalizovať, že sa v rekombinantnej šarži nachádza veľmi malé množstvo aktívneho receptora. V takom prípade je potrebné zvážiť použitie inej šarže receptora.

Saturačná skúška

14. Osem zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]17β-estradiolu sa vyhodnocuje trojmo pri týchto troch podmienkach (pozri tabuľku 2):

a) bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Stanovuje sa tak celková väzba meraním rádioaktivity v jamkách, v ktorých sa nachádza len [^{3}H]17β-estradiol,

b) v prítomnosti 2000-násobnej nadmernej koncentrácie neoznačeného 17β-estradiolu oproti označenému 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Zámerom tejto podmienky je saturovať aktívne väzbové miesta neoznačeným 17β-estradiolom a určiť nešpecifickú väzbu meraním rádioaktivity v jamkách. Pri všetkom zvyšnom označenom estradiole, ktorý sa môže naviazať na receptor, sa predpokladá, že sa viaže na nešpecifické miesto, keďže neoznačený estradiol má takú vysokú koncentráciu, že sa viaže na všetky dostupné špecifické miesta na receptore,

c) bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a bez prítomnosti ER (stanovenie celkovej rádioaktivity).

Príprava roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu, neoznačeného 17β-estradiolu a hrERα

15. Roztok [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 40 nM sa pripraví zo zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 1 µM v DMSO, a to pridaním DMSO (na prípravu koncentrácie 200 nM) a tlmivého skúšobného roztoku pri izbovej teplote (na prípravu koncentrácie 40 nM). Pomocou tohto roztoku s koncentráciou 40 nM sa pripravia série riedení [^{3}H]-17β-estradiolu v rozsahu od 0,313 nM do 40 nM s tlmivým skúšobným roztokom pri izbovej teplote (ako sa uvádza v stĺpci 12 tabuľky 2). Konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,0313 do 4,0 nM sa získajú pridaním 10 µl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (pozri tabuľky 2 a 3). Príprava tlmivého skúšobného roztoku, výpočet pôvodného zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu na základe jeho špecifickej aktivity, príprava riedení a stanovenie koncentrácií sa podrobne opisujú v protokole skúšky CERI (2).

16. Riedenia roztokov neoznačeného 17β-estradiolu sa pripravia zo zásobného roztoku 17β-estradiolu s koncentráciou 1 nM pridaním tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahlo osem zvyšujúcich sa koncentrácií v pôvodnom rozsahu od 0,625 μM do 80 μM. Konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,0625 do 8 μM sa získajú pridaním 10 μl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke určenej na meranie nešpecifickej väzby (pozri tabuľky 2 a 3). Príprava riedení neoznačeného 17β-estradiolu sa podrobne opisuje v protokole skúšky CERI (2).

17. Použije sa koncentrácia receptora so špecifickou väzbou na úrovni 40 ±10 % (pozri odseky 12 – 13). Roztok hrERα sa pripraví s ľadovým tlmivým skúšobným roztokom bezprostredne pred použitím, t. j. po pripravení všetkých jamiek pre celkovú väzbu, nešpecifickú väzbu a samotný označený ligand.

18. 96-jamkové mikrotitračné platničky sa pripravia podľa znázornenia v tabuľke 2, pričom na každú koncentráciu [^{3}H]-17β-estradiolu sa použijú 3 replikáty. Priradenie objemov [^{3}H]-17β-estradiolu, neoznačeného 17β-estradiolu, tlmivého roztoku a receptora sa uvádza v tabuľke 3.

Tabuľka 2

Rozloženie pri skúške saturačnej väzby na mikrotitračnej platničke

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Na meranie TB			Na meranie NSB			Na určenie samotného označeného ligandu				Riedenia neoznačeného E2 v stĺpcoch 4 – 6 mikrotitračnej platničky	Riedenia [3H]E2 v stĺpcoch 1 – 9 mikrotitračnej platničky
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: celková väzba,
NSB: nešpecifická väzba
[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol
E2: neoznačený 17β-estradiol
(*) Koncentrácie uvedené na tomto mieste predstavujú konečné koncentrácie v jednotlivých jamkách.
(**) Riedenia neoznačeného E2 a [^{3}H] E2 možno pripraviť v inej mikrotitračnej platničke.

Tabuľka 3

Objemy reagentov na mikrotitračnej platničke saturácie

Číslo stĺpca		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Kroky prípravy		Jamky TB			Jamky NSB			Samotný označený ligand		
Objem zložiek pre vyššie uvedené reakčné jamky a poradie pridania	tlmivý roztok	60 µl			50 µl			90 µl		
	neoznačený E2 zo stĺpca 11 v tabuľke 2	—			10 µl			—		
	[3H]E2 zo stĺpca 12 v tabuľke 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Celkový reakčný objem		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubácia		**PO DVOJHODINOVEJ INKUBAČNEJ REAKCII**						Kvantifikácia rádioaktivity bezprostredne po príprave. Bez inkubácie		
Ošetrenie pomocou 0,4 % DCC		**Áno**			**Áno**			**Nie**		
Objem 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			—		
Filtrácia		Áno			Áno			Nie		
MERANIE DPM										
Kvantifikačný objem pridaný do scintilačnej zmesi		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Ak sa na meranie dpm použije metóda kvapalinovej scintilačnej spektroskopie (LSC), nie je vhodná príprava samotného označeného ligandu na rovnakej skúšobnej mikrotitračnej platničke, na akej sa nachádzajú jamky TB a NSB. Samotný označený ligand je potrebné pripraviť na odlišnej mikrotitračnej platničke.

(**) Ak sa na separáciu DCC používa centrifugácia, metódou LSC sa meria 50 µl supernatantu, aby sa predišlo kontaminácii DCC.

19. Skúšobné mikrotitračné platničky na stanovenie celkovej väzby a nešpecifickej väzby sa inkubujú dve hodiny pri izbovej teplote (22 °C až 28 °C).

Meranie [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα

20. Po dvojhodinovom inkubačnom čase sa [^{3}H]-17β-estradiol viazaný na hrERα separuje od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 100 µl ľadovej suspenzie 0,4 % DCC do jamiek. Mikrotitračné platničky sa potom na 10 minút umiestnia na ľad a reakčná zmes a suspenzia DCC sa prefiltrujú prenesením na filter mikrotitračnej platničky s cieľom odstrániť DCC. 100 µl filtrátu sa potom pridá do scintilačnej kvapaliny do fľaštičiek LSC na stanovenie počtu rozpadov za minútu (dpm) na fľaštičku pomocou kvapalinovej scintilačnej spektroskopie.

21. Ak filter mikrotitračnej platničky nie je k dispozícii, na odstránenie DCC možno použiť centrifugáciu. 50 µl supernatantu obsahujúceho [^{3}H]-17β-estradiol naviazaný na hrERα sa potom veľmi opatrne odoberie, aby nedošlo ku kontaminácii jamiek dotykom DCC, a použije sa na scintilačnú spektroskopiu.

22. Stav samotného označeného ligandu slúži na určenie počtu rozpadov za minútu (dpm) [^{3}H]-17β-estradiolu pridaného do skúšobných jamiek. Kvantifikáciu rádioaktivity je potrebné uskutočniť bezprostredne po príprave. Tieto jamky sa neinkubujú a neošetrujú pomocou suspenzie DCC, ale ich obsah sa prenesie priamo do scintilačnej kvapaliny. Na základe uvedených mier sa preukazuje množstvo [^{3}H]-17β-estradiolu vyjadrené ako počet rozpadov za minútu, ktoré sa pridalo do každej množiny jamiek na určenie celkovej väzby, resp. nešpecifickej väzby.

Skúška kompetitívnej väzby

23. Pri skúške kompetitívnej väzby sa meria väzba jednej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie. V rámci jedného testovacieho cyklu sa pri každej koncentrácii použijú tri súbežné replikáty. Okrem toho sa pri každej testovanej chemikálii uskutočnia tri nesúbežné testovacie cykly. Skúška sa pripraví v jednej alebo vo viacerých 96-jamkových mikrotitračných platničkách.

Kontroly

24. Pri vykonávaní skúšky je súčasťou každého pokusu súbežné rozpúšťadlo a kontroly (t. j. referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu). Úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (t. j. látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú používať na jednej mikrotitračnej platničke pri každom testovacom cykle. Všetky ostatné platničky obsahujú i) vysokú (maximálna miera premiestnenia, t. j. približne úplné premiestnenie ligandu označeného rádioizotopom) a strednú (približne na úrovni IC_{50}) koncentráciu E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to trojmo; ii) kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifickú väzbu, každú z nich trojmo. Postupy prípravy tlmivého skúšobného roztoku, roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a testovanej chemikálie sú podrobne opísané v protokole skúšky CERI (2).

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla:

25. Pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa preukazuje, že rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom nepôsobia, a meria sa aj celková väzba (TB). Uprednostňovaným rozpúšťadlom je DMSO. Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v DMSO, možno prípadne použiť etanol. Koncentrácia DMSO v konečných skúšobných jamkách má byť 2,05 %, pričom ju možno zvýšiť na 2,5 % v prípade, že nie je zabezpečená rozpustnosť testovanej chemikálie. Koncentrácie DMSO vyššie ako 2,5 % sa nemajú používať z dôvodu interferencie vyšších koncentrácií rozpúšťadla so skúškou. V prípade testovaných chemikálií, ktoré nie sú rozpustné v DMSO, ale sú rozpustné v etanole, možno v skúške použiť etanol v maximálnej koncentrácii 2 % bez toho, aby dochádzalo k interferencii.

Kontrola s tlmivým roztokom:

26. Kontrola s tlmivým roztokom (BC) nemá obsahovať rozpúšťadlo ani testovanú chemikáliu, ale má obsahovať všetky ostatné zložky skúšky. Výsledky kontroly s tlmivým roztokom sa porovnajú s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém.

Látka vytvárajúca silnú väzbu (referenčný estrogén)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogénny ligand a s vysokou afinitou sa viaže na podtyp alfa estrogénového receptora. Pre každú skúšku kompetitívnej väzby na hrERα sa pripraví štandardná krivka pomocou neoznačeného 17β-estradiolu, aby bolo možné posúdiť variabilitu pri vykonávaní skúšky v priebehu času v rovnakom laboratóriu. Pripraví sa osem roztokov neoznačeného 17β-estradiolu v DMSO a tlmivom skúšobnom roztoku s konečnými koncentráciami v skúšobných jamkách, ktoré sa použijú pre štandardnú krivku, s takýmito rozstupmi: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Najvyššia koncentrácia neoznačeného 17β-estradiolu (1 μM) slúži ako indikátor nešpecifickej väzby. Táto koncentrácia je v tabuľke 4 odlíšená značkou „NSB“, hoci je takisto súčasťou štandardnej krivky.

Látka vytvárajúca slabú väzbu

28. Použije sa aj látka vytvárajúca slabú väzbu [noretynodrel (CAS 68-23-5) alebo ako alternatíva noretindrón (CAS 68-22-4)] s cieľom preukázať citlivosť jednotlivých pokusov a umožniť posúdenie variability pri vykonávaní skúšky v priebehu času. Pripraví sa osem roztokov látky vytvárajúcej slabú väzbu v DMSO a tlmivom skúšobnom roztoku s takýmito konečnými koncentráciami v skúšobných jamkách: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} a 10^{-9} M.

Látka nevytvárajúca väzbu

29. Oktyltrietoxysilán (OTES, CAS 2943-75-1) sa použije ako negatívna kontrola (látka nevytvárajúca väzbu). Poskytuje istotu, že sa pri uskutočnenej skúške rozpoznajú testované chemikálie, ktoré sa neviažu na hrERα. Pripraví sa osem roztokov látky nevytvárajúcej väzbu v DMSO a tlmivom skúšobnom roztoku s takýmito konečnými koncentráciami v skúšobných jamkách: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Ako alternatívnu látku nevytvárajúcu väzbu možno použiť di-n-butyl-ftalát (DBP, CAS 84-72-2), možno ho však testovať len do koncentrácie 10^{-4} M. Maximálna preukázaná rozpustnosť DBP v skúške je 10^{-4} M.

Koncentrácia hrERα

30. Použije sa také množstvo receptora, aké poskytuje špecifickú väzbu 40 ±10 % (pozri odseky 12 – 13 dodatku 3). Roztok hrERα sa pripraví rozriedením funkčného hrERα v ľadovom tlmivom skúšobnom roztoku bezprostredne pred použitím.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Konečná koncentrácia [^{3}H]-17β-estradiolu v skúšobných jamkách má byť 0,5 nM.

Testované chemikálie

32. V prvom rade je potrebné vykonať test rozpustnosti s cieľom určiť limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie a stanoviť vhodný rozsah koncentrácií, ktorý sa má používať pri vykonávaní testovacieho protokolu. Limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie sa určí najskôr v rozpúšťadle a následne sa potvrdí v podmienkach skúšky. Konečná koncentrácia testovaná v rámci skúšky nemá prekročiť 1 mM. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu je kontrola s aplikáciou rozpúšťadla spolu najmenej s 8 logaritmickými sériovými riedeniami, pričom sa začína pri maximálnej prijateľnej koncentrácii (napr. 1 mM alebo menej podľa limitu rozpustnosti) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny (pozri aj odsek 35 dodatku 3). Po stanovení rozsahu koncentrácií na testovanie sa testovaná chemikália má testovať pomocou 8 logaritmických koncentrácií s vhodnými rozstupmi, ako boli vymedzené v predchádzajúcom teste na zistenie rozsahu. V prípade potreby sa koncentrácie testované v druhom a treťom pokuse príslušne ďalej upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

33. Riedenia testovanej chemikálie sa pripravia v príslušnom rozpúšťadle (pozri odsek 25 dodatku 3). Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v DMSO ani etanole a pri pridaní ďalšieho rozpúšťadla by jeho koncentrácia v konečnej vzorke prekročila prijateľný limit, najvyššia koncentrácia sa môže znížiť na nasledujúcu nižšiu koncentráciu. V takom prípade možno za najnižšiu zo série koncentrácií doplniť dodatočnú koncentráciu. Ostatné koncentrácie v sérii zostávajú nezmenené.

34. Roztoky s testovanou chemikáliou je potrebné pri pridávaní do skúšobnej jamky pozorne sledovať, pretože testovaná chemikália sa pri pridaní do skúšobnej jamky môže zraziť. Údaje pre všetky jamky, ktoré obsahujú zrazeninu, sa vylúčia spomedzi údajov použitých na zostrojenie krivky a uvedie sa dôvod vylúčenia.

35. Ak existujú predchádzajúce informácie z iných zdrojov, na základe ktorých možno získať hodnotu log(IC_{50}) testovanej chemikálie, riedenia môže byť vhodné geometricky rozmiestniť bližšie okolo očakávanej hodnoty log(IC_{50}) (t. j. po 0,5 logaritmickej jednotky). Z konečných výsledkov by malo vyplývať dostatočné rozpätie koncentrácií po oboch stranách hodnoty log(IC_{50}), a to vrátane horného a dolného bodu, aby bolo možné dostatočne charakterizovať väzbovú krivku.

Usporiadanie skúšobnej mikrotitračnej platničky

36. Pomocou šesťnásobných inkubácií sa pripravia označené mikrotitračné platničky určené pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, najvyššiu koncentráciu referenčného estrogénu (E2), ktorá slúži aj ako indikátor nešpecifickej väzby (NSB), a kontrolu s tlmivým roztokom, a trojnásobné inkubácie pre každú z ôsmich koncentrácií kontroly nevytvárajúcej väzbu (oktyltrietoxysilán), sedem nižších koncentrácií referenčného estrogénu (E2), osem koncentrácií látky vytvárajúcej slabú väzbu (noretynodrel alebo noretindrón) a osem koncentrácií každej testovanej chemikálie (TC). V tabuľke 4 ďalej sa uvádza schéma rozloženia mikrotitračnej platničky s príkladom rozloženia pre úplné krivky koncentrácie referenčného estrogénu a kontrol. Ďalšie mikrotitračné platničky sa použijú pre testovanú chemikáliu, pričom ich súčasťou sú kontroly na mikrotitračnej platničke [t. j. i) vysoká (maximálna miera premiestnenia) a stredná (približne na úrovni IC_{50}) koncentrácia E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to trojmo; ii) kontrola s aplikáciou rozpúšťadla (ako celková väzba) a nešpecifická väzba, každá z nich šesťkrát (tabuľka 5)]. Príklad pracovného listu s rozložením na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby pri použití troch neznámych testovaných chemikálií sa uvádza v dodatku 3.3. Koncentrácie uvedené v pracovnom liste, ako aj v tabuľkách 4 a 5 predstavujú konečné koncentrácie skúšky použité v jednotlivých skúšobných jamkách. Maximálna koncentrácia E2 má byť 1×10^{-7} M a v prípade látky vytvárajúcej slabú väzbu sa použije najvyššia koncentrácia pre danú látku vytvárajúcu slabú väzbu na mikrotitračnej platničke 1. Koncentráciu IC_{50} musí stanoviť laboratórium na základe svojej databázy historických kontrol. Očakáva sa, že táto hodnota bude podobná ako hodnota zistená pri validačných štúdiách (pozri tabuľku 1).

Tabuľka 4

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby ([1]), ([2])**, úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (mikrotitračná platnička 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola s tlmivým roztokom a pozitívna kontrola (E2)			Pozitívna látka vytvárajúca slabú väzbu (noretynodrel)			Negatívna kontrola (OTES)			TB a NSB		
A	Slepý pokus (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla) (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			Kontrola s tlmivým roztokom		
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			Slepý pokus (pre označené) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Vzorové usporiadanie pre mikrotitračnú platničku so štandardmi, ktoré sa má použiť pri každom pokuse.

([2]) Táto mikrotitračná platnička je pripravená pomocou riedení pripravených na platničke s riedením opísanej pre štandardy v predchádzajúcich častiach.
V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).

(*) skutočný slepý pokus, jamka sa nepoužíva.

(**) slepý pokus, nepoužíva sa počas inkubácie, ale slúži na potvrdenie celkovej pridanej rádioaktivity.

Tabuľka 5

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby, dodatočné mikrotitračné platničky pre testované chemikálie (TC) a kontroly na mikrotitračnej platničke

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testovaná chemikália 1 (TC-1)			Testovaná chemikália 2 (TC-2)			Testovaná chemikália 3 (TC-3)			Kontroly		
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 (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).

Dokončenie skúšky kompetitívnej väzby

37. S výnimkou jamiek pre celkovú väzbu a slepé pokusy (pre označené), ako sa uvádza v tabuľke 6, sa do každej jamky umiestni 50 µl tlmivého skúšobného roztoku, ktorý sa zmieša s 10 µl kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, referenčného estrogénu (E2), látky vytvárajúcej slabú väzbu, látky nevytvárajúcej väzbu, resp. testovaných chemikálií a s 10 µl roztoku [3H]-17β-estradiolu s koncentráciou 5 nM. Ďalej sa na každú mikrotitračnú platničku pridá 30 µl ľadového roztoku s receptorom a jemne sa premieša. Roztok hrERα sa pridáva ako posledný reagent. Skúšobné mikrotitračné platničky sa inkubujú dve hodiny pri izbovej teplote (22 až 28 °C).

Tabuľka 6

Objem zložiek skúšky kompetitívnej väzby na hrER, mikrotitračné platničky

Kroky prípravy		Jamky iné ako TB	Jamky TB	Slepý pokus (pre označené)
Objem zložiek pre vyššie uvedené reakčné jamky a poradie pridania	tlmivý skúšobný roztok s izbovou teplotou	50 µl	60 µl	90 µl
	neoznačený E2, látka vytvárajúca slabú väzbu, látka nevytvárajúca väzbu, rozpúšťadlo a testované chemikálie (*)	10 µl	—	—
	[3H]-17β-estradiol na dosiahnutie konečnej koncentrácie 0,5 nM (t. j. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	stanovená koncentrácia hrERα (pozri odseky 12 – 13)	30 µl	30 µl	—
celkový objem v každej skúšobnej jamke		100 µl	100 µl	100 µl

(*) správne pripravené na dosiahnutie konečnej koncentrácie v rámci prijateľnej koncentrácie rozpúšťadla

38. Ďalej sa po separácii [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 100 µl ľadovej suspenzie DCC do každej jamky uskutoční kvantifikácia [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα, ako sa opisuje v odsekoch 21 – 23 dodatku 3 pre skúšku saturačnej väzby.

39. Jamky G10 – 12 a H10 – 12 [uvedené v tabuľke 4 ako slepý pokus (pre označené)] predstavujú hodnotu dpm estradiolu označeného pomocou [^{3}H] v objeme 10 µl. Alikvotná časť v objeme 10 µl sa prenesie priamo do scintilačnej kvapaliny.

Kritériá prijateľnosti

Skúška saturačnej väzby

40. Pri použití zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu má krivka špecifickej väzby dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom, čo potvrdzuje, že došlo k saturácii hrERα ligandom.

41. Špecifická väzba pri koncentrácii 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiolu má byť v rámci prijateľného rozsahu 30 % až 50 % priemernej nameranej celkovej rádioaktivity pridanej v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny a zopakovať skúšku saturácie.

42. Na základe údajov má vzniknúť lineárne Scatchardovo znázornenie.

43. Nešpecifická väzba nemá byť nadmerná. Hodnota nešpecifickej väzby má zvyčajne predstavovať < 35 % celkovej väzby. Pri meraní veľmi nízkej hodnoty dpm pre najnižšiu testovanú koncentráciu 17β-estradiolu označeného rádioizotopom však môže príslušný pomer príležitostne prekročiť tento limit.

Skúška kompetitívnej väzby

44. Pri zvyšujúcich sa koncentráciách neoznačeného 17β-estradiolu má dôjsť k premiestneniu [^{3}H]-17β-estradiolu z receptora spôsobom, ktorý zodpovedá kompetitívnej väzbe na jedno miesto.

45. Hodnota IC_{50} pre referenčný estrogén (t. j. 17β-estradiol) sa má približne rovnať súčtu molárnej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu a hodnoty K_d určenej v skúške saturačnej väzby.

46. Celková špecifická väzba má byť konzistentne v prijateľnom rozsahu 40 ±10 % v prípade priemernej nameranej koncentrácie celkovej rádioaktivity pridanej do každej jamky na úrovni 0,5 nM v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny.

47. Rozpúšťadlo nemá meniť citlivosť ani reprodukovateľnosť skúšky. Výsledky kontroly s aplikáciou rozpúšťadla (jamky TB) sa porovnajú s kontrolou s tlmivým roztokom s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém. Ak nedochádza k vplyvu rozpúšťadla na skúšku, výsledky kontroly TB a kontroly s tlmivým roztokom majú byť porovnateľné.

48. Látka nevytvárajúca väzbu nemá premiestniť z hrERα viac než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu pri testovaní do 10^{-3} M (OTES) alebo 10^{-4} M (DBP).

49. Boli vytvorené kritériá výkonnosti pre referenčný estrogén a dve látky vytvárajúce slabú väzbu (napr. noretynodrel, noretindrón) pomocou údajov z validačnej štúdie skúšky CERI väzby na hrER (príloha N v odkaze 2). 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú pre strednú hodnotu ± SD (n) pre všetky kontrolné testovacie cykly v štyroch laboratóriách, ktoré sa zapojili do validačnej štúdie. 95 % intervaly spoľahlivosti sa vypočítali pre parametre zostrojenia krivky [t. j. horný bod, dolný bod, sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope) a log IC_{50}] pre referenčný estrogén a látky vytvárajúce slabú väzbu a pre $\log_{10}$RBA látok vytvárajúcich slabú väzbu vzhľadom na referenčný estrogén. V tabuľke 1 sa uvádzajú očakávané rozsahy pre parametre zostrojenia krivky, ktoré možno použiť ako kritériá výkonnosti. V praxi sa rozsah IC_{50} môže mierne líšiť na základe pokusne odvodenej hodnoty K_d prípravku s receptorom a koncentrácie ligandu použitej v rámci skúšky.

50. Pokiaľ ide o testované chemikálie, neboli pre ne vytvorené žiadne kritériá výkonnosti pre parametre zostrojenia krivky, a to vzhľadom na široké spektrum existujúcich potenciálnych testovaných chemikálií a variabilitu potenciálnych afinít a výsledkov (napr. úplná krivka, čiastočná krivka, nemožnosť zostrojenia krivky). Pri posudzovaní výsledkov v prípade testovanej chemikálie z jednotlivých testovacích cyklov je však potrebné postupovať na základe odborného úsudku. Je potrebné použiť dostatočný rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, aby bolo možné jednoznačne určiť vrchol (napr. 90 – 100 % väzby) krivky kompetitívnej väzby. Variabilita medzi replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie, ako aj medzi tromi nesúbežnými testovacími cyklami má byť primeraná a vedecky odôvodniteľná. Kontroly z jednotlivých testovacích cyklov testovanej chemikálie sa majú približovať mieram výkonnosti uvádzaným pre túto skúšku CERI a majú byť v súlade s údajmi o historických kontrolách z jednotlivých príslušných laboratórií.

ANALÝZA ÚDAJOV

Skúška saturačnej väzby

51. Meria sa celková väzba, ako aj nešpecifická väzba. Z týchto hodnôt sa vypočíta špecifická väzba zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu v rovnovážnych podmienkach, a to odpočítaním hodnoty nešpecifickej väzby od celkovej väzby. Graf špecifickej väzby vzhľadom na koncentráciu [^{3}H]-17β-estradiolu by mal dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom pri maximálnej špecifickej väzbe, čo signalizuje saturáciu hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Okrem toho by sa analýzou údajov malo zdokumentovať naviazanie [^{3}H]-17β- estradiolu na jedno väzbové miesto s vysokou afinitou. Na krivke saturačnej väzby sa má znázorniť nešpecifická, celková a špecifická väzba. Pri ďalšej analýze týchto údajov sa použije nelineárna regresná analýza (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením týchto údajov v podobe Scatchardovho znázornenia.

52. Pri analýze údajov sa údaje B_{max} a K_d určujú len z údajov o celkovej väzbe, a to na základe predpokladu, že nešpecifická väzba je lineárna, pokiaľ nie je odôvodnené použitie odlišnej metódy. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má okrem toho použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Zvolenú metódu spoľahlivej regresie je potrebné uviesť. Pri určovaní hodnôt B_{max} a K_d z údajov o saturačnej väzbe sa má vždy použiť korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov (napr. pomocou Swillensovej metódy, 1995).

Skúška kompetitívnej väzby

53. Krivka kompetitívnej väzby sa zostrojí tak, aby vyjadrovala vzťah medzi špecifickou väzbou [^{3}H]-17β-estradiolu a koncentráciou (jednotky dekadického logaritmu) konkurenta. Koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % maximálnej špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu, predstavuje hodnotu IC_{50}.

54. Odhady hodnôt log(IC_{50}) pre pozitívne kontroly (napr. referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu) sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Horný bod, dolný bod, sklon a hodnota log(IC_{50}) majú pri zostrojovaní týchto kriviek zostať vo všeobecnosti bez obmedzení. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Nepoužíva sa korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov. Po počiatočnej analýze sa každá väzbová krivka posúdi, aby sa zabezpečilo, že je primerane zostrojená podľa modelu. Relatívna afinita (RBA) látky vytvárajúcej slabú väzbu sa vypočíta ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) látky vytvárajúcej slabú väzbu vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol. Výsledky z pozitívnych kontrol a z kontroly s látkou nevytvárajúcou väzbu sa vyhodnotia pomocou meraní výkonnosti skúšky uvedených v odsekoch 44 – 49 v tomto dodatku 3.

55. Na analýzu údajov pre všetky testované chemikálie sa použije prístup v postupných krokoch, aby sa zabezpečila primeraná analýza všetkých údajov a správna klasifikácia jednotlivých kriviek kompetitívnej väzby. Odporúča sa, aby sa pri každom testovacom cykle pre testovanú chemikáliu uskutočnila štandardizovaná analýza údajov, ktorá sa zhoduje s analýzou použitou v prípade kontrol s referenčným estrogénom a látkou vytvárajúcou slabú väzbu (pozri odsek 54 tohto dodatku 3). Po jej dokončení sa uskutoční technické posúdenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby pri každom testovacom cykle. Vhodným ukazovateľom správneho uskutočnenia skúšky a analýz údajov počas tohto technického posúdenia je to, keď sa pozoruje zníženie percentuálneho podielu špecificky viazaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti od koncentrácie, nízka variabilita medzi technickými replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie a konzistentnosť parametrov zostrojenia medzi tromi testovacími cyklami.

Interpretácia údajov

56. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku vytvárajúcu väzbu na hrERα, ak možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 % (obrázok 1).

57. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku nevytvárajúcu väzbu na hrERα, ak:

— možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 % alebo

— nemožno zostrojiť väzbovú krivku a najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.

58. Testovaná chemikália sa pokladá za nejednoznačnú, ak nie je splnená ani jedna z uvedených podmienok (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

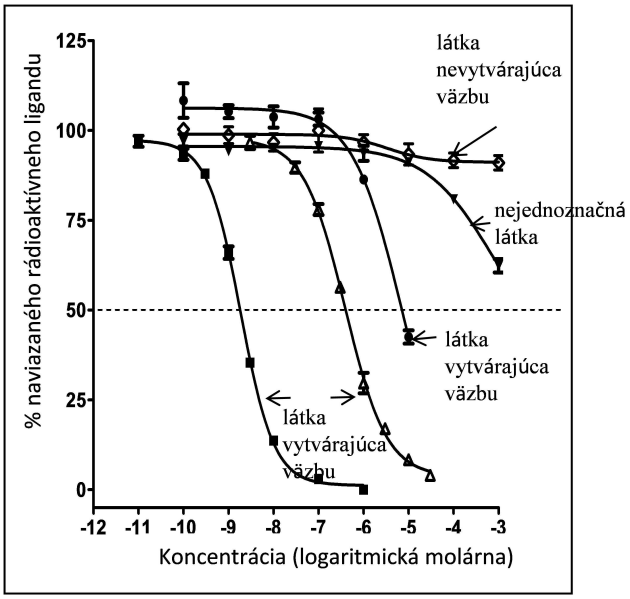
Tabuľka 7

Kritériá na priradenie klasifikácie na základe krivky kompetitívnej väzby testovanej chemikálie

Klasifikácia	Kritériá
Látka vytvárajúca väzbu[a]	Je možné zostrojiť väzbovú krivku. **Najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 %.**
Látka nevytvárajúca väzbu[b]	Ak je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.** Ak nie je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.**
Nejednoznačná látka[c]	Akýkoľvek uskutočniteľný testovací cyklus, ktorého výsledkom nie je látka vytvárajúca väzbu ani látka nevytvárajúca väzbu (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

Obrázok 1

Príklady klasifikácie testovanej chemikálie pomocou krivky kompetitívnej väzby.



59. Viaceré testovacie cykly uskutočnené pre určitú testovanú chemikáliu v rámci laboratória sa skombinujú tak, že sa každému testovaciemu cyklu priradí číselná hodnota a stanoví sa priemer za testovacie cykly podľa znázornenia v tabuľke 8. Výsledky kombinovaných testovacích cyklov v rámci jednotlivých laboratórií sa porovnajú s očakávanou klasifikáciou jednotlivých testovaných chemikálií.

Tabuľka 8

Metóda klasifikácie testovanej chemikálie pomocou viacerých testovacích cyklov v rámci laboratória

Priradenie hodnoty každému testovaciemu cyklu:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	2
nejednoznačná látka	1
látka nevytvárajúca väzbu	0
Klasifikácia priemeru číselných hodnôt medzi testovacími cyklami:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	priemer ≥ 1,5
nejednoznačná látka	0,5 ≤ priemer < 1,5
látka nevytvárajúca väzbu	priemer < 0,5

SPRÁVA O TESTE

60. Pozri odsek 24 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER tejto testovacej metódy.

Dodatok 3.1

ZOZNAM TERMÍNOV

[^{3}H]E2: 17β-estradiol rádioaktívne označený tríciom

DCC: uhlie povrchovo upravené dextránom

E2: neoznačený 17β-estradiol (inertný)

Tlmivý skúšobný roztok: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, obsahujúce EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaVO3 1 mM, glycerol 10 %, leupeptín 0,2 mM, ditiotreitol 1 mM a bovinný sérový albumín 10 mg/ml

hrERα: ľudský rekombinantný estrogénový receptor alfa (doména viažuca ligand)

Replikát: jedna z viacerých jamiek, ktoré obsahujú rovnaký obsah v rovnakých koncentráciách a skúšajú sa súbežne v rámci jedného testovacieho cyklu. V tomto protokole sa každá koncentrácia testovanej chemikálie testuje trojmo, t. j. existujú tri replikáty, ktoré sa skúšajú súbežne pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací cyklus: úplná množina súbežne spracúvaných skúšobných jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá poskytuje všetky informácie potrebné na charakterizovanie väzby testovanej chemikálie na hrERα (t. j. celkový [^{3}H]-17β-estradiol pridaný do skúšobnej jamky, maximálna väzba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nešpecifická väzba a celková väzba pri rôznych koncentráciách testovanej chemikálie). Testovací cyklus by mohol obsahovať len jednu skúšobnú jamku (t. j. replikát) na koncentráciu, ale vzhľadom na to, že v rámci tohto protokolu sa vyžaduje skúšanie trojmo, každý testovací cyklus obsahuje tri skúšobné jamky na koncentráciu. Okrem toho sa v tomto protokole vyžadujú tri nezávislé (t. j. nesúbežné) testovacie cykly na chemikáliu.

Dodatok 3.2

ROZLOŽENIE JAMIEK PRI SKÚŠKE KOMPETITÍVNEJ VÄZBY

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	A1	1	slepý pokus	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	slepý pokus	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	slepý pokus	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neoznačený E2	S	S1	1,00E–10	30	50	10	10	100	1,0E–11
S	B2	2	neoznačený E2	S	S1	1,00E–10	30	50	10	10	100	1,0E–11
S	B3	3	neoznačený E2	S	S1	1,00E–10	30	50	10	10	100	1,0E–11
S	C1	1	neoznačený E2	S	S2	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
S	C2	2	neoznačený E2	S	S2	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
S	C3	3	neoznačený E2	S	S2	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
S	D1	1	neoznačený E2	S	S3	3,16E–09	30	50	10	10	100	3,2E–10
S	D2	2	neoznačený E2	S	S3	3,16E–09	30	50	10	10	100	3,2E–10

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	D3	3	neoznačený E2	S	S3	3,16E–09	30	50	10	10	100	3,2E–10
S	E1	1	neoznačený E2	S	S4	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	E2	2	neoznačený E2	S	S4	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	E3	3	neoznačený E2	S	S4	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	F1	1	neoznačený E2	S	S5	3,16E–08	30	50	10	10	100	3,2E–09
S	F2	2	neoznačený E2	S	S5	3,16E–08	30	50	10	10	100	3,2E–09
S	F3	3	neoznačený E2	S	S5	3,16E–08	30	50	10	10	100	3,2E–09
S	G1	1	neoznačený E2	S	S6	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	G2	2	neoznačený E2	S	S6	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	G3	3	neoznačený E2	S	S6	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	H1	1	neoznačený E2	S	S7	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	H2	2	neoznačený E2	S	S7	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	H3	3	neoznačený E2	S	S7	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	A4	1	noretynodrel	NE	WP1	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	A5	2	noretynodrel	NE	WP1	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	A6	3	noretynodrel	NE	WP1	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	B4	1	noretynodrel	NE	WP2	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	B5	2	noretynodrel	NE	WP2	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	B6	3	noretynodrel	NE	WP2	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	C4	1	noretynodrel	NE	WP3	3,16E–07	30	50	10	10	100	3,2E–08
S	C5	2	noretynodrel	NE	WP3	3,16E–07	30	50	10	10	100	3,2E–08
S	C6	3	noretynodrel	NE	WP3	3,16E–07	30	50	10	10	100	3,2E–08
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	D5	2	noretynodrel	NE	WP4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	D6	3	noretynodrel	NE	WP4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP5	3,16E–06	30	50	10	10	100	3,2E–07

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP5	3,16E–06	30	50	10	10	100	3,2E–07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP5	3,16E–06	30	50	10	10	100	3,2E–07
S	F4	1	noretynodrel	NE	WP6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	F5	2	noretynodrel	NE	WP6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	F6	3	noretynodrel	NE	WP6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	G4	1	noretynodrel	NE	WP7	3,16E–05	30	50	10	10	100	3,2E–06
S	G5	2	noretynodrel	NE	WP7	3,16E–05	30	50	10	10	100	3,2E–06
S	G6	3	noretynodrel	NE	WP7	3,16E–05	30	50	10	10	100	3,2E–06
S	H4	1	noretynodrel	NE	WP8	3,16E–04	30	50	10	10	100	3,2E–05
S	H5	2	noretynodrel	NE	WP8	3,16E–04	30	50	10	10	100	3,2E–05
S	H6	3	noretynodrel	NE	WP8	3,16E–04	30	50	10	10	100	3,2E–05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (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

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D-BP7	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
S	A10	1	celková väzba	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	celková väzba	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	celková väzba	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	celková väzba	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	B11	5	celková väzba	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	celková väzba	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S1	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	C11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S2	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	C12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S3	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	D10	4	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S4	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	D11	5	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	D12	6	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	E10	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	slepý pokus (pre označené)	Označené	H1	—	90	—	10	—	100	–

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	G11 (*)	2	slepý pokus (pre označené)	Označené	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	slepý pokus (pre označené)	Označené	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	slepý pokus (pre označené)	Označené	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	slepý pokus (pre označené)	Označené	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	slepý pokus (pre označené)	Označené	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	neznáma 1	U1	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A2	2	neznáma 1	U1	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A3	3	neznáma 1	U1	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	B1	1	neznáma 1	U1	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B2	2	neznáma 1	U1	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B3	3	neznáma 1	U1	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	C1	1	neznáma 1	U1	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C2	2	neznáma 1	U1	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C3	3	neznáma 1	U1	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	D1	1	neznáma 1	U1	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D2	2	neznáma 1	U1	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D3	3	neznáma 1	U1	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	E1	1	neznáma 1	U1	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E2	2	neznáma 1	U1	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E3	3	neznáma 1	U1	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F1	1	neznáma 1	U1	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F2	2	neznáma 1	U1	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F3	3	neznáma 1	U1	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	G1	1	neznáma 1	U1	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G2	2	neznáma 1	U1	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G3	3	neznáma 1	U1	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	H1	1	neznáma 1	U1	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H2	2	neznáma 1	U1	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	H3	3	neznáma 1	U1	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	A4	1	neznáma 2	U2	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A5	2	neznáma 2	U2	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A6	3	neznáma 2	U2	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	B4	1	neznáma 2	U2	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B5	2	neznáma 2	U2	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B6	3	neznáma 2	U2	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	C4	1	neznáma 2	U2	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C5	2	neznáma 2	U2	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C6	3	neznáma 2	U2	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	D4	1	neznáma 2	U2	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D5	2	neznáma 2	U2	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D6	3	neznáma 2	U2	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	E4	1	neznáma 2	U2	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	E5	2	neznáma 2	U2	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E6	3	neznáma 2	U2	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F4	1	neznáma 2	U2	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F5	2	neznáma 2	U2	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F6	3	neznáma 2	U2	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	G4	1	neznáma 2	U2	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G5	2	neznáma 2	U2	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G6	3	neznáma 2	U2	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	H4	1	neznáma 2	U2	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H5	2	neznáma 2	U2	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H6	3	neznáma 2	U2	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	A7	1	neznáma 3	U3	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A8	2	neznáma 3	U3	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A9	3	neznáma 3	U3	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	B7	1	neznáma 3	U3	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B8	2	neznáma 3	U3	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B9	3	neznáma 3	U3	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	C7	1	neznáma 3	U3	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C8	2	neznáma 3	U3	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C9	3	neznáma 3	U3	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	D7	1	neznáma 3	U3	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D8	2	neznáma 3	U3	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D9	3	neznáma 3	U3	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	E7	1	neznáma 3	U3	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E8	2	neznáma 3	U3	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E9	3	neznáma 3	U3	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F7	1	neznáma 3	U3	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F8	2	neznáma 3	U3	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	F9	3	neznáma 3	U3	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	G7	1	neznáma 3	U3	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G8	2	neznáma 3	U3	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G9	3	neznáma 3	U3	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	H7	1	neznáma 3	U3	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H8	2	neznáma 3	U3	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H9	3	neznáma 3	U3	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	A10	1	kontrola E2 (max.)	S	E2max1	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,00E–07
P1	A11	2	kontrola E2 (max.)	S	E2max2	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,00E–07
P1	A12	3	kontrola E2 (max.)	S	E2max3	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,00E–07
P1	B10	1	kontrola E2 (IC_{50})	S	E2IC501	E2IC50 × 10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	kontrola E2 (IC_{50})	S	E2IC502	E2IC50 × 10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	kontrola E2 (IC_{50})	S	E2IC503	E2IC50 × 10	30	50	10	10	100	E2IC50

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	C10	1	kontrola NE (max.)	S	Nemax1	1,00E–3,-5	30	50	10	10	100	1,00E–4,-5
P1	C11	2	kontrola NE (max.)	S	Nemax2	1,00E–3,-5	30	50	10	10	100	1,00E–4,-5
P1	C12	3	kontrola NE (max.)	S	Nemax3	1,00E–3,-5	30	50	10	10	100	1,00E–4,-5
P1	D10	1	kontrola NE (IC_{50})	S	NEIC501	NEIC50 × 10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	kontrola NE (IC_{50})	S	NEIC502	NEIC50 × 10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	kontrola NE (IC_{50})	S	NEIC503	NEIC50 × 10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S1	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S2	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S3	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F10	4	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S4	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F11	5	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F12	6	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	G10	1	celková väzba	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	celková väzba	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	celková väzba	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	celková väzba	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	celková väzba	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	celková väzba	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	–

(*) „Označené“ jamky sú počas inkubácie prázdne. Objem 10 µl sa pridáva len na účely scintilačnej spektroskopie.

Dodatok 4

ÚVAHY K ANALÝZE ÚDAJOV ZO SKÚŠKY KOMPETITÍVNEJ VÄZBY NA HRER

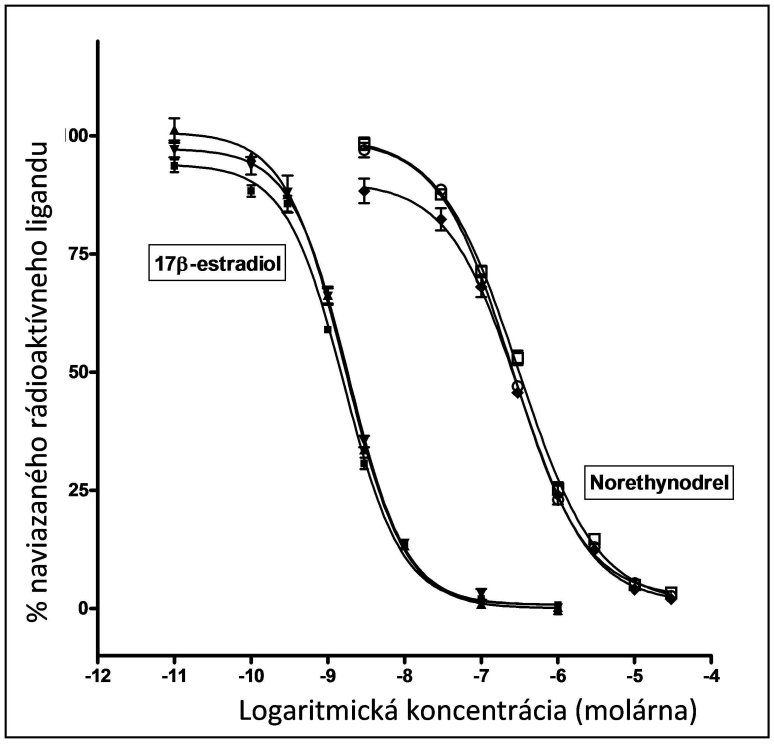
1. Pri skúške kompetitívnej väzby na hrERα sa meria väzba jednej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie. Krivka kompetitívnej väzby sa zostrojí tak, aby vyjadrovala vzťah medzi špecifickou väzbou [^{3}H]-17β-estradiolu a koncentráciou (jednotky dekadického logaritmu) konkurenta. Koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % maximálnej špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu, predstavuje hodnotu IC_{50}.

Analýza údajov pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu (1)

2. Údaje z kontrolných testovacích cyklov (t. j. percentuálna hodnota špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu a logaritmická koncentrácia testovanej chemikálie) sa transformujú na účely ďalšej analýzy. Odhady hodnôt log(IC_{50}) pre pozitívne kontroly (napr. referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu) sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami (napr. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Horný bod, dolný bod, sklon a hodnota log(IC_{50}) môžu pri zostrojovaní týchto kriviek zostať zvyčajne bez obmedzení. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Zvolenú metódu spoľahlivej regresie je potrebné uviesť. Pri skúškach FW alebo CERI väzby na hrER nebola potrebná korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov, v prípade potreby však možno zvážiť jej použitie. Po počiatočnej analýze sa každá väzbová krivka posúdi, aby sa zabezpečilo, že je primerane zostrojená podľa modelu. Relatívnu afinitu (RBA) látky vytvárajúcej slabú väzbu možno vypočítať ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) látky vytvárajúcej slabú väzbu vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol. Výsledky pre pozitívne kontroly a kontrolu s látkou nevytvárajúcou väzbu sa vyhodnotia pomocou meraní výkonnosti skúšky a kritérií prijateľnosti opísaných v tejto testovacej metóde (odsek 20), v dodatku 2 (skúška FW, odseky 41 – 51) a dodatku 3 (skúška CERI, odseky 41 – 51). Príklady troch testovacích cyklov pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu sú znázornené na obrázku 1.

Obrázok 1

Príklady kriviek kompetitívnej väzby pre referenčný estrogén a kontrolnú látku vytvárajúcu slabú väzbu



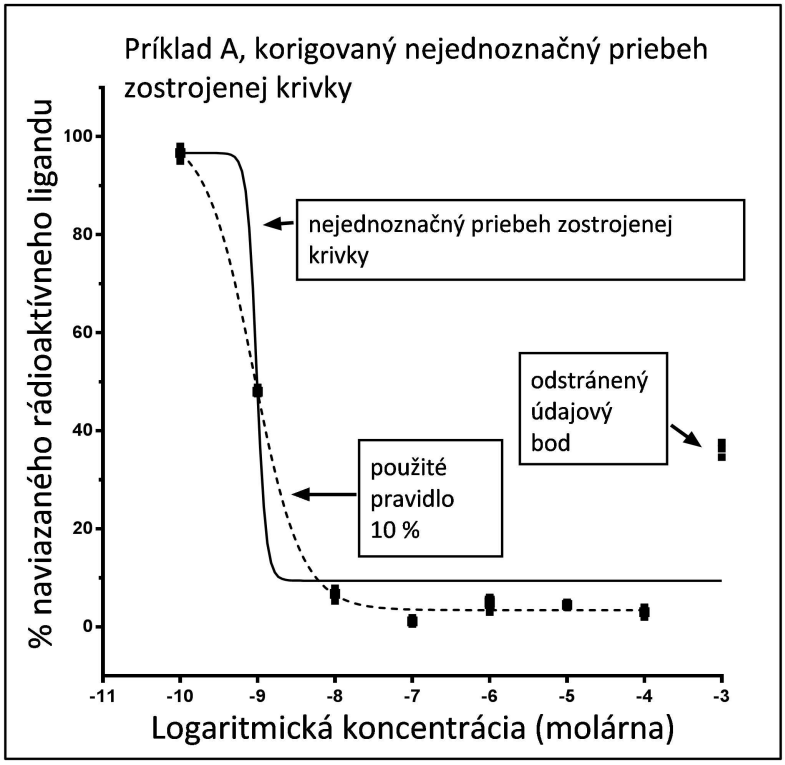
Analýza údajov pre testované chemikálie

3. Na analýzu údajov pre všetky testované chemikálie sa použije prístup v postupných krokoch, aby sa zabezpečila primeraná analýza všetkých údajov a správna klasifikácia jednotlivých kriviek kompetitívnej väzby. Pri každom testovacom cykle pre testovanú chemikáliu sa najskôr uskutoční štandardizovaná analýza údajov, ktorá sa zhoduje s analýzou použitou v prípade kontrol s referenčným estrogénom a látkou vytvárajúcou slabú väzbu. Po jej dokončení sa uskutoční technické posúdenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby pri každom testovacom cykle. Vhodným ukazovateľom správneho uskutočnenia skúšky a analýz údajov počas tohto technického posúdenia je to, keď sa pozoruje zníženie percentuálneho podielu špecificky viazaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti od koncentrácie, nízka variabilita medzi technickými replikátmi pri jednotlivých chemických koncentráciách a konzistentnosť parametrov zostrojenia medzi tromi testovacími cyklami. Pri posudzovaní výsledkov v prípade testovanej chemikálie z jednotlivých testovacích cyklov je potrebné postupovať na základe odborného úsudku a údaje, na základe ktorých sa každá testovaná chemikália klasifikuje ako látka vytvárajúca alebo nevytvárajúca väzbu, musia byť vedecky odôvodniteľné.

4. Príležitostne sa môžu vyskytnúť príklady údajov, ktoré si vyžadujú dodatočnú pozornosť s cieľom správne analyzovať a interpretovať údaje o väzbe na hrER. V predchádzajúcich štúdiách sa vyskytli prípady, pri ktorých mohol analýzu a interpretáciu údajov o kompetitívnej väzbe na receptor skomplikovať nárast percentuálnej hodnoty špecifickej väzby počas testovania chemikálií pri najvyšších koncentráciách (obrázok 2). Ide o známy problém, ktorý sa vyskytol pri používaní protokolov vo viacerých receptorových testoch s kompetitívnou väzbou ((3). V týchto prípadoch sa pri nižších koncentráciách pozoruje reakcia závislá od koncentrácie, keď sa však koncentrácia testovanej chemikálie priblíži limitu rozpustnosti, miera premiestnenia [^{3}H]17β-estradiolu prestane klesať. V takýchto prípadoch vyplýva z údajov pre vyššie koncentrácie, že sa dosiahla biologická hranica skúšky. Tento jav napríklad mnohokrát súvisí s nerozpustnosťou chemikálie a jej zrážaním pri vysokých koncentráciách alebo môže byť aj prejavom prekročenia kapacity uhlia povrchovo upraveného dextránom zachytiť neviazaný ligand označený rádioizotopom počas postupu separácie pri najvyšších koncentráciách chemikálie. Keď sa takéto údajové body ponechajú pri zostrojení sigmoidnej krivky na základe údajov kompetitívnej väzby, môže to niekedy viesť k nesprávnej klasifikácii potenciálu testovanej chemikálie z hľadiska viazania sa na ER (obrázok 2). Na to, aby sa tomu predišlo, obsahuje protokol pre skúšky FW a CERI väzby na hrER možnosť vylúčiť z analýzy údajové body, pri ktorých stredná hodnota replikátov v prípade percentuálnej hranice špecifickej pre ^{3}H]17β-estradiol najmenej o 10 % presahuje pozorovanú strednú hodnotu pri nižšej koncentrácii (tento postup sa bežne označuje ako pravidlo 10 %). Pri danej krivke možno toto pravidlo použiť len raz, pričom najmenej pre šesť koncentrácií musia zostať také údaje, aby bolo možné krivku správne klasifikovať.

Obrázok 2

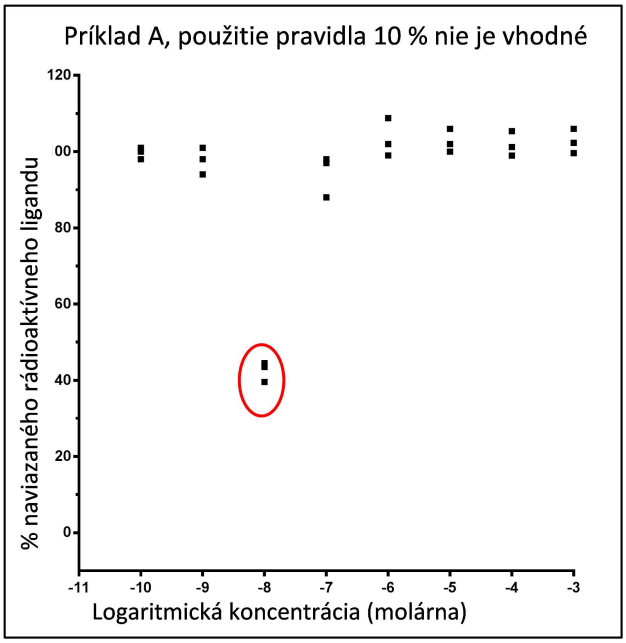
Príklady, krivky kompetitívnej väzby pri použití a bez použitia pravidla 10 %

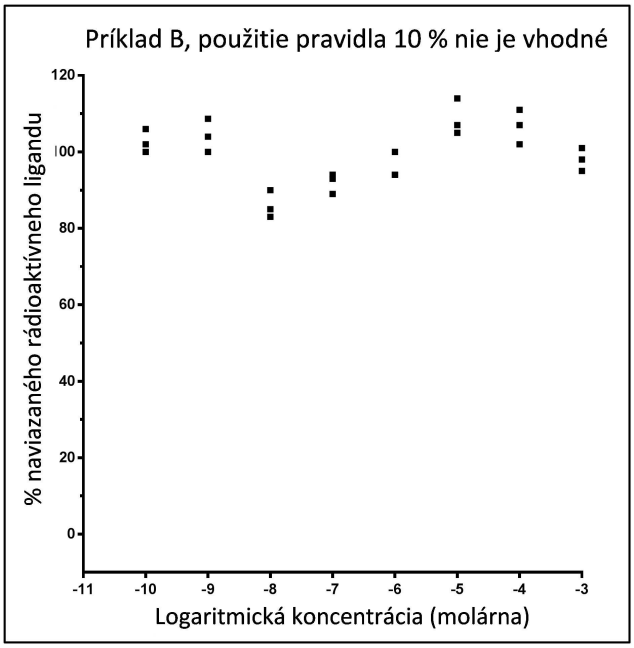


5. Vhodné použitie pravidla 10 % je potrebné dôkladne zvážiť, pričom má byť vyhradené len pre prípady, ktoré výrazne naznačujú, že pôjde o látku vytvárajúcu väzbu na hrER. Počas vykonávania pokusov pre validačnú štúdiu skúšky FW väzby na hrER sa zistilo, že pri použití pravidla 10 % sa niekedy vyskytli nezamýšľané a nepredvídané dôsledky. V prípade chemikálií, pri ktorých nedochádzalo k interakcii s receptorom (t. j. skutočné látky nevytvárajúce väzbu), sa často prejavovala variabilita okolo 100 % väzby rádioaktívneho ligandu, ktorá bola vyššia ako 10 % v rámci rozsahu testovaných koncentrácií. Ak by sa stalo, že by sa najnižšia hodnota vyskytla pri nízkej koncentrácii, pomocou pravidla 10 % by sa z analýzy mohli potenciálne odstrániť údaje zo všetkých vyšších koncentrácií, hoci by tieto koncentrácie mohli byť užitočné pri stanovení toho, že daná chemikália predstavuje látku nevytvárajúcu väzbu. Na obrázku 3 sú znázornené príklady situácií, keď nie je vhodné použiť pravidlo 10 %.

Obrázok 3

Príklady, údaje kompetitívnej väzby, pri ktorých nie je vhodné použiť pravidlo 10 %





Odkazy

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, s. 187 – 191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46 – 56.

B.71 SKÚŠKY KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE *IN VITRO* SO ZAMERANÍM NA KĽÚČOVÚ UDALOSŤ AKTIVÁCIE DENDRITOVÝCH BUNIEK V RÁMCI DRÁHY NEPRIAZNIVÉHO ÚČINKU (AOP) KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Testovacia metóda založená na kľúčovej udalosti aktivácie dendritových buniek

1. Pod kožným senzibilizátorom sa rozumie látka, ktorá pri kontakte s kožou vyvolá alergickú reakciu podľa definície v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemických látok (GHS OSN) (1) a nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]). V prípade kľúčových biologických udalostí vedúcich ku kožnej senzibilizácii panuje všeobecná zhoda. Súčasné poznatky o chemických a biologických mechanizmoch, ktoré súvisia s kožnou senzibilizáciou, boli zhrnuté v rámci programu AOP OECD (2) ako dráha nepriaznivého účinku (AOP), ktorá sa začína molekulárnou iniciačnou udalosťou, pokračuje následnými udalosťami a napokon vedie k nežiaducemu účinku, t. j. alergickej kontaktnej dermatitíde. V tomto prípade je molekulárnou iniciačnou udalosťou (t. j. prvou kľúčovou udalosťou) vznik kovalentnej väzby elektrofilných látok s nukleofilnými jadrami kožných proteínov. K druhej kľúčovej udalosti v rámci tejto dráhy nepriaznivého účinku (AOP) dochádza v keratínocytoch, pričom udalosť zahŕňa zápalové reakcie, ako aj zmeny génovej expresie v súvislosti so špecifickými signálnymi dráhami bunky, akými sú dráhy závislé od úseku ARE („antioxidant/electrophile response element“). Treťou kľúčovou udalosťou je aktivácia dendritových buniek (DC), ktorá sa zvyčajne posudzuje podľa expresie špecifických povrchových bunkových markerov, chemokínov a cytokínov. Štvrtou kľúčovou udalosťou je aktivácia a proliferácia T-buniek, ktorá sa nepriamo posudzuje lokálnou skúškou lymfatických uzlín na myšiach a potkanoch (LLNA) (3).

2. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 442E (2017). Opisujú sa v nej skúšky *in vitro* v súvislosti s mechanizmami opísanými pri kľúčovej udalosti aktivácie dendritových buniek v rámci dráhy nepriaznivého účinku (AOP) kožnej senzibilizácie (2). Súčasťou tejto testovacej metódy sú testy, ktoré sa majú použiť na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v súlade s GHS OSN a CLP.

   V tejto testovacej metóde sa opisujú tieto testy:

   — test aktivácie ľudskej bunkovej línie (h-CLAT),

   — test aktivácie bukovej línie U937 (U-SENS™),

   — skúška reportérového génu interleukínu-8 (skúška IL-8 Luc).

3. Testy, ktoré sú súčasťou tejto testovacej metódy a príslušného TG OECD, sa môžu líšiť z hľadiska postupu použitého na generovanie údajov a meraných hodnôt, možno ich však bez rozdielu použiť na riešenie požiadaviek štátov týkajúcich sa výsledkov testov v súvislosti s kľúčovou udalosťou aktivácie dendritových buniek v rámci dráhy nepriaznivého účinku (AOP) kožnej senzibilizácie, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 z 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

Súvislosti a zásady testov v rámci testovacej metódy na základe kľúčovej udalosti

4. Posudzovanie kožnej senzibilizácie obyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat. Klasické metódy založené na použití morčiat, maximalizačný test na morčatách podľa Magnussona a Kligmana (GPMT) a Buehlerov test (TM B.6) (4), sú zamerané na posudzovanie indukčnej aj elicitačnej fázy kožnej senzibilizácie. Prijaté boli aj testy na myšiach a potkanoch, lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA) (TM B.42) (3)a jej dve nerádioaktívne modifikácie, LLNA: DA (TM B.50) (5) a LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), ktorými sa posudzuje výlučne indukčná reakcia, pretože sú vhodnejšie ako testy na morčatách tak z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, ako aj z hľadiska objektívneho merania indukčnej fázy kožnej senzibilizácie.

5. Nedávno boli prijaté testovacie metódy *in chemico* a *in vitro* založené na mechanistických poznatkoch, ktoré sa zameriavajú na prvú kľúčovú udalosť [TM B.59; skúška priamej peptidovej reaktivity (7)] a druhú kľúčovú udalosť [TM B.60; testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“ (8)] AOP kožnej senzibilizácie, ktoré majú prispievať k posudzovaniu potenciál nebezpečnosti chemikálií z hľadiska kožnej senzibilizácie.

6. Pri testoch opísaných v tejto testovacej metóde sa kvantifikuje buď zmena expresie povrchových bunkových markerov súvisiacich s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek po expozícii senzibilizátorom (napr. CD54, CD86), alebo zmena expresie IL-8, cytokínu súvisiaceho s aktiváciou dendritových buniek. Existujú informácie o tom, že kožné senzibilizátory vyvolávajú expresiu bunkových membránových markerov ako CD40, CD54, CD80, CD83 a CD86 popri indukcii proinflamačných cytokínov, napr. IL-1β a TNF-α, a viacerých chemokínov vrátane IL-8 (CXCL8) a CCL3 (9) (10) (11) (12), ktoré súvisia s aktiváciou dendritových buniek (2).

7. Keďže však aktivácia dendritových buniek predstavuje len jednu kľúčovú udalosť AOP kožnej senzibilizácie (2) (13), informácie získané pomocou testov, v rámci ktorých sa merajú markery aktivácie dendritových buniek, nemusia byť dostatočné na stanovenie záveru, pokiaľ ide o existenciu alebo neexistenciu potenciálu chemikálií spôsobiť kožnú senzibilizáciu. Navrhuje sa preto, aby údaje získané pomocou testov opísaných v tejto testovacie metóde slúžili na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) pri použití v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA) spolu s inými relevantnými doplňujúcimi informáciami, napr. odvodenými zo skúšok *in vitro* so zameraním na iné kľúčové udalosti AOP kožnej senzibilizácie, ako aj z netestovacích metód vrátane prevzatých údajov odvodených z chemických analógov (13). Zverejnili sa príklady použitia údajov získaných z týchto testov v rámci definovaných prístupov (13), t. j. prístupov, ktoré sú štandardizované z hľadiska množiny použitých informačných zdrojov a postupov použitých pri týchto údajoch na odvodenie prognóz, pričom ich možno použiť ako užitočné prvky v rámci IATA.

8. Testy opísané v tejto testovacej metóde nemožno používať samostatne, a to ani pri zaraďovaní kožných senzibilizátorov do podkategórií 1A a 1B vymedzených v GHS OSN/CLP v prípade, že orgány uplatňujú tieto dve voliteľné podkategórie, a ani pri stanovení predpokladanej potencie na účely rozhodnutí v súvislosti s posudzovaním bezpečnosti. V závislosti od regulačného rámca však pozitívne výsledky získané na základe týchto metód možno samostatne použiť pri klasifikácii chemikálie ako patriacej do kategórie 1 GHS OSN/CLP.

9. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje ([1]), a nesúvisí s použiteľnosťou testov na testovanie jednozložkových látok, viaczložkových látok a/alebo zmesí. V súvislosti s použiteľnosťou testov pri viaczložkových látkach/zmesiach sú v súčasnosti dostupné len obmedzené informácie (14) (15). Tieto testy sú napriek tomu technicky použiteľné aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa však malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo ([2]). Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. Okrem toho by sa pri testovaní viaczložkových látok alebo zmesí mala zvážiť možná interferencia medzi cytotoxickými zložkami a pozorovanými reakciami.

([1]) V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí OECD dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných usmerneniach OECD na vykonávanie testov na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália“.

([2]) Táto veta bola navrhnutá a schválená na zasadnutí WNT v apríli 2014.

LITERATÚRA

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na lokalite: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. K dispozícii na lokalite: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Kapitola B.42 tejto prílohy: Lokálna skúška lymfatických uzlín.

(4) Kapitola B.6 tejto prílohy: Podráždenie pokožky.

(5) Kapitola B.50 tejto prílohy: Senzibilizácia kože: lokálna skúška lymfatických uzlín: DA.

(6) Kapitola B.51 tejto prílohy: Senzibilizácia kože: lokálna skúška lymfatických uzlín: BrdU-ELISA.

(7) Kapitola B.59 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia *in chemico*: skúška priamej peptidovej reaktivity (DPRA).

(8) Kapitola B.60 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia *in vitro*: testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Dodatok 1

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA IN VITRO: TEST AKTIVÁCIE ĽUDSKEJ BUNKOVEJ LÍNIE (H-CLAT)

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. V teste h-CLAT sa kvantifikujú zmeny expresie povrchových bunkových markerov v súvislosti s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek (DC) (t. j. CD86 a CD54) v bunkovej línii THP-1 ľudskej monocytovej leukémie po expozícii senzibilizátorom (1) (2). Namerané úrovne expresie povrchových bunkových markerov CD86 a CD54 následne slúžia ako ukazovateľ pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.

2. Test h-CLAT sa posudzoval v rámci validačnej štúdie koordinovanej referenčným laboratóriom Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách (EURL ECVAM) a v následnom nezávislom partnerskom preskúmaní zo strany vedeckého poradného výboru laboratória EURL ECVAM (ESAC). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán vydalo laboratórium EURL ECVAM odporúčanie (3), aby sa test h-CLAT používal na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v rámci IATA na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov z testu h-CLAT v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Preukázalo sa, že test h-CLAT je prenosný do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s technikami týkajúcimi sa bunkových kultúr a s analýzou pomocou prietokovej cytometrie. Úroveň reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tohto testu očakávať, je rádovo 80 % v rámci laboratória a medzi laboratóriami (3) (12). Z výsledkov získaných vo validačnej štúdii (13) a v iných uverejnených štúdiách (14) celkovo vyplýva, že v porovnaní s výsledkami LLNA presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 85 % (N = 142) s citlivosťou 93 % (94/101) a so špecifickosťou 66 % (27/41) [na základe opakovanej analýzy uskutočnenej laboratóriom EURL ECVAM (12), v ktorej sa zohľadnili všetky existujúce údaje a nebrali sa do úvahy negatívne výsledky pre chemikálie s hodnotou log Kow vyššou než 3,5, ako sa opisuje v odseku 4]. Test h-CLAT s väčšou pravdepodobnosťou povedie k falošne negatívnym prognózam v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízku až miernu potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysokú potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (4) (13) (15). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že metóda h-CLAT je užitočná a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti z hľadiska kožnej senzibilizácie. Uvedené hodnoty presnosti testu h-CLAT ako samostatného testu sú však len orientačné, keďže test sa má hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa preukázalo, že metódu h-CLAT možno použiť v prípade testovaných chemikálií, ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, majú rôzne mechanizmy reakcie, potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (ako bolo stanovené v štúdiách *in vivo*) a rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti (3) (14) (15). Metóda h-CLAT sa používa pri testovaní chemikálií, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí ani neoddelí od rozpúšťadla/nosiča do rôznych fáz) vo vhodnom rozpúšťadle/nosiči (pozri odsek 14). Pri testovaných chemikáliách s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 je vyššia pravdepodobnosť vzniku falošne negatívnych výsledkov (14). Negatívne výsledky pre testované chemikálie s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 sa preto nemajú brať do úvahy. Pozitívne výsledky získané v prípade testovaných chemikálií s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 však možno použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako kožného senzibilizátora. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity použitej bunkovej línie (16) a experimentálnych podmienok vykazovať v teste h-CLAT negatívne výsledky aj pro-haptény (t. j. látky, ktoré musia byť aktivované enzymaticky, napríklad enzýmami P450) a pre-haptény (t. j. látky aktivované oxidáciou), zvlášť tie s pomalou oxidáciou (15). Fluorescenčné testované chemikálie možno hodnotiť pomocou testu h-CLAT (17), silné fluorescenčné testované chemikálie, ktoré emitujú svetlo na rovnakej vlnovej dĺžke ako fluoresceín-izotio-kyanát (FITC) alebo propídium-jodid (PI), však budú ovplyvňovať detekciu pomocou prietokovej cytometrie, a preto ich nemožno správne hodnotiť pomocou protilátok konjugovaných s FITC alebo pomocou PI. V takom prípade možno použiť iné protilátky označené fluorochrómom alebo iné markery cytotoxicity, pokiaľ sa preukázalo, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky označené pomocou FITC (pozri odsek 24) alebo PI (pozri odsek 18), napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Vzhľadom na vyššie uvedené informácie je negatívne výsledky potrebné interpretovať v kontexte uvedených obmedzení a spoločne s inými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti metódy h-CLAT na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa táto metóda nemala pri týchto špecifických kategóriách použiť.

5. Ako bolo opísané vyššie, metóda h-CLAT umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie (4) (5) (9), ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky testu h-CLAT môžu prispieť k posudzovaniu tejto potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.1.

PRINCÍP TESTU

7. Metóda h-CLAT predstavuje skúšku *in vitro*, v ktorej sa kvantifikujú zmeny expresie povrchových bunkových markerov (t. j. CD86 a CD54) v bunkách THP-1 bunkovej línie ľudskej monocytovej leukémie po 24-hodinovej expozícii testovanej chemikálii. Tieto povrchové molekuly predstavujú typické markery aktivácie monocytových buniek THP-1 a môžu imitovať aktiváciu dendritových buniek, ktorá zohráva významnú úlohu pri prvotnej aktivácii T-buniek. Zmeny expresie povrchových markerov sa merajú pomocou prietokovej cytometrie po zafarbení buniek pomocou protilátok označených fluorochrómom. Súčasne sa uskutočňuje meranie cytotoxicity s cieľom posúdiť, či pri nižších ako cytotoxických koncentráciách takisto dochádza k zvýšeniu expresie povrchových markerov. Vypočíta sa relatívna intenzita fluorescencie povrchových markerov v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom, ktorá sa použije v prognostickom modeli (pozri odsek 26) na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

8. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 11) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 20 – 22) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

9. Tento test je založený na protokole DB-ALM (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation – databázová služba v súvislosti s alternatívnymi metódami k pokusom na zvieratách) č. 158 k testu h-CLAT (18), ktorý predstavuje protokol použitý pri validačnej štúdii koordinovanej laboratóriom EURL ECVAM. Tento protokol sa odporúča používať pri vykonávaní a používaní metódy h-CLAT v laboratóriu. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov testu h-CLAT, ktorý sa skladá z dvoch krokov: *skúška na stanovenie dávky* a *meranie expresie CD86/CD54*.

Príprava buniek

10. Na vykonanie metódy h-CLAT sa používa bunková línia THP-1 ľudskej monocytovej leukémie. Odporúča sa, aby sa bunky (TIB-202™) získali z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad bunková banka ATCC (American Type Culture Collection).

11. Bunky THP-1 sa kultivujú pri teplote 37°C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2 v rastovom médiu RPMI-1640 s pridaním 10 % bovinného fetálneho séra (FBS), 2-merkaptoetanolu s koncentráciou 0,05 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 μg/ml streptomycínu. Je možné vyhnúť sa použitiu penicilínu a streptomycínu v rastovom médiu. V takom prípade však musia používatelia overiť, že neprítomnosť antibiotík v rastovom médiu nemá vplyv na výsledky, a to napríklad testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. S cieľom minimalizovať riziko kontaminácie je v každom prípade potrebné dodržiavať osvedčené postupy kultivácie buniek bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť antibiotík v médiu na kultiváciu buniek. Bunky THP-1 sa štandardne nasadia každé 2 – 3 dni s hustotou 0,1 až 0,2 × 10^6 buniek/ml. Je potrebné ich udržiavať pri hustote 0,1 až 1,0 × 10^6 buniek/ml. Pred použitím na testovanie sa bunky kvalifikujú uskutočnením kontroly reaktivity. Kontrola reaktivity buniek sa má uskutočniť dva týždne po rozmrazení pomocou pozitívnych kontrol, 2,4-dinitrochlórbenzénu (DNCB) (č. CAS 97-00-7, čistota ≥ 99 %) a síranu nikelnatého ($NiSO_4$) (č. CAS 10101-97-0, čistota ≥ 99 %), a negatívnej kontroly, kyseliny mliečnej (LA) (č. CAS 50-21-5, čistota ≥ 85 %). DNCB aj $NiSO_4$ majú vyvolať pozitívnu reakciu povrchových bunkových markerov CD86 aj CD54 a LA má vyvolať negatívnu reakciu povrchových bunkových markerov CD86 aj CD54. V rámci skúšky sa použijú len bunky, ktoré vyhovejú pri kontrole reaktivity. Bunky možno po rozmrazení rozmnožovať až dva mesiace. Nemá sa prekročiť 30 pasáží. Kontrola reaktivity sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 20 – 24.

12. Na účely testovania sa bunky THP-1 nasadia s hustotou 0,1 × 10^6 buniek/ml alebo 0,2 × 10^6 buniek/ml a predbežne sa kultivujú v kultivačných bankách 72 hodín, resp. 48 hodín. Dôležité je, aby hustota buniek v kultivačnej banke priamo po období predbežnej kultivácie bola v každom pokuse čo najrovnomernejšia (na základe jednej z dvoch podmienok predbežnej kultivácie opísaných vyššie), pretože hustota buniek v kultivačnej banke priamo po predbežnej kultivácii môže ovplyvňovať expresiu CD86/CD54 vyvolanú alergénmi (19). V deň testovania sa bunky zozbierané z kultivačnej banky resuspendujú pomocou čerstvého rastového média s koncentráciou 2 × 10^6 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 24-jamkovú platničku s plochým dnom (500 µl, 1 × 10^6 buniek/jamka) alebo na 96-jamkovú mikrotitračnú platničku s plochým dnom (80 µl, 1,6 × 10^5 buniek/jamka).

Skúška na stanovenie dávky

13. *Skúška na stanovenie dávky* sa uskutočňuje s cieľom stanoviť hodnotu CV75 predstavujúcu koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá spôsobuje 75 % životaschopnosť buniek (CV) v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom. Na základe hodnoty CV75 sa stanovuje koncentrácia testovaných chemikálií na meranie expresie *CD86/CD54* (pozri odseky 20 – 24).

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

14. Testované chemikálie a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade metódy h-CLAT sa testované chemikálie rozpustia alebo stabilne rozmiešajú (pozri aj odsek 4) vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu, ktoré predstavujú prvú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, alebo v dimetylsulfoxide (DMSO, čistota ≥ 99 %), ktorý predstavuje druhú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, ak testovaná chemikália nie je rozpustná ani nevytvára stabilnú disperziu v prvých dvoch rozpúšťadlách, a to s konečnými koncentráciami 100 mg/ml (vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu) alebo 500 mg/ml (v DMSO). Iné rozpúšťadlá/nosiče ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie. Zohľadňuje sa aj stabilita testovanej chemikálie v konečnom rozpúšťadle/nosiči.

15. Vykonajú sa tieto kroky riedenia, pričom sa začne pri zásobnom roztoku testovanej chemikálie s koncentráciou 100 mg/ml (vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu) alebo 500 mg/ml (v DMSO):

— V prípade použitia fyziologického roztoku alebo rastového média ako rozpúšťadla/nosiča: Pripraví sa osem zásobných roztokov (osem koncentrácií) pomocou dvojnásobných sériových riedení s príslušným rozpúšťadlom/nosičom. Tieto zásobné roztoky sa ďalej 50-násobne zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Ak najvyššia konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke predstavujúca 1 000 µg/ml nie je toxická, opätovne sa stanoví maximálna koncentrácia pomocou nového testu cytotoxicity. Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 5 000 µg/ml v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú rozpustené alebo stabilne rozmiešané vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu.

— V prípade použitia DMSO ako rozpúšťadla/nosiča: Pripraví sa osem zásobných roztokov (osem koncentrácií) pomocou dvojnásobných sériových riedení s príslušným rozpúšťadlom/nosičom. Tieto zásobné roztoky sa ďalej 250-násobne zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 1 000 µg/ml, aj keď táto koncentrácia nie je toxická.

Pracovné roztoky sa nakoniec použijú na expozíciu pridaním rovnakého objemu pracovného roztoku do objemu bunkovej suspenzie THP-1 na mikrotitračnej platničke (pozri aj odsek 17), aby sa dosiahlo ďalšie dvojnásobné riedenie (konečný rozsah koncentrácií na mikrotitračnej platničke je zvyčajne 7,81 – 1 000 µg/ml).

16. V metóde h-CLAT sa ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom používa rastové médium [v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných (pozri odsek 4) v rastovom médiu alebo vo fyziologickom roztoku] alebo DMSO (v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných v DMSO), ktoré sa na mikrotitračnej platničke testuje v jednej konečnej koncentrácii 0,2 %. Riedi sa rovnakým spôsobom, ako je opísané pri pracovných roztokoch v odseku 15.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

17. Rastové médium alebo pracovné roztoky opísané v odsekoch 15 a 16 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými na 24-jamkovej alebo 96-jamkovej platničke s plochým dnom (pozri odsek 12). Ošetrené platničky sa potom inkubujú 24 ±0,5 hod. pri teplote 37°C a v atmosfére s obsahom 5 % CO_2. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii testovanými chemikáliami medzi jamkami, napr. hermetickým uzatvorením platničky pred inkubáciou s testovanými chemikáliami (20).

Farbenie pomocou propídium-jodidu (PI)

18. Po expozícii v trvaní 24 ±0,5 hod. sa bunky prenesú do vzorkových skúmaviek a vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie. Supernatanty sa odstránia a zvyšné bunky sa resuspendujú pomocou 200 µl (v prípade použitia 96 jamiek) alebo 600 µl (v prípade použitia 24 jamiek) fosfátového tlmivého fyziologického roztoku obsahujúceho 0,1 % bovinného sérového albumínu (vyfarbovací tlmivý roztok). 200 µl bunkovej suspenzie sa prenesie do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky s okrúhlym dnom (v prípade použitia 96 jamiek) alebo do mikroskúmavky (v prípade použitia 24 jamiek) a dvakrát sa premyje pomocou 200 µl (v prípade použitia 96 jamiek) alebo 600 µl (v prípade použitia 24 jamiek) vyfarbovacieho tlmivého roztoku. Nakoniec sa bunky resuspendujú vo vyfarbovacom tlmivom roztoku (napr. 400 µl) a pridá sa roztok PI (napr. 20 µl) (konečná koncentrácia PI je napríklad 0,625 µg/ml). Možno použiť iné markery cytotoxicity, ako je 7-aminoaktinomycín D (7-AAD), trypánová modrá alebo iné látky, ak pri alternatívnych farbivách možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako PI, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2.

Meranie cytotoxicity pomocou prietokovej cytometrie a odhad hodnoty CV75

19. Príjem PI sa analyzuje pomocou prietokovej cytometrie s akvizičným kanálom FL-3. Vyžaduje sa celkový počet 10 000 živých buniek (bez prítomnosti PI). Životaschopnosť buniek možno vypočítať v analytickom programe cytometra pomocou rovnice uvedenej ďalej. V prípade nízkej životaschopnosti buniek je potrebné získať až 30 000 buniek vrátane mŕtvych buniek. Údaje možno prípadne získať počas jednej minúty po začatí analýzy.

$$Životaschopnosť\ buniek = \frac{Počet\ živých\ buniek}{Celkový\ počet\ získaných\ buniek} \times 100$$

Hodnota CV75 (pozri odsek 13), t. j. koncentrácia, pri ktorej sa prejavuje 75 % prežitie buniek THP-1 (25 % cytotoxicita), sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie podľa tejto rovnice:

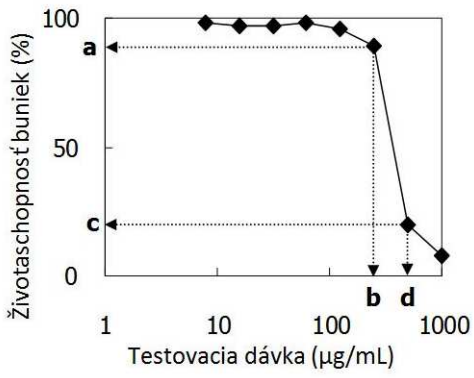
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

Keď:

a je minimálna hodnota životaschopnosti buniek nad 75 %

c je maximálna hodnota životaschopnosti buniek pod 75 %

b a d sú koncentrácie, pri ktorých sa prejavuje hodnota životaschopnosti buniek a, resp. c



Na odvodenie hodnoty CV75 možno použiť aj iné prístupy, pokiaľ sa preukáže, že to nemá vplyv na výsledky (napr. pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti).

Meranie expresie CD86/CD54

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

20. Na rozpustenie alebo stabilné rozmiešanie testovaných chemikálií sa používa vhodné rozpúšťadlo/nosič (fyziologický roztok, rastové médium alebo DMSO; pozri bod 14). Testované chemikálie sa najskôr zriedia na koncentráciu, ktorá zodpovedá 100-násobku (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 500-násobku (v prípade DMSO) hodnoty 1,2 × CV75 stanovenej v *skúške na stanovenie dávky* (pozri odsek 19). Ak hodnotu CV75 nemožno určiť (t. j. v *skúške na stanovenie dávky* sa nepozoruje dostatočná toxicita), ako počiatočná koncentrácia sa použije najvyššia rozpustná alebo stabilne rozmiešaná koncentrácia testovanej chemikálie pripravená pomocou jednotlivého rozpúšťadla/nosiča. Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 5 000 μg/ml (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 1 000 μg/ml (v prípade DMSO). Ďalej sa pomocou príslušného rozpúšťadla/nosiča uskutočnia 1,2-násobné sériové riedenia, aby sa získali zásobné roztoky [osem koncentrácií v rozsahu od 100 × 1,2 × CV75 do 100 × 0,335 × CV75 (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo od 500 × 1,2 × CV75 do 500 × 0,335 × CV75 (v prípade DMSO)], ktoré sa budú testovať v rámci metódy h-CLAT (pozri príklad schémy dávkovania v protokole DB-ALM č. 158). Tieto zásobné roztoky sa ďalej 50-násobne (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 250-násobne (v prípade DMSO) zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Tieto pracovné roztoky sa nakoniec použijú na expozíciu s použitím ďalšieho faktora na konečné dvojnásobné riedenie na mikrotitračnej platničke. Ak výsledky nevyhovujú kritériám prijateľnosti opísaným v odsekoch 29 a 30 v súvislosti so životaschopnosťou buniek, môže sa zopakovať *skúška na stanovenie dávky* s cieľom určiť presnejšiu hodnotu CV75. Na meranie expresie CD86/CD54 možno použiť len 24-jamkové platničky.

21. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom sa pripraví podľa opisu v odseku 16. Ako pozitívna kontrola sa pri metóde h-CLAT používa DNCB (pozri odsek 11), pričom sa pripravia zásobné roztoky v DMSO a zriedia sa podľa opisu pre zásobné roztoky v odseku 20. DNCB sa použije na platničke ako pozitívna kontrola na *meranie expresie CD86/CD54* v jednej konečnej koncentrácii (zvyčajne 4,0 μg/ml). Na získanie koncentrácie 4,0 μg/ml DNCB na platničke sa pripraví zásobný roztok 2 mg/ml DNCB v DMSO a ďalej sa 250-násobne zriedi s rastovým médiom na pracovný roztok s koncentráciou 8 μg/ml. Prípadne možno ako koncentráciu pozitívnej kontroly použiť hodnotu CV75 DNCB, ktorá sa stanovuje v každom testovacom zariadení. Použiť možno iné vhodné pozitívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov. V prípade pozitívnych kontrol nemá daná jedna konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke prekročiť 5 000 μg/ml (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 1 000 μg/ml (v prípade DMSO). Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu sú rovnaké ako kritériá prijateľnosti opísané pre testovanú chemikáliu (pozri odsek 29) okrem posledného kritéria prijateľnosti, keďže sa pozitívna kontrola testuje v jednej koncentrácii.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

22. Pre každú testovanú chemikáliu a kontrolnú látku sa na získanie prognózy vyžaduje jeden pokus. Súčasťou každého pokusu sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly na účely *merania expresie CD86/CD54* (pozri odseky 26 – 28). Jednotlivé nezávislé testovacie cykly sa uskutočnia v rôznych dňoch alebo v ten istý deň za predpokladu, že sa pre každý testovací cyklus: a) pripravia nezávislé čerstvé zásobné roztoky a pracovné roztoky testovanej chemikálie a roztoky s protilátkami a b) použijú sa nezávisle odobraté bunky (t. j. bunky sa odoberú z rôznych kultivačných baniek); bunky však môžu pochádzať z rovnakej pasáže. Testované chemikálie a kontrolné látky pripravené ako pracovné roztoky (500 μl) sa zmiešajú s 500 μl suspendovaných buniek (1×10^6 buniek) v pomere 1:1 a bunky sa inkubujú 24 ±0,5 hod. podľa opisu v odsekoch 20 a 21. V každom testovacom cykle je postačujúci jeden replikát každej koncentrácie testovanej chemikálie a kontrolnej látky, pretože sa prognóza stanovuje najmenej na základe dvoch nezávislých testovacích cyklov.

Farbenie buniek a analýza

23. Po expozícii v trvaní 24 ±0,5 hod. sa bunky prenesú z 24-jamkovej platničky do vzorkových skúmaviek, vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie a potom sa dvakrát premyjú pomocou 1 ml vyfarbovacieho tlmivého roztoku (v prípade potreby možno uskutočniť ďalšie kroky premytia). Pre premytí sa uskutoční blokovanie buniek pomocou 600 μl blokujúceho roztoku [vyfarbovací tlmivý roztok s obsahom globulínu s koncentráciou 0,01 % (hm./obj.) (Cohnova frakcia II, III, ľudská; SIGMA, č. G2388-10G alebo ekvivalent)] a bunky sa 15 minút inkubujú pri teplote 4°C. Po blokovaní sa bunky rozdelia na tri alikvoty s objemom 180 μl do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky alebo mikroskúmavky.

24. Po centrifugácii sa bunky zafarbia pomocou 50 μl anti-CD86 protilátok, anti-CD54 protilátok alebo myších protilátok (izotypu) IgG1 označených pomocou FITC pri teplote 4°C počas 30 min. Protilátky opísané v protokole DB-ALM č. 158 (18) k testu h-CLAT sa majú použiť zriedené v objemovom pomere 3:25 [pre CD86 (BD-PharMingen, č. 5556 57; klon: Fun-1)] alebo v objemovom pomere 3:50 [pre CD54 (DAKO, č. F7143; klon: 6.5B5) a IgG1 (DAKO, č. X0927)] s vyfarbovacím tlmivým roztokom. Tvorcovia testu vymedzili tieto faktory riedenia protilátok na základe toho, že poskytujú najlepší pomer signál-šum. Zo skúseností tvorcov testu vyplýva, že intenzita fluorescencie

protilátok je medzi rôznymi šaržami zvyčajne jednotná. Používatelia však môžu zvážiť titráciu protilátok v podmienkach vlastného laboratória s cieľom stanoviť najvhodnejšie koncentrácie, ktoré sa majú použiť. Iné anti-CD86 a/alebo anti-CD54 protilátky označené fluorochrómom možno použiť, ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky konjugované s FITC, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Je potrebné poznamenať, že výsledky môže ovplyvniť zmena klonu alebo dodávateľa protilátok, ako sa opisuje v protokole DB-ALM č. 158 (18) k testu h-CLAT. Po dvojnásobnom alebo viacnásobnom premytí pomocou 150 µl vyfarbovacieho tlmivého roztoku sa bunky resuspendujú vo vyfarbovacom tlmivom roztoku (napr. 400 µl) a pridá sa roztok PI (napr. 20 µl na dosiahnutie konečnej koncentrácie 0,625 µg/ml) alebo iný roztok markera cytotoxicity (pozri odsek 18). Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzujú úrovne expresie CD86 a CD54, ako aj životaschopnosť buniek.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

25. Expresia CD86 a CD54 sa analyzuje pomocou prietokovej cytometrie s akvizičným kanálom FL-1. Na základe geometrického priemeru intenzity fluorescencie (MFI) sa relatívna intenzita fluorescencie (RFI) CD86 a CD54 pre bunky pozitívnej kontroly a bunky ošetrené chemikáliou vypočíta podľa tohto vzorca:

$$RFI = \frac{\begin{array}{c}\textit{MFI buniek ošetrených chemikáliou} - \\ \textit{MFI buniek vizotypovej kontrole ošetrených chemikáliou}\end{array}}{\begin{array}{c}\textit{MFI kontr.buniek ošetrených rozpúšťadlom/} \\ \textit{nosičom} - \textit{FI buniek viz.kon.ošetrených rozp./nos.}\end{array}} \times 100$$

Životaschopnosť buniek dosiahnutá pri bunkách v izotypovej kontrole (ctrl) [ktoré sú zafarbené pomocou myších protilátok (izotypu) IgG1] sa takisto vypočíta podľa vzorca opísaného v odseku 19.

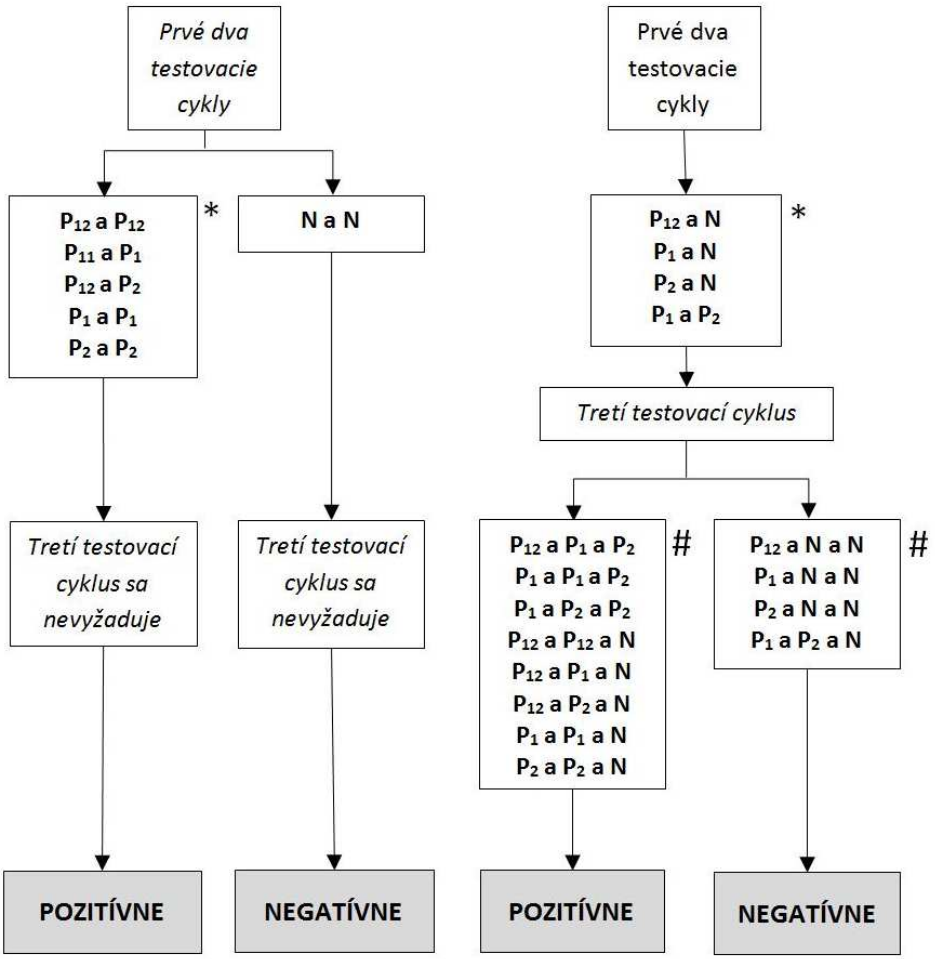
Prognostický model

26. Na účely merania expresie *CD86/CD54* sa každá testovaná chemikália testuje najmenej v dvoch nezávislých testovacích cykloch, aby sa odvodila jedna prognóza (POZITÍVNA alebo NEGATÍVNA). Prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU, ak je splnená aspoň jedna z týchto podmienok v 2 z 2 alebo aspoň v 2 z 3 nezávislých testovacích cyklov, inak sa prognóza v teste h-CLAT považuje za NEGATÍVNU (obrázok 1):

— hodnota RFI pre CD86 je rovnaká alebo vyššia než 150 % pri každej testovanej koncentrácii (so životaschopnosťou buniek ≥ 50 %),

— hodnota RFI pre CD54 je rovnaká alebo vyššia než 200 % pri každej testovanej koncentrácii (so životaschopnosťou buniek ≥ 50 %).

27. Na základe uvedených informácií platí, že ak sú oba prvé dva testovacie cykly pozitívne v prípade CD86 a/alebo sú oba pozitívne v prípade CD54, prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť. Podobne, ak sú prvé dva testovacie cykly negatívne pre oba markery, prognóza v teste h-CLAT sa považuje za NEGATÍVNU (s prihliadnutím na ustanovenia odseku 30) bez toho, aby bolo potrebné uskutočniť tretí testovací cyklus. Ak však prvé dva testovacie cykly nie sú zhodné aspoň pre jeden z markerov (CD54 alebo CD86), vyžaduje sa tretí testovací cyklus a konečná prognóza bude založená na väčšinovom výsledku z troch jednotlivých testovacích cyklov (t. j. 2 z 3). V tejto súvislosti je potrebné poznamenať, že ak sa uskutočnia dva nezávislé testovacie cykly a jeden z nich je pozitívny len pre CD86 (ďalej len „P_1“) a druhý je pozitívny len pre CD54 (ďalej len „P_2“), vyžaduje sa tretí testovací cyklus. Ak je tento tretí testovací cyklus negatívny pre oba markery (ďalej len „N“), prognóza v teste h-CLAT sa považuje za NEGATÍVNU. Na druhej strane, ak je tretí testovací cyklus pozitívny pre jeden z markerov (P_1 alebo P_2) alebo pre oba markery (ďalej len „P_{12}“), prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU.



Obrázok 1 Prognostický model použitý v metóde h-CLAT Prognóza v teste h-CLAT by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu.

P_1: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom len pre CD86; P_2: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom len pre CD54; P_{12}: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom pre CD86 aj CD54; N: testovací cyklus, ktorý nie je pozitívny pre CD86 ani pre CD54.

*V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z prvých dvoch testovacích cyklov bez ohľadu na poradie, v akom sa mohli získať.

#V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z troch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých dvoch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku, neodrážajú však poradie, v akom sa mohli získať.

28. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú na základe prognózy v teste h-CLAT považované za POZITÍVNE, sa voliteľne môžu stanoviť dve hodnoty účinnej koncentrácie (EC), EC150 pre CD86, resp. EC200 pre CD54, čo je koncentrácia, pri ktorej testované chemikálie viedli k indukcii RFI s hodnotou 150 alebo 200. Tieto hodnoty EC môžu potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie (9), ak sa použijú v rámci integrovaných prístupov ako IATA (4) (5) (6) (7) (8). Možno ich vypočítať pomocou týchto rovníc:

$$EC150\ (pre\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200\ (pre\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

keď

A_{conc} je najnižšia koncentrácia v µg/ml s hodnotou RFI > 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

B_{conc} je najvyššia koncentrácia v µg/ml s hodnotou RFI < 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

A_{RFI} je hodnota RFI pri najnižšej koncentrácii s hodnotou RFI > 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

B_{RFI} je hodnota RFI pri najvyššej koncentrácii s hodnotou RFI < 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

Na účely presnejšieho odvodenia hodnôt EC150 a EC200 sa môžu vyžadovať tri nezávislé testovacie cykly *merania expresie CD86/CD54*. Konečné hodnoty EC150 a EC200 sa potom určia ako hodnota mediánu účinných koncentrácií (EC) vypočítaných z troch nezávislých testovacích cyklov. Keď kritériá pozitívnosti spĺňajú len dva z troch nezávislých testovacích cyklov (pozri odseky 26 – 27), použije sa vyššia hodnota EC150 alebo EC200 z dvoch vypočítaných hodnôt.

Kritériá prijateľnosti

29. Pri použití metódy h-CLAT majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti (22) (27).

— Hodnoty životaschopnosti buniek kontrol s rastovým médiom a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom majú byť vyššie ako 90 %.

— Pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla/kontrole s nosičom nemajú hodnoty RFI pre CD86 ani pre CD54 prekročiť kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky (RFI pre CD86 ≥ 150 % a RFI pre CD54 ≥ 200 %). Hodnoty RFI kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom sa vypočítajú pomocou vzorca opísaného v odseku 25 [výraz „MFI chemikálie“ sa nahrádza výrazom „MFI rozpúšťadla/nosiča“ a výraz „MFI rozpúšťadla/nosiča“ sa nahrádza výrazom „MFI kontroly (s rastovým médiom)“].

— Pre kontroly s rastovým médiom aj kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom má byť pomer MFI pre CD86 aj pre CD54 voči izotypovej kontrole > 105 %.

— V pozitívnej kontrole (DNCB) majú hodnoty RFI pre CD86 aj CD54 spĺňať kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky (RFI pre CD86 ≥ 150 a RFI pre CD54 ≥ 200) a životaschopnosť buniek má byť vyššia ako 50 %.

— V prípade testovanej chemikálie má byť životaschopnosť buniek vyššia ako 50 % najmenej v štyroch testovaných koncentráciách v každom testovacom cykle.

30. Negatívne výsledky sú prijateľné len pri testovaných chemikáliách, pri ktorých sa prejavuje životaschopnosť buniek nižšia ako 90 % pri najvyššej testovanej koncentrácii (t. j. 1,2 × CV75 podľa schémy sériového riedenia opísanej v odseku 20). Ak je životaschopnosť buniek pri koncentrácii 1,2 × CV75 rovnaká alebo vyššia ako 90 %, tento negatívny výsledok sa vyradí. V takom prípade sa odporúča spresniť výber dávky opakovaným stanovením hodnoty CV75. Je potrebné poznamenať, že keď sa ako maximálna testovaná koncentrácia testovanej chemikálie použije 5 000 μg/ml vo fyziologickom roztoku (alebo v rastovom médiu či iných rozpúšťadlách/nosičoch), 1 000 μg/ml v DMSO alebo najvyššia rozpustná koncentrácia, negatívny výsledok je prijateľný, aj keď je životaschopnosť buniek vyššia ako 90 %.

Správa o teste

31. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, log Kow, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Kontroly

Pozitívna kontrola

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Negatívna kontrola a kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné kontrolné rozpúšťadlá/nosiče ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitého testu,

— použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),

— použitá prietoková cytometria (napr. model) vrátane použitých nastavení prístroja, globulínu, protilátok a markera cytotoxicity,

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti a postup použitý na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času, napr. údaje o historických kontrolách a/alebo údaje o historických kontrolách reaktivity.

Kritériá prijateľnosti testu

— hodnoty životaschopnosti buniek, hodnoty MFI a RFI získané pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty RFI získané pomocou pozitívnej kontroly v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— životaschopnosť buniek pri všetkých testovaných koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací postup

— počet použitých testovacích cyklov,

— použité koncentrácie testovaných chemikálií, ich použitie a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

— údaje v tabuľkovej podobe vrátane CV75 (v uplatniteľnom prípade), individuálnych geometrických priemerov MFI, RFI, hodnôt životaschopnosti buniek, hodnôt EC150/EC200 (v uplatniteľnom prípade) získaných pri testovanej chemikálii a pri pozitívnej kontrole v každom testovacom cykle, ako aj uvedenie hodnotenia testovanej chemikálie podľa prognostického modelu,

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— rozbor výsledkov získaných metódou h-CLAT,

— posúdenie výsledkov testu v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Závery

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na lokalite: 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). K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599 – 609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275 – 284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683 – 1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81 – 88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23. K dispozícii na lokalite: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70 – 82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89 – 96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, s. 96.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. K dispozícii na lokalite: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na lokalite: 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.

Dodatok 1.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (21).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (22).

Chemikália: látka alebo zmes.

CV75: odhadovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje 75 % životaschopnosť buniek.

EC150: koncentrácie, pri ktorých sa vykazujú hodnoty RFI 150 pri expresii CD86.

EC200: koncentrácie, pri ktorých sa vykazujú hodnoty RFI 200 pri expresii CD54.

Prietoková cytometria: cytometrická technika, pri ktorej bunky rozmiešané v kvapaline prechádzajú jednotlivo cez ohnisko excitovaného svetla, ktoré je rozptýlené podľa vzorov charakteristických pre bunky a ich zložky. Bunky sa často označujú pomocou fluorescenčných markerov, vďaka čomu sa svetlo najskôr absorbuje a následne emituje v zmenených frekvenciách.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Kontrola s rastovým médiom: neošetrený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou, ako aj s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relatívna fluorescenčná intenzita (RFI): relatívne hodnoty geometrického priemeru intenzity fluorescencie (MFI) v bunkách ošetrených chemikáliou v porovnaní s hodnotou MFI pri bunkách ošetrených rozpúšťadlom/nosičom.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (21).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (21).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (21).

Vyfarbovací tlmivý roztok: fosfátový tlmivý fyziologický roztok obsahujúci 0,1 % bovinného sérového albumínu.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (21).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto metódy.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (23).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platný test: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (21).

Dodatok 1.2

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku testu h-CLAT v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty CV75, EC150 a EC200, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou metódy h-CLAT. Pre metódu h-CLAT sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (3) (14).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri metóde h-CLAT

Látky na preukázanie spôsobilosti	Registračné číslo CAS	Skupenstvo	Prognóza *in vivo* (1)	Referenčný rozsah CV75 v µg/ml (2)	Výsledky h-CLAT pre CD86 (referenčný rozsah EC150 v µg/ml) (2)	Výsledky h-CLAT pre CD54 (Referenčný rozsah EC200 v µg/ml) (2)
2,4-dinitrochlórbenzén	97-00-7	tuhé	senzibilizátor (extrémny)	2 – 12	pozitívne (0,5 – 10)	pozitívne (0,5 – 15)
4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhé	senzibilizátor (silný)	5 – 95	pozitívne (< 40)	negatívne (> 1,5) (3)
síran nikelnatý	10101-97-0	tuhé	senzibilizátor (mierny)	30 – 500	pozitívne (< 100)	pozitívne (10 – 100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhé	senzibilizátor (mierny)	30 – 400	negatívne (> 10) (3)	pozitívne (10 – 140)
R(+)-limonén	5989-27-5	kvapalné	senzibilizátor (slabý)	> 20	negatívne (> 5) (3)	pozitívne (< 250)
imidazolidinyl močovina	39236-46-9	tuhé	senzibilizátor (slabý)	25 – 100	pozitívne (20 – 90)	pozitívne (20 – 75)
izopropanol	67-63-0	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	> 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
glycerol	56-81-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	> 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
kyselina mliečna	50-21-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	1 500 – 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
kyselina 4-aminobenzoová	150-13-0	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	> 1 000	negatívne (> 1 000)	negatívne (> 1 000)

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Prognóza nebezpečnosti (a potencie) *in vivo* na základe údajov LLNA (3) (14). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (24).

(2) Na základe historických pozorovaných hodnôt (13) (25).

(3) Historicky sa väčšina negatívnych výsledkov získala pre tento marker, a preto sa prevažne očakáva negatívny výsledok. Uvedený rozsah bol vymedzený na základe malého počtu historicky pozorovaných pozitívnych výsledkov. V prípade, že sa získa pozitívny výsledok, hodnota EC má byť v rámci uvádzaného referenčného rozsahu.

Dodatok 2

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: TEST AKTIVÁCIE BUKOVEJ LÍNIE U937 (U-SENS™)

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. V teste U-SENS™ sa kvantifikuje zmena expresie povrchového bunkového markera v súvislosti s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek (DC) (t. j. CD86) v bunkovej línii U937 ľudského histiocytového lymfómu po expozícii senzibilizátorom (1). Namerané úrovne expresie povrchového bunkového markera CD86 v bunkovej línii U937 následne slúžia ako ukazovateľ pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.

2. Test U-SENS™ sa hodnotil v rámci validačnej štúdie (2) koordinovanej spoločnosťou L'Oreal a následne bol predmetom nezávislého partnerského preskúmania zo strany vedeckého poradného výboru (ESAC) referenčného laboratória Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách (EURL ECVAM) (3). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán vydalo laboratórium EURL ECVAM odporúčanie (4), aby sa test U-SENS™ používal na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v rámci IATA na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. OECD sa v usmerňovacom dokumente o vykazovaní štruktúrovaných prístupov k integrácii údajov a k individuálnym zdrojom informácií, ktoré sa používajú v rámci IATA v prípade kožnej senzibilizácie, v súčasnosti venuje viacerým prípadovým štúdiám opisujúcim rôzne stratégie testovania a prognostické modely. Jeden z uvedených rôznych vymedzených prístupov je založený na skúške U-SENS (5). Príklady použitia údajov z testu U-SENS™ v kombinácii s inými informáciami vrátane historických údajov a existujúcich platných údajov o ľuďoch (6) sú uvedené v literatúre (4) (5) (7).

3. Preukázalo sa, že test U-SENS™ je prenosný do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s technikami týkajúcimi sa bunkových kultúr a s analýzou pomocou prietokovej cytometrie. Úroveň reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tohto testu očakávať, je rádovo 90 % v rámci laboratória a 84 % medzi laboratóriami (8). Z výsledkov získaných vo validačnej štúdii (8) a v iných uverejnených štúdiách (1) celkovo vyplýva, že v porovnaní s výsledkami LLNA presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 86 % (N = 166) s citlivosťou 91 % (118/129) a so špecifickosťou 65 % (24/37). V porovnaní s výsledkami u ľudí presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 77 % (N = 101) s citlivosťou 100 % (58/58) a so špecifickosťou 47 % (20/43). V porovnaní s LLNA povedie test U-SENS™ s väčšou pravdepodobnosťou k falošne negatívnym prognózam v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízku až miernu potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysokú potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (1) (8) (9). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že test U-SENS™ je užitočný a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti z hľadiska kožnej senzibilizácie. Uvedené hodnoty presnosti testu U-SENS™ ako samostatného testu sú však len orientačné, keďže test sa má hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa preukázalo, že test U-SENS™ možno použiť v prípade testovaných chemikálií (vrátane zložiek kozmetických výrobkov, napr. konzervačných látok, povrchovo aktívnych látok, účinných látok, farbív), ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, fyzikálno-chemické vlastnosti, potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (na základe stanovenia v štúdiách *in vivo*) a spektrum mechanizmov reakcie, o ktorých je známe, že súvisia s kožnou senzibilizáciou (t. j. Michaelov akceptor, vznik Schiffových zásad, prvok sprostredkujúci prenos acylovej skupiny, nukleofilná bimolekulová substitúcia [SN2] alebo nukleofilná substitúcia na aromatickom jadre [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Test U-SENS™ sa používa pri testovaní chemikálií, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí ani neoddelí od rozpúšťadla/nosiča do rôznych fáz) vo vhodnom rozpúšťadle/nosiči (pozri odsek 13). Pomocou testu U-SENS™ sa dosiahla správna prognóza v prípade chemikálií, ktoré sú v množine údajov uvádzané ako pre-haptény (t. j. látky aktivované oxidáciou) alebo pro-haptény (t. j. látky vyžadujúce enzymatickú aktiváciu, napríklad pomocou enzýmov P450) (1) (10). Látky spôsobujúce narušenie membrány môžu viesť k falošne pozitívnym výsledkom vzhľadom na nešpecifické zvýšenie expresie CD86, keďže 3 zo 7 falošne pozitívnych látok vzhľadom na referenčnú klasifikáciu *in vivo* boli povrchovo aktívne látky (1). Takéto pozitívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok je potrebné posudzovať

obozretne, zatiaľ čo negatívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok možno použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako látky nespôsobujúcej senzibilizáciu. Fluorescenčné testované chemikálie možno hodnotiť pomocou testu U-SENS™ (1), silné fluorescenčné testované chemikálie, ktoré emitujú svetlo na rovnakej vlnovej dĺžke ako fluoresceín-izotio-kyanát (FITC) alebo propídium-jodid (PI), však budú ovplyvňovať detekciu pomocou prietokovej cytometrie, a preto ich nemožno správne hodnotiť pomocou protilátok konjugovaných s FITC (potenciálne falošne negatívny výsledok) alebo pomocou PI (nie je možné merať životaschopnosť). V takom prípade možno použiť iné protilátky označené fluorochrómom alebo iné markery cytotoxicity, pokiaľ sa preukázalo, že poskytujú rovnaké výsledky ako protilátky označené pomocou FITC alebo PI (pozri odsek 18), napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Vzhľadom na vyššie uvedené informácie je potrebné interpretovať pozitívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok a negatívne výsledky v prípade silných fluorescenčných testovaných chemikálií v kontexte uvedených obmedzení a spoločne s inými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti testu U-SENS™ na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa tento test nemal pri týchto špecifických kategóriách použiť.

5. Ako bolo opísané vyššie, test U-SENS™ umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie, ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky testu U-SENS™ môžu prispieť k posudzovaniu tejto potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 2.1.

PRINCÍP TESTU

7. Test U-SENS™ predstavuje skúšku *in vitro*, v ktorej sa kvantifikujú zmeny expresie povrchového bunkového markera CD86 v bunkách U937 bunkovej línie ľudského histiocytového lymfómu po expozícii testovanej chemikálii v trvaní 45 ±3 hod. Povrchový marker CD86 je jedným typickým markerom aktivácie U937. Je známe, že CD86 je kostimulačná molekula, ktorá môže imitovať monocytovú aktiváciu zohrávajúcu významnú úlohu pri prvotnej aktivácii T-buniek. Zmeny expresie povrchového bunkového markera CD86 sa merajú pomocou prietokovej cytometrie po zafarbení buniek zvyčajne pomocou protilátok označených fluoresceín-izotio-kyanátom (FITC). Súčasne sa uskutočňuje aj meranie cytotoxicity (napr. pomocou PI) s cieľom posúdiť, či pri nižších ako cytotoxických koncentráciách dochádza k zvýšeniu expresie povrchového bunkového markera CD86. Vypočíta sa stimulačný index (SI) povrchového bunkového markera CD86 v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom, ktorý sa použije v prognostickom modeli (pozri odsek 19) na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

8. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2 v súlade so správnymi postupmi metód *in vitro* (11). Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 11) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 15 – 16) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

9. Tento test je založený na protokole DB-ALM (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation – databázová služba v súvislosti s alternatívnymi metódami k pokusom na zvieratách) č. 183 k testu U-SENS™ (12). Pri zavádzaní a využívaní testu U-SENS™ v laboratóriu sa majú používať štandardné prevádzkové postupy (SOP). Na používanie testu U-SENS™ možno použiť automatizovaný systém, ak pri ňom možno preukázať, že poskytuje podobné výsledky, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov testu U-SENS™.

Príprava buniek

10. Na vykonanie testu U-SENS™ sa používa bunková línia U937 ľudského histiocytového lymfómu (13). Bunky (klon CRL1593.2) sa majú získať z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad bunková banka ATCC (American Type Culture Collection).

11. Bunky U937 sa kultivujú pri teplote 37 °C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2 v rastovom médiu RPMI-1 640 s pridaním 10 % fetálneho teľacieho séra (FCS), L-glutamínu s koncentráciou 2 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu (úplné rastové médium). Pasážovanie buniek U937 sa štandardne uskutočňuje každé 2 – 3 dni s hustotou 1,5, resp. 3×10^5 buniek/ml. Hustota buniek nemá prekročiť 2×10^6 buniek/ml a životaschopnosť buniek, ktorá sa meria na základe vylúčenia trypánovej modrej, má byť ≥ 90 % (nemá sa použiť pri prvej pasáži po rozmrazení). Pred použitím na testovanie sa každá šarža buniek, FCS alebo protilátok kvalifikuje uskutočnením kontroly reaktivity. Na kontrolu reaktivity buniek sa používa pozitívna kontrola, kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová trihydrát: TNBS) (registračné číslo CAS 2 508-19-2, čistota ≥ 99 %), a negatívna kontrola, kyselina mliečna (LA) (registračné číslo CAS 50-21-5, čistota ≥ 85 %), a to aspoň jeden týždeň po rozmrazení. Na kontrolu reaktivity sa testuje šesť konečných koncentrácií pre každú z týchto dvoch kontrol (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml a LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). V prípade TNBS rozpustenej v úplnom rastovom médiu sa má pri CD86 dosiahnuť pozitívna reakcia a reakcia závislá od koncentrácie (napr. keď za pozitívnou koncentráciou, SI pre CD86 ≥ 150, nasleduje koncentrácia s rastúcou hodnotou SI pre CD86) a v prípade LA rozpustenej v úplnom rastovom médiu sa má pri CD86 dosiahnuť negatívna reakcia (pozri odsek 21). V rámci skúšky sa použije len tá šarža buniek, ktorá dvakrát vyhovela pri kontrole reaktivity. Bunky možno po rozmrazení rozmnožovať až sedem týždňov. Nemá sa prekročiť 21 pasáží. Kontrola reaktivity sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 18 – 22.

12. Na účely testovania sa bunky U937 nasadia s hustotou 3×10^5 buniek/ml alebo 6×10^5 buniek/ml a predbežne sa kultivujú v kultivačných bankách 2 dni, resp. 1 deň. Iné podmienky predbežnej kultivácie ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie a ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. V deň testovania sa bunky zozbierané z kultivačnej banky resuspendujú pomocou čerstvého rastového média s koncentráciou 5×10^5 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 96-jamkovú mikrotitračnú platničku s plochým dnom po 100 µl (konečná hustota buniek $0,5 \times 10^5$ buniek/jamka).

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

13. Pred testovaním sa uskutoční posúdenie rozpustnosti. Na tento účel sa testované chemikálie rozpustia alebo stabilne rozmiešajú s koncentráciou 50 mg/ml v úplnom rastovom médiu, ktoré predstavuje prvú možnosť pri výbere rozpúšťadla, alebo v dimetylsulfoxide (DMSO, čistota ≥ 99 %), ktorý predstavuje druhú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, ak testovaná chemikália nie je rozpustná v rozpúšťadle/nosiči s úplným rastovým médiom. Na účely tohto testovania sa testovaná chemikália rozpustí s konečnou koncentráciou 0,4 mg/ml v úplnom rastovom médiu, ak je chemikália rozpustná v tomto rozpúšťadle/nosiči. Ak je chemikália rozpustná len v DMSO, rozpustí sa s koncentráciou 50 mg/ml. Iné rozpúšťadlá/nosiče ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie. Zohľadňuje sa aj stabilita testovanej chemikálie v konečnom rozpúšťadle/nosiči.

14. Testované chemikálie a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. Keďže sa neuskutočňuje skúška na stanovenie dávky, v prvom testovacom cykle sa testuje 6 konečných koncentrácií (1, 10, 20, 50, 100 a 200 µg/ml) v príslušnom rozpúšťadle/nosiči, a to buď v úplnom rastovom médiu, alebo v 0,4 % DMSO v rastovom médiu. V nasledujúcich testovacích cykloch, pri ktorých sa začína s roztokmi testovanej chemikálie od koncentrácie 0,4 mg/ml v úplnom rastovom médiu alebo 50 mg/ml v DMSO, sa pripravia aspoň 4 pracovné roztoky (t. j. aspoň 4 koncentrácie) v príslušnom rozpúšťadle/nosiči. Pracovné roztoky sa nakoniec použijú na ošetrenie pridaním rovnakého objemu bunkovej suspenzie U937 (pozri odsek 11 vyššie) k objemu pracovného roztoku na mikrotitračnej platničke, aby sa dosiahlo ďalšie dvojnásobné riedenie (12). Koncentrácie (aspoň 4 koncentrácie) pre akýkoľvek ďalší testovací cyklus sa zvolia na základe jednotlivých výsledkov všetkých predchádzajúcich testovacích cyklov (8). Použiteľné konečné koncentrácie sú 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 a 200 µg/ml. Maximálna konečná koncentrácia je 200 µg/ml. V prípade, že sa pri CD86 pozoruje pozitívna hodnota pri koncentrácii 1 µg/ml, vyhodnotí sa koncentrácia 0,1 µg/ml s cieľom zistiť koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá nespôsobuje indukciu CD86 nad hranicou pozitívnej klasifikácie. Pri každom testovacom cykle sa vypočíta

hodnota EC150 (koncentrácia, pri ktorej sa pri chemikálii dosahuje hranica pozitívnej klasifikácie z hľadiska CD86 na úrovni 150 %, pozri odsek 19), ak sa pozoruje pozitívna reakcia v závislosti od koncentrácie v prípade CD86. V prípade, že testovaná chemikália vyvoláva pozitívnu reakciu CD86, ktorá nesúvisí s koncentráciou, výpočet hodnoty EC150 nemusí byť relevantný, ako sa opisuje v protokole DB-ALM č. 183 k testu U-SENS™ (12). Vždy, keď je to možné, sa pri každom testovacom cykle vypočíta hodnota CV70 (koncentrácia, pri ktorej sa pri chemikálii dosahuje hranica cytotoxicity na úrovni 70 %, pozri odsek 19) (12). S cieľom skúmať účinok zvýšenia CD86 z hľadiska závislosti od koncentrácie je potrebné zvoliť všetky koncentrácie spomedzi použiteľných koncentrácií tak, aby boli rovnomerne rozložené medzi hodnotou EC150 (alebo najvyššou negatívnou koncentráciou CD86, ktorá nie je cytotoxická) a hodnotou CV70 (alebo najvyššou povolenou koncentráciou, t. j. 200 μg/ml). V každom testovacom cykle sa majú testovať najmenej 4 koncentrácie, pričom na účely porovnania majú byť aspoň 2 koncentrácie spoločné s predchádzajúcimi testovacími cyklami.

15. V teste U-SENS™ sa ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom používa úplné rastové médium (v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú rozpustené alebo stabilne rozmiešané v úplnom rastovom médiu) (pozri odsek 4) alebo 0,4 % DMSO v úplnom rastovom médiu (v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných v DMSO).

16. Ako pozitívna kontrola sa v teste U-SENS™ používa TNBS (pozri odsek 11) pripravená v úplnom rastovom médiu. TNBS sa použije na platničke ako pozitívna kontrola pre meranie expresie CD86 v jednej konečnej koncentrácii (50 μg/ml), pri ktorej sa dosahuje životaschopnosť buniek > 70 %. Na získanie koncentrácie 50 μg/ml TNBS na platničke sa pripraví zásobný roztok s koncentráciou 1 M (t. j. 293 mg/ml) TNBS v úplnom rastovom médiu a ďalej sa 2 930-násobne zriedi s úplným rastovým médiom na pracovný roztok s koncentráciou 100 μg/ml. Ako negatívna kontrola sa použije kyselina mliečna (LA, CAS 50-21-5) s koncentráciou 200 μg/ml, ktorá je rozpustená v úplnom rastovom médiu (zo zásobného roztoku s koncentráciou 0,4 mg/ml). Na každej platničke každého testovacieho cyklu sa pripravia tri replikáty neošetrenej kontroly s úplným rastovým médiom, kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom, negatívnych a pozitívnych kontrol (12). Použiť možno iné vhodné pozitívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov. Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu sú rovnaké ako kritériá prijateľnosti opísané pre testovanú chemikáliu (pozri odsek 12).

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

17. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom alebo pracovné roztoky opísané v odsekoch 14 – 16 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (pozri odsek 12). Ošetrené platničky sa potom inkubujú 45 ±3 hod. pri teplote 37 °C a v atmosfére s obsahom 5 % CO_2. Pred inkubáciou sa mikrotitračné platničky uzatvoria polopriepustnou membránou, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii medzi jamkami ošetrenými testovanými chemikáliami (12).

Farbenie buniek

18. Po expozícii v trvaní 45 ±3 hod. sa bunky prenesú na mikrotitračnú platničku s kónickým dnom a vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie. Interferencia z hľadiska rozpustnosti sa prejavuje vytvorením kryštálov alebo kvapiek, ktoré možno pozorovať pod mikroskopom 45 ±3 hod. po ošetrení (pred zafarbením buniek). Supernatanty sa odstránia a zvyšné bunky sa jedenkrát premyjú pomocou 100 μl ľadového fosfátového tlmivého fyziologického roztoku (PBS) s obsahom 5 % fetálneho teľacieho séra (vyfarbovací tlmivý roztok). Po centrifugácii sa bunky resuspendujú pomocou 100 μl vyfarbovacieho tlmivého roztoku a zafarbia sa pomocou 5 μl (napr. 0,25 μg) anti-CD86 protilátok alebo myších protilátok (izotypu) IgG1 označených pomocou FITC pri teplote 4 °C počas 30 min, pričom sú chránené pred svetlom. Použijú sa protilátky opísané v protokole DB-ALM č. 183 (12) k testu U-SENS™ (pre CD86: BD-PharMingen č. 5556 57, klon: Fun-1 alebo Caltag/Invitrogen č. MHCD8601, klon: BU63; a pre IgG1: BD-PharMingen č. 5557 48 alebo Caltag/Invitrogen č. GM4992). Zo skúseností tvorcov testu vyplýva, že intenzita fluorescencie protilátok je medzi rôznymi šaržami zvyčajne jednotná. V skúške možno použiť aj iné klony alebo protilátky od iného dodávateľa, ktoré vyhoveli pri kontrole reaktivity (pozri odsek 11). Používatelia však môžu zvážiť titráciu protilátok v podmienkach vlastného laboratória s cieľom stanoviť najvhodnejšiu koncentráciu, ktorá sa má použiť. Iný systém detekcie, napr. anti-CD86 protilátky označené fluorochrómom, možno použiť, ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky konjugované s FITC, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Bunky sa premyjú dvakrát pomocou 100 μl vyfarbovacieho

tlmivého roztoku a jedenkrát pomocou 100 µl ľadového PBS a následne sa resuspendujú v ľadovom PBS (napr. 125 µl pri vzorkách, ktoré sa analyzujú manuálne po jednotlivých skúmavkách, alebo 50 µl pri použití platničky s automatickým dávkovačom) a pridá sa roztok PI (konečná koncentrácia 3 µg/ml). Možno použiť aj iné markery cytotoxicity, ako je 7-aminoaktinomycín D (7-AAD) alebo trypánová modrá, ak pri týchto alternatívnych farbivách možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako PI, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2.

Analýza pomocou prietokovej cytometrie

19. Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzuje úroveň expresie CD86, ako aj životaschopnosť buniek. Bunky sa zobrazujú v rámci bodového grafu veľkosti (FSC) a granulácie (SSC) v logaritmickej mierke, aby bolo možné zreteľne identifikovať populáciu v prvej ohraničenej oblasti (gate) R1 a eliminovať úlomky buniek. V každej jamke sa vyžaduje dosiahnutie celkového cieľového počtu 10 000 buniek v ohraničenej oblasti R1. Bunky z rovnakej ohraničenej oblasti (gate) R1 sa zobrazujú v bodovom grafe FL3 alebo FL4/SSC. Životaschopné bunky sa vymedzia označením druhej ohraničenej oblasti R2, pomocou ktorej sa vyberie populácia buniek bez prítomnosti propídium-jodidu (kanál FL3 alebo FL4). Životaschopnosť buniek možno vypočítať v analytickom programe cytometra pomocou rovnice uvedenej ďalej. V prípade nízkej životaschopnosti buniek je možné získať až 20 000 buniek vrátane mŕtvych buniek. Údaje možno prípadne získať počas jednej minúty po začatí analýzy.

$$Životaschopnosť\ buniek = \frac{Počet\ živých\ buniek}{Celkový\ počet\ získaných\ buniek} \times 100$$

Potom sa zmeria percentuálny podiel buniek pozitívnych z hľadiska FL1 spomedzi týchto životaschopných buniek nachádzajúcich sa v ohraničenej oblasti R2 (v rámci ohraničenej oblasti R1). Expresia CD86 na povrchu buniek sa analyzuje v bodovom grafe FL1/SSC obsahujúcom ohraničenú oblasť (oblasti) životaschopných buniek (R2).

V prípade jamiek s úplným rastovým médiom/IgG1 sa marker analýzy stanoví blízko hlavnej populácie, aby sa IgG1 v kontrolách s úplným rastovým médiom nachádzali v cieľovej zóne 0,6 až 0,9 %.

Farebná interferencia sa vymedzuje ako posun v bodovom grafe znázorňujúcom IgG1 označené pomocou FITC (hodnota SI geometrického priemeru IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Stimulačný index (SI) CD86 v prípade buniek v kontrolách (neošetrené alebo rozmiešané v 0,4 % DMSO) a buniek ošetrených chemikáliou sa vypočíta pomocou tejto rovnice:.

$$S.I. = \frac{\%\ ošetrených\ buniek 86^{+} - \%\ ošetrených\ buniek\ IgG1^{+}}{\%\ kontrolných\ buniek\ CD86^{+} - \%\ kontrolných\ buniek\ IgG1^{+}} \times 100$$

% neošetrených kontrolných buniek $IgG1^{+}$: označuje percentuálny podiel buniek IgG1 pozitívnych z hľadiska FL1, ktoré sú vymedzené spomedzi životaschopných neošetrených buniek pomocou markera analýzy (prijateľný rozsah ≥ 0,6 % a < 1,5 %, pozri odsek 22).

% kontrolných/ošetrených buniek $IgG1^{+}/CD86^{+}$: označuje percentuálny podiel buniek IgG1/CD86 pozitívnych z hľadiska FL1, ktoré sú vymedzené spomedzi životaschopných kontrolných/ošetrených buniek bez premiestnenia markera analýzy.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

20. V teste U-SENS™ sa vypočítajú tieto parametre: hodnota CV70, t. j. koncentrácia, pri ktorej sa prejavuje 70 % prežitie buniek U937 (30 % cytotoxicita), a hodnota EC150, t. j. koncentrácia, pri ktorej testované chemikálie vyvolali stimulačný index (SI) pre CD86 na úrovni 150 %.

Hodnota CV70 sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie na základe tejto rovnice:

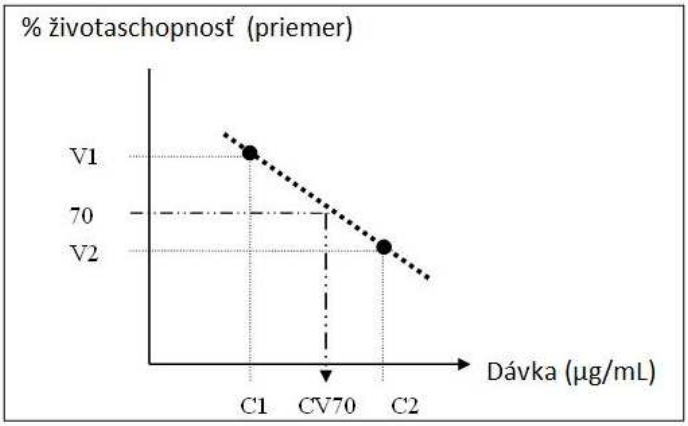
$CV70 = C1 + [(V1 - 70)/(V1 - V2) \times (C2 - C1)]$

Keď:

V1 je minimálna hodnota životaschopnosti buniek nad 70 %,

V2 je maximálna hodnota životaschopnosti buniek pod 70 %,

C1 a C2 sú koncentrácie, pri ktorých sa prejavuje hodnota životaschopnosti buniek V1, resp. V2.



Na odvodenie hodnoty CV70 možno použiť aj iné prístupy, pokiaľ sa preukáže, že to nemá vplyv na výsledky (napr. pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti).

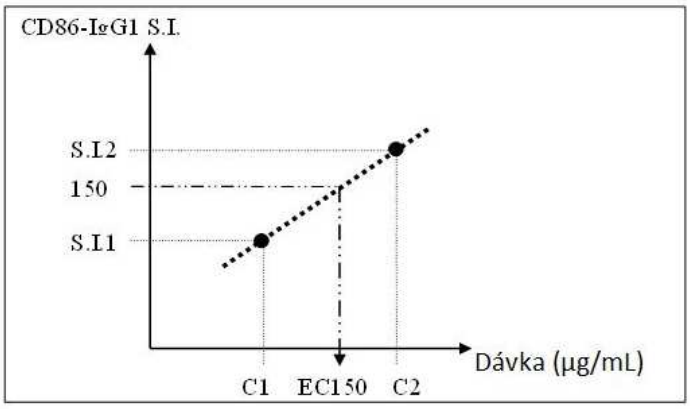
Hodnota EC150 sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie na základe tejto rovnice:

$EC150 = C1 + [(150 - SI\ 1)/(SI\ 2 - SI\ 1) \times (C2 - C1)]$

Keď:

C1 je najvyššia koncentrácia v µg/ml s hodnotou SI pre CD86 < 150 % (SI 1),

C2 je najnižšia koncentrácia v µg/ml s hodnotou SI pre CD86 ≥ 150 % (SI 2).



Hodnoty EC150 a CV70 sa vypočítajú

— pre každý testovací cyklus: jednotlivé hodnoty EC150 a CV70 slúžia ako nástroje na skúmanie účinku zvýšenia CD86 v závislosti od koncentrácie (pozri odsek 14),

— na základe priemerných hodnôt životaschopnosti; stanoví sa celková hodnota CV70 (12),

— na základe priemeru SI hodnôt CD86; stanoví sa celková hodnota EC150 pre testovanú chemikáliu, ktorá sa na základe prognózy v teste U-SENS™ považuje za POZITÍVNU (pozri odsek 21) (12).

Prognostický model

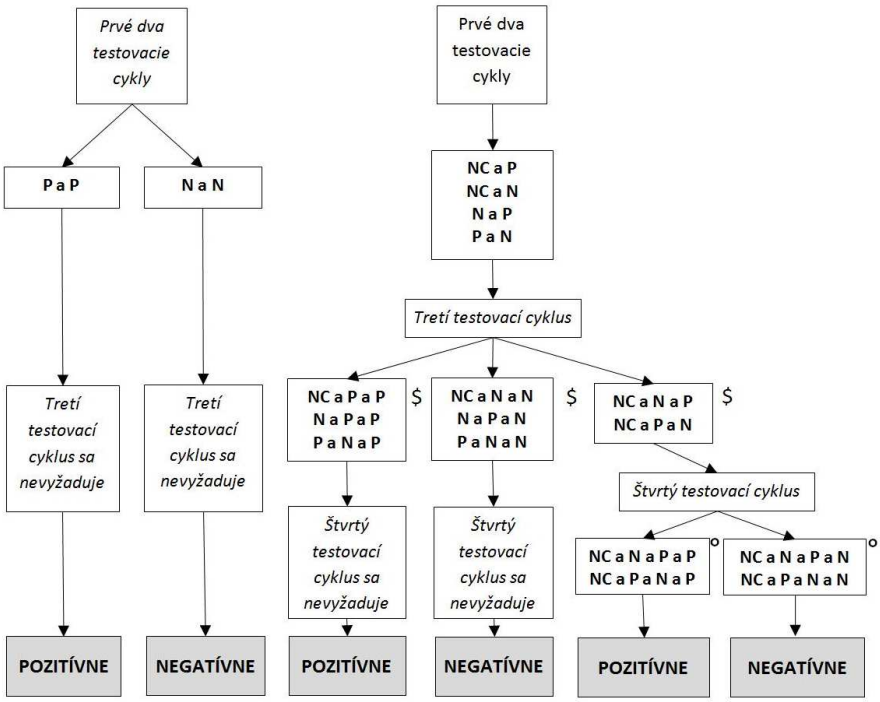
21. Na účely merania expresie CD86 sa každá testovaná chemikália testuje najmenej v štyroch koncentráciách a najmenej v dvoch nezávislých testovacích cykloch (uskutočnených v rôznych dňoch), aby sa odvodila jedna prognóza (NEGATÍVNA alebo POZITÍVNA).

— Jednotlivý záver testovacieho cyklu U-SENS™ sa považuje za negatívny (ďalej len „N“), ak je SI pre CD86 nižší ako 150 % pri všetkých necytotoxických koncentráciách (životaschopnosť buniek ≥ 70 %) a ak sa nepozoruje žiadna interferencia (cytotoxicita, rozpustnosť: pozri odsek 18 alebo farba: pozri odsek 19 bez ohľadu na necytotoxické koncentrácie, pri ktorých sa zistí interferencia). Vo všetkých ostatných prípadoch: ak je SI pre CD86 vyšší než alebo sa rovná 150 % a/alebo ak sa pozorujú interferencie, jednotlivý záver testovacieho cyklu U-SENS™ sa považuje za pozitívny (ďalej len „P“).

— Prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za NEGATÍVNU, ak sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly negatívne (N) (obrázok 1). Ak sú oba prvé testovacie cykly negatívne (N), prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za NEGATÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť.

— Prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za POZITÍVNU, ak sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly pozitívne (P) (obrázok 1). Ak sú oba prvé testovacie cykly pozitívne (P), prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za POZITÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť.

— Keďže sa neuskutočňuje skúška na stanovenie dávky, existuje výnimka v prípade, že v prvom testovacom cykle je SI pre CD86 vyšší než alebo sa rovná 150 % len pri najvyššej necytotoxickej koncentrácii. Testovací cyklus sa v takom prípade považuje za NEJEDNOZNAČNÝ (NC) a v dodatočných testovacích cykloch je potrebné testovať ďalšie koncentrácie (v rozsahu od najvyššej necytotoxickej koncentrácie po najnižšiu cytotoxickú koncentráciu – pozri odsek 20). V prípade, že je testovací cyklus identifikovaný ako NC, je potrebné vykonať najmenej dva dodatočné testovacie cykly, ako aj štvrtý testovací cyklus v prípade, že výsledky testovacích cyklov 2 a 3 nie sú zhodné (nezávisle N a/alebo P) (obrázok 1). Nasledujúce testovacie cykly sa budú považovať za pozitívne, aj keď sa len pri jednej necytotoxickej koncentrácii dosiahne hodnota CD86 rovnaká alebo vyššia ako 150 %, keďže sa nastavenie koncentrácie upravilo podľa konkrétnej testovanej chemikálie. Pri konečnej prognóze sa bude vychádzať z väčšinového výsledku troch alebo štyroch individuálnych testovacích cyklov (t. j. 2 z 3 alebo 2 zo 4) (obrázok 1).



Obrázok 1: Prognostický model použitý v teste U-SENS™ Prognóza v teste U-SENS™ by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 4, 7, 8 a 9 všeobecného úvodu.

N: testovací cyklus bez pozorovania pozitívnej hodnoty CD86 alebo interferencie,

P: testovací cyklus s pozorovanou pozitívnou hodnotou CD86 a/alebo interferenciou,

NC: nejednoznačné. Prvý testovací cyklus s nejednoznačným výsledkom, keď je CD86 pozitívne len pri najvyššej necytotoxickej koncentrácii,

#: Nejednoznačný (NC) individuálny záver dosiahnutý len pri prvom testovacom cykle automaticky znamená potrebu tretieho testovacieho cyklu, aby sa dosiahla väčšina pozitívnych (P) alebo negatívnych (N) záverov aspoň v 2 z 3 nezávislých testovacích cyklov.

$: V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z troch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých dvoch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku.

°: V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov zo štyroch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých troch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku.

Kritériá prijateľnosti

22. Pri použití testu U-SENS™ majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti (12).

— Na konci obdobia expozície v trvaní 45 ±3 hod. dosiahla priemerná životaschopnosť neošetrených buniek U937 testovaných trojmo hodnotu > 90 % a nepozoroval sa posun v expresii CD86. Bazálna expresia CD86 neošetrených buniek U937 bola v rozsahu ≥ 2 % a ≤ 25 %.

— Keď sa ako rozpúšťadlo používa DMSO, platnosť kontroly s nosičom DMSO sa posudzuje vypočítaním SI pre DMSO v porovnaní s neošetrenými bunkami, pričom priemerná životaschopnosť buniek testovaných trojmo musela byť > 90 %. Kontrola s nosičom DMSO je platná, ak stredná hodnota trojmo vypočítaného SI pre CD86 bola nižšia než 250 % strednej hodnoty trojmo vypočítaného SI pre CD86 v prípade neošetrených buniek U937.

— Testovacie cykly sa považujú za platné, ak aspoň dve z troch hodnôt IgG1 neošetrených buniek U937 patria do rozsahu ≥ 0,6 % a < 1,5 %.

— Súbežne testovaná negatívna kontrola (kyselina mliečna) sa považuje za platnú, ak aspoň dva z troch replikátov boli negatívne (SI pre CD86 < 150 %) a necytotoxické (životaschopnosť buniek ≥ 70 %).

— Pozitívna kontrola (TNBS) sa považuje za platnú, ak aspoň dva z troch replikátov boli pozitívne (SI pre CD86 ≥ 150 %) a necytotoxické (životaschopnosť buniek ≥ 70 %).

Správa o teste

23. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť v úplnom rastovom médiu, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť v úplnom rastovom médiu, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Kontroly

Pozitívna kontrola

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Negatívna kontrola a kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné kontrolné rozpúšťadlá/nosiče ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitého testu,

— použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),

— použitá prietoková cytometria (napr. model) vrátane použitých nastavení prístroja, protilátok a markera cytotoxicity,

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti a postup použitý na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času, napr. údaje o historických kontrolách a/alebo údaje o historických kontrolách reaktivity.

Kritériá prijateľnosti testu

— hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty SI pre CD86 získané pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty SI získané pomocou pozitívnej kontroly v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— životaschopnosť buniek pri všetkých testovaných koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací postup

— počet použitých testovacích cyklov,

— použité koncentrácie testovaných chemikálií, ich použitie a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),

— dĺžka expozície,

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

— údaje v tabuľkovej podobe vrátane CV70 (v uplatniteľnom prípade), SI, hodnôt životaschopnosti buniek, hodnôt EC150 (v uplatniteľnom prípade) získaných pri testovanej chemikálii a pri pozitívnej kontrole v každom testovacom cykle, ako aj uvedenie hodnotenia testovanej chemikálie podľa prognostického modelu,

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— rozbor výsledkov získaných pomocou testu U-SENS™,

— posúdenie výsledkov testu v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Závery

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na lokalite: 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 10.2760/588955. K dispozícii na lokalite: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. K dispozícii na lokalite: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: [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, 1683 – 1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), s. 33. K dispozícii na lokalite: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565 – 577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. K dispozícii na lokalite: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. K dispozícii na lokalite: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Dodatok 2.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (14).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (15).

Reakcia v závislosti od koncentrácie CD86: označuje závislosť od koncentrácie (alebo reakciu v závislosti od koncentrácie), keď za pozitívnou koncentráciou (CD86 SI ≥ 150) nasleduje koncentrácia s rastúcou hodnotou CD86 SI.

Chemikália: látka alebo zmes.

CV70: odhadovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje 70 % životaschopnosť buniek.

Posun: posun je vymedzený tým, že i) korigovaná hodnota %$CD86^+$ replikátu 3 neošetrenej kontroly je nižšia ako 50 % strednej korigovanej hodnoty %$CD86^+$ replikátov 1 a 2 neošetrenej kontroly a ii) korigovaná hodnota %$CD86^+$ replikátu 3 negatívnej kontroly je nižšia ako 50 % strednej korigovanej hodnoty %$CD86^+$ replikátov 1 a 2 negatívnej kontroly.

EC150: odhadované koncentrácie, pri ktorých sa vykazuje 150 % SI expresie CD86.

Prietoková cytometria: cytometrická technika, pri ktorej bunky rozmiešané v kvapaline prechádzajú jednotlivo cez ohnisko excitovaného svetla, ktoré je rozptýlené podľa vzorov charakteristických pre bunky a ich zložky. Bunky sa často označujú pomocou fluorescenčných markerov, vďaka čomu sa svetlo najskôr absorbuje a následne emituje v zmenených frekvenciách.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie, napr. oxidácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (14).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (14).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (14).

SI: stimulačný index. Relatívne hodnoty geometrického priemeru intenzity fluorescencie v bunkách ošetrených chemikáliou v porovnaní s bunkami ošetrenými rozpúšťadlom.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (14).

Vyfarbovací tlmivý roztok: fosfátový tlmivý fyziologický roztok obsahujúci 5 % fetálneho teľacieho séra.

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tohto testu.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (16).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platný test: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (14).

Dodatok 2.2

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Pred rutinným použitím testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky U-SENS™ v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty CV70 a EC150, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou testu U-SENS™. Pre test U-SENS™ sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (1) (8).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri teste U-SENS™

Látky na preukázanie spôsobilosti	Registračné číslo CAS	Skupenstvo	Prognóza *in vivo* (1)	U-SENS™ Rozpúšťadlo/ nosič	U-SENS™ Referenčný rozsah CV70 v µg/ml (2)	U-SENS™ Referenčný rozsah EC150 v µg/ml (2)
4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhé	senzibilizátor (silný)	úplné rastové médium (3)	< 30	pozitívne (≤ 10)
kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová trihydrát	2508-19-2	kvapalné	senzibilizátor (silný)	úplné rastové médium	> 50	pozitívne (≤ 50)
dietylmaleát	141-05-9	kvapalné	senzibilizátor (mierny)	DMSO	10 – 100	pozitívne (≤ 20)
rezorcinol	108-46-3	tuhé	senzibilizátor (mierny)	úplné rastové médium	> 100	pozitívne (≤ 50)
škoricový alkohol	104-54-1	tuhé	senzibilizátor (slabý)	DMSO	> 100	pozitívne (10 – 100)
4-alylanizol	140-67-0	kvapalné	senzibilizátor (slabý)	DMSO	> 100	pozitívne (< 200)
sacharín	81-07-2	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	DMSO	> 200	negatívne (> 200)
glycerol	56-81-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	úplné rastové médium	> 200	negatívne (> 200)
kyselina mliečna	50-21-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	úplné rastové médium	> 200	negatívne (> 200)
kyselina salicylová	69-72-7	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	DMSO	> 200	negatívne (> 200)

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Prognóza nebezpečnosti a (potencie) *in vivo* na základe údajov LLNA (1) (8). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (17).

(2) Na základe historických pozorovaných hodnôt (1) (8).

(3) Úplné rastové médium: rastové médium RPMI-1640 doplnené o 10 % fetálne teľacie sérum, L-glutamín s koncentráciou 2 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu (8).

Dodatok 3

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: SKÚŠKA IL-8 LUC

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. Na rozdiel od skúšok, v rámci ktorých sa analyzuje expresia povrchových bunkových markerov, sa v skúške IL-8 Luc kvantifikujú zmeny expresie IL-8, čo je cytokín súvisiaci s aktiváciou dendritových buniek (DC). V reportérovej bunkovej línii IL-8 odvodenej od THP-1 (THP-G8, stanovená z bunkovej línie THP-1 akútnej ľudskej monocytovej leukémie) sa expresia IL-8 meria po expozícii senzibilizátorom (1). Expresia luciferázy následne slúži ako pomôcka pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.

2. Skúška IL-8 Luc sa hodnotila v rámci validačnej štúdie (2) uskutočnenej organizáciou JaCVAM (Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods), **ministerstvom hospodárstva, obchodu a priemyslu** (METI) a organizáciou (**JSAAE Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments**) a následne bola predmetom nezávislého partnerského preskúmania (3) pod záštitou organizácie JaCVAM a ministerstva zdravotníctva, práce a sociálneho zabezpečenia (MHLW) s podporou **medzinárodnej spolupráce v oblasti alternatívnych testovacích metód** (ICATM). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán sa skúška IL-8 Luc považuje za užitočnú pri rozlišovaní medzi senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA) na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov zo skúšky IL-8 Luc v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (4) (5) (6).

3. Preukázalo sa, že skúška IL-8 Luc je prenosná do laboratórií, ktoré majú skúsenosti v oblasti bunkových kultúr a meraní luciferázy. Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť bola 87,7 % a reprodukovateľnosť medzi laboratóriami bola 87,5 % (2). Z údajov získaných v rámci validačnej štúdie (2) a iných publikovaných prác (1) (6) vyplýva, že v porovnaní so skúškou LLNA sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 118 zo 143 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 25 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky IL-8 Luc z hľadiska odlíšenia kožných senzibilizátorov (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP) je 86 % (101/118) s citlivosťou 96 % (92/96) a špecifickosťou 41 % (9/22). Pri vylúčení látok nepatriacich do oblasti použiteľnosti opísanej ďalej (odsek 5) sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 113 zo 136 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 23 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky IL-8 Luc je 89 % (101/113) s citlivosťou 96 % (92/96) a špecifickosťou 53 % (9/17). Na základe údajov o ľuďoch, ako ich uvádza Urbisch a kol. (7), sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 76 z 90 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 14 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky je 80 % (61/76), citlivosť 93 % (54/58) a špecifickosť 39 % (7/18). Pri vylúčení látok nepatriacich do oblasti použiteľnosti sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 71 z 84 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 13 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť je 86 % (61/71) s citlivosťou 93 % (54/58) a špecifickosťou 54 % (7/13). V prípade skúšky IL-8 Luc je výskyt falošne negatívnych prognóz pravdepodobnejší pri chemikáliách s nízkou/miernou potenciou z hľadiska kožnej senzibilizácie (podkategória 1B podľa GHS OSN/CLP) než pri chemikáliách s vysokou potenciou (podkategória 1A podľa GHS OSN/CLP) (6). Celkovo je z týchto informácií zrejmý význam skúšky IL-8 Luc pri identifikácii nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Presnosť, ktorá sa uvádza v prípade skúšky IL-8 Luc ako samostatného testu, slúži len ako usmernenie, keďže tento test by sa mal posudzovať v spojení s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení testov na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo pamätať na to, že test LLNA a iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa ukázalo, že skúšku IL-8 Luc je možné použiť v prípade testovaných chemikálií zahŕňajúcich viacero organických funkčných skupín, reakčných mechanizmov, potencií kožnej senzibilizácie (stanovených štúdiami *in vivo*) a fyzikálno-chemických vlastností (2) (6).

5. Hoci sa pri skúške IL-8 Luc používa ako rozpúšťadlo X-VIVO™ 15, správne sa pomocou nej vyhodnotili chemikálie s hodnotou Log K_{ow} > 3,5 a chemikálie s rozpustnosťou vo vode pri koncentrácii približne 100 µg/ml podľa výpočtu v softvéri EPI Suite™ a výkonnosť tejto skúšky pri detekcii senzibilizátorov so slabou rozpustnosťou vo vode je lepšia, než keď sa pri skúške IL-8 Luc použije ako rozpúšťadlo dimetylsulfoxid (DMSO) (2). V prípade negatívnych výsledkov pre testované chemikálie, ktoré nie sú rozpustné pri koncentrácii 20 mg/ml, však môže dochádzať k falošne negatívnym výsledkom v dôsledku ich nerozpustnosti v rozpúšťadle X-VIVO™ 15. Negatívne výsledky pre tieto chemikálie sa preto nemajú brať do úvahy. Vo validačnej štúdii sa zistila vysoká miera falošnej negativity v prípade anhydridov. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity bunkovej línie (8) a experimentálnych podmienok vykazovať v rámci skúšky negatívne výsledky aj pro-haptény (látky vyžadujúce metabolickú aktiváciu) a pre-haptény (látky aktivované atmosférickou oxidáciou). Napriek tomu, hoci negatívne výsledky získané pri predpokladaných pre-hapténoch/pro-hapténoch je potrebné interpretovať obozretne, sa pomocou skúšky IL-8 Luc správne vyhodnotilo 11 z 11 pre-hapténov, 6 zo 6 pro-hapténov a 6 z 8 pre-hapténov/pro-hapténov v rámci množiny údajov skúšky IL-8 Luc (2). Na základe súčasného komplexného preskúmania troch testov, pri ktorých sa nevyužívajú zvieratá, (DPRA, KeratinoSens™ a h-CLAT) na detekciu pre-hapténov a pro-hapténov (9) a na základe skutočnosti, že bunky THP-G8 použité v skúške IL-8 Luc predstavujú bunkovú líniu odvodenú od THP-1, ktorá sa používa v teste h-CLAT, skúška IL-8 Luc môže prispieť aj k zvýšeniu citlivosti testov, pri ktorých sa nevyužívajú zvieratá, na detekciu pre-hapténov a pro-hapténov v kombinácii s inými testmi. V prípade doteraz testovaných povrchovo aktívnych látok sa bez ohľadu na ich typ (napr. katiónové, aniónové alebo neiónové) zaznamenali (falošne) pozitívne výsledky. A nakoniec, chemikálie, pri ktorých dochádza k interferencii s luciferázou, môžu zneprehľadniť jej aktivitu/meranie, čím dochádza k zdanlivej inhibícii alebo k zvýšenej luminiscencii (10). V iných skúškach s reportérovými génmi luciferázy boli napríklad zaznamenané interferencie fytoestrogénu v koncentráciách nad 1 µM s luminiscenčnými signálmi z dôvodu nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy. Preto je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch (11). Na základe toho sú z oblasti použiteľnosti tejto skúšky vylúčené povrchovo aktívne látky, anhydridy a chemikálie, pri ktorých dochádza k interferencii s luciferázou. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti skúšky IL-8 Luc na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa tento test nemal pri týchto špecifických kategóriách použiť.

6. Ako bolo opísané vyššie, skúška IL-8 Luc umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Na to, aby bolo možné určiť, či výsledky skúšky IL-8 Luc môžu v kombinácii s ďalšími zdrojmi informácií prispieť k posudzovaniu potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.

7. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 3.1.

PRINCÍP TESTU

8. V skúške IL-8 Luc sa využíva bunková línia THP-1 ľudskej monocytovej leukémie, ktorá pochádza z organizácie ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia, USA). Pomocou tejto bunkovej línie vytvorila katedra dermatológie na lekárskej fakulte univerzity v Tohoku reportérovú bunkovú líniu IL-8 odvodenú od THP-1 s označením THP-G8, v ktorej sa nachádza gén luciferázy SLO (stabilná luciferáza emitujúca oranžové svetlo) riadený promótorom IL-8 a gén luciferázy SLR (stabilná luciferáza emitujúca červené svetlo) riadený promótorom glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) (1). Je tak možné kvantitatívne meranie indukcie génu luciferázy pomocou detekcie luminiscencie z osvedčených substrátov luciferázy, ktoré vytvárajú svetlo a slúžia ako indikátor pôsobenia IL-8 a GAPDH v bunkách po expozícii chemikáliám spôsobujúcim senzibilizáciu.

9. Dvojfarebný skúšobný systém obsahuje luciferázu emitujúcu oranžové svetlo (SLO; λmax = 580 nm) (12) pre génovú expresiu promótora IL-8, ako aj luciferázu emitujúcu červené svetlo (SLR; λmax = 630 nm) (13) pre génovú expresiu promótora vnútornej kontroly, GAPDH. Tieto dva druhy luciferázy emitujú svetlo odlišnej farby pri reakcii s d-luciferínom svetlušky svätojánskej a ich luminiscencia sa meria súčasne v rámci jednokrokovej reakcie rozkladom emisie zo skúšobnej zmesi pomocou optického filtra (14) (dodatok 3.2).

10. Bunky THP-G8 sa 16 hodín ošetrujú pomocou testovanej chemikálie. Potom sa zmeria aktivita luciferázy SLO (SLO-LA) odrážajúca pôsobenie promótora IL-8 a aktivita luciferázy SLR (SLR-LA) odrážajúca pôsobenie promótora GAPDH. SLO-LA sa označuje ako IL8LA a SLR-LA ako GAPLA, aby boli skratky jednoducho zrozumiteľné. V tabuľke 1 sa uvádza opis výrazov súvisiacich s aktivitou luciferázy v skúške IL-8 Luc. Namerané hodnoty slúžia na výpočet normalizovanej hodnoty IL8LA (nIL8LA), ktorá predstavuje pomer IL8LA ku GAPLA, na výpočet indukcie nIL8LA (Ind-IL8LA), ktorá predstavuje pomer aritmetických priemerov štvornásobne nameraných hodnôt nIL8LA buniek THP-G8 ošetrených testovanou chemikáliou a hodnôt nIL8LA neošetrených buniek THP-G8, a na výpočet inhibície GAPLA (Inh-GAPLA), ktorá predstavuje pomer aritmetických priemerov štvornásobne nameraných hodnôt GAPLA buniek THP-G8 ošetrených testovanou chemikáliou a hodnôt GAPLA neošetrených buniek THP-G8 a slúži ako indikátor cytotoxicity.

Tabuľka 1

Opis výrazov súvisiacich s aktivitou luciferázy v skúške IL-8 Luc

Skratky	Vymedzenie pojmu
GAPLA	aktivita luciferázy SLR odrážajúca pôsobenie promótora GAPDH
IL8LA	aktivita luciferázy SLO odrážajúca pôsobenie promótora IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami/nIL8LA neošetrených buniek
Inh-GAPLA	GAPLA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami/GAPLA neošetrených buniek
CV05	Najnižšia koncentrácia chemikálie, pri ktorej sa hodnota Inh-GAPLA stáva < 0,05.

11. K dispozícii sú normy výkonnosti (PS) (15) na uľahčenie validácie upravených testov *in vitro* luciferázy IL-8, ktoré sú podobné skúške IL-8 Luc, a umožnenie včasnej zmeny usmernenia OECD 442E na vykonávanie testov na účely začlenenia týchto testov. Vzájomné uznávanie údajov (MAD) podľa dohody OECD bude možné garantovať len pri testoch validovaných podľa týchto noriem výkonnosti v prípade, že OECD tieto testy preskúmala a začlenila do usmernenia 442E na vykonávanie testov (16).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

12. Pred rutinným používaním testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 3.3 v súlade so správnymi postupmi metód *in vitro* (17). Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 15) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 21 – 24) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

13. Ku skúške IL-8 Luc sú k dispozícii štandardné operačné postupy, ktoré sa majú používať pri vykonávaní tohto testu (18). Laboratóriá, ktoré majú v úmysle vykonávať test, môžu získať rekombinantnú bunkovú líniu THP-G8 z

laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko, po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA) v súlade s podmienkami šablóny OECD. V nasledujúcich odsekoch sú opísané hlavné zložky a postupy skúšky.

Príprava buniek

14. Na vykonávanie skúšky IL-8 Luc sa používa bunková línia THP-G8 z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko (pozri odseky 8 a 13). Po prijatí sa bunky namnožia (2 až 4 pasáže) a skladujú sa zmrazené ako homogénna zásoba. Bunky z tejto zásoby možno rozmnožovať až po maximálny počet 12 pasáží alebo maximálne počas 6 týždňov. Rastové médium, ktoré sa používa na rozmnožovanie, je kultivačné médium RPMI-1640, ktoré obsahuje 10 % bovinné fetálne sérum (FBS), roztok antibiotík/antimykotík (100 jednotiek/ml penicilínu G, 100 µg/ml streptomycínu a 0,25 µg/ml amfotericínu B v 0,85 % fyziologickom roztoku) (napr. GIBCO kat. č. 15240-062), 0,15 µg/ml puromycínu (napr. CAS: 58-58-2) a 300 µg/ml G418 (napr. CAS: 108321-42-2).

15. Pred použitím na testovanie sa bunky kvalifikujú uskutočnením kontroly reaktivity. Túto kontrolu je potrebné uskutočniť 1 – 2 týždne alebo 2 – 4 pasáže po rozmrazení pomocou 4-nitrobenzyl bromidu (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistota ≥ 99 %) ako pozitívnej kontroly a pomocou kyseliny mliečnej (LA) (CAS: 50-21-5, čistota ≥ 85 %) ako negatívnej kontroly. 4-NBB má vyvolať pozitívnu reakciu na Ind-IL8LA (≥ 1,4), zatiaľ čo LA má vyvolať negatívnu reakciu na Ind-IL8LA (< 1,4). V rámci skúšky sa použijú len bunky, ktoré vyhovejú pri kontrole reaktivity. Táto kontrola sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 22 – 24.

16. Na účely testovania sa bunky THP-G8 nasadia s hustotou 2 až 5 × 10^5 buniek/ml a 48 až 96 hodín sa kultivujú ako predkultúra v kultivačných bankách. V deň testu sa bunky zozbierané z kultivačných baniek premyjú pomocou RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS bez antibiotík a následne sa resuspendujú pomocou RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS bez antibiotík s koncentráciou 1 × 10^6 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 96-jamkovú čiernu mikrotitračnú platničku s plochým dnom (napr. Costar kat. č. 3603) s objemom 50 µl (5 × 10^4 buniek/jamka).

Príprava testovanej chemikálie a kontrolných látok

17. Testovaná chemikália a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade skúšky IL-8 Luc sa testované chemikálie rozpustia v komerčne dostupnom rastovom médiu X-VIVO™ 15 bez obsahu séra (Lonza, 04-418Q) tak, aby sa dosiahla konečná koncentrácia 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 sa pridá k 20 mg testovanej chemikálie (bez ohľadu na rozpustnosť chemikálie) v skúmavke mikroodstredivky, aby sa dosiahol objem 1 ml, a následne sa intenzívne premiešava a pretrepáva na rotátore s maximálnou rýchlosťou 8 ot./min. počas 30 minút pri teplote okolia približne 20 °C. Ak sú tuhé chemikálie naďalej nerozpustné, skúmavka sa ďalej previbruje ultrazvukom, až kým sa chemikália úplne nerozpustí alebo stabilne nerozmieša. V prípade testovaných chemikálií rozpustných v X-VIVO™ 15 sa roztok rozriedi faktorom 5 pomocou X-VIVO™ 15 a slúži ako zásobný roztok X-VIVO™ 15 s testovanou chemikáliou (4 mg/ml). V prípade testovaných chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa zmes znova pretrepáva na rotátore najmenej 30 minút a potom sa 5 minút odstreďuje pri 15000 ot./min. (≈ 20 000 *g*). Výsledný supernatant slúži ako zásobný roztok X-VIVO™ 15 s testovanou chemikáliou. Použitie iných rozpúšťadiel, napríklad DMSO, vody alebo rastového média, je potrebné vedecky odôvodniť. Podrobný postup rozpustenia chemikálií sa uvádza v dodatku 3.5. Roztoky X-VIVO™ 15 opísané v odsekoch 18 – 23 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými v 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (pozri odsek 16).

18. Účelom prvého testovacieho cyklu je stanoviť cytotoxickú koncentráciu a preskúmať potenciál kožnej senzibilizácie chemikálií. Pomocou X-VIVO™ 15 sa vytvoria sériové riedenia zásobných roztokov X-VIVO™ 15 s testovanými chemikáliami s faktorom riedenia 2 (pozri dodatok 3.5) pomocou 96-jamkového skúšobného bloku (napr. Costar kat. č. EW-01729-03). Ďalej sa rozriedený roztok v objeme 50 µl/jamka pridá do 50 µl bunkovej suspenzie v 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničke s plochým dnom. V prípade testovaných chemikálií rozpustných v X-VIVO™ 15 tak budú konečné koncentrácie testovaných chemikálií v rozsahu od 0,002 do 2 mg/ml (dodatok 3.5). V prípade testovaných chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml sa stanovia len faktory riedenia v rozsahu 2 až 2^{10}, hoci skutočné konečné koncentrácie testovaných chemikálií zostávajú neisté a závisia od nasýtenej koncentrácie testovaných chemikálií v zásobnom roztoku X-VIVO™ 15.

19. V následných testovacích cykloch (t. j. druhý, tretí a štvrtý replikát) sa zásobný roztok X-VIVO™ 15 pripraví s koncentráciou, ktorá je štvornásobne vyššia ako koncentrácia pri životaschopnosti buniek 05 (CV05; najnižšia koncentrácia, pri ktorej je hodnota Inh-GAPLA < 0,05) v prvom pokuse. Ak Inh-GAPLA neklesne pod 0,05 pri najvyššej koncentrácii v prvom testovacom cykle, zásobný roztok X-VIVO™ 15 sa pripraví s najvyššou koncentráciou prvého testovacieho cyklu. Koncentrácia CV05 sa vypočíta ako podiel koncentrácie zásobného roztoku v prvom testovacom cykle a faktora riedenia pre CV05 (X) [faktor riedenia CV05 (X); faktor riedenia, ktorý sa požaduje na zriedenie zásobného roztoku na CV05] (pozri dodatok 3.5). V prípade testovaných látok nerozpustných v X-VIVO pri koncentrácii 20 mg/ml sa hodnota CV05 určí ako koncentrácia zásobného roztoku × 1/X. Pri testovacích cykloch 2 až 4 sa druhý zásobný roztok pripraví ako 4 × CV05 (dodatok 3.5).

20. Sériové riedenia druhých zásobných roztokov X-VIVO™ 15 sa vytvoria s faktorom riedenia 1,5 pomocou 96-jamkového skúšobného bloku. Ďalej sa rozriedený roztok v objeme 50 µl/jamka pridá do 50 µl bunkovej suspenzie v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom. Každá koncentrácia jednotlivých testovaných chemikálií sa testuje v 4 jamkách. Vzorky sa potom premiešajú na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubujú sa 16 hodín pri teplote 37 °C a pri 5 % CO_2. Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu uvedeného ďalej.

21. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla je zmes X-VIVO™ 15 v objeme 50 µl/jamka a bunkovej suspenzie v RPMI-1 640 s obsahom 10 % FBS v objeme 50 µl/jamka.

22. Odporúčaná pozitívna kontrola je 4-NBB. Pripraví sa 20 mg 4-NBB v skúmavke mikroodstredivky s objemom 1,5 ml, do ktorej sa pridá X-VIVO™ 15 do objemu 1 ml. Skúmavka sa intenzívne premiešava a pretrepáva na rotátore maximálnou rýchlosťou 8 ot./min. najmenej 30 minút. Po centrifugácii pri 20 000 g počas 5 minút sa supernatant zriedi faktorom 4 s X-VIVO™ 15 a 500 µl zriedeného supernatantu sa prenesie do jamky na 96-jamkovom skúšobnom bloku. Zriedený supernatant sa ďalej riedi s X-VIVO™ 15 faktormi 2 a 4 a 50 µl tohto roztoku sa pridá do 50 µl bunkovej suspenzie THP-G8 v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom (dodatok 3.6). Každá koncentrácia pozitívnej kontroly sa testuje v 4 jamkách. Platnička sa premieša na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubuje sa 16 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (37 °C, 5 % CO_2). Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu v odseku 29.

23. Odporúčaná negatívna kontrola je LA. Pripraví sa 20 mg LA v skúmavke mikroodstredivky s objemom 1,5 ml, do ktorej sa pridá X-VIVO™ 15 do objemu 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml roztoku LA sa zriedi faktorom 5 s X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tohto roztoku LA s koncentráciou 4 mg/ml sa prenesie do jamky na 96-jamkovom skúšobnom bloku. Tento roztok sa zriedi faktorom 2 s X-VIVO™ 15 a potom sa znova zriedi faktorom 2, aby vznikli roztoky s koncentráciou 2 mg/ml a 1 mg/ml. 50 µl týchto 3 roztokov a kontroly s nosičom (X-VIVO™ 15) sa pridá do 50 µl bunkovej suspenzie THP-G8 v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom. Každá koncentrácia negatívnej kontroly sa testuje v 4 jamkách. Platnička sa premieša na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubuje sa 16 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (37 °C, 5 % CO_2). Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu v odseku 29.

24. Použiť možno iné vhodné pozitívne alebo negatívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov.

25. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii testovanými chemikáliami medzi jamkami, napr. hermetickým uzatvorením mikrotitračnej platničky pred inkubáciou s testovanými chemikáliami.

26. V prípade testovaných chemikálií a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa vyžadujú 2 až 4 testovacie cykly na odvodenie pozitívnej alebo negatívnej prognózy (pozri tabuľku 2). Každý testovací cyklus sa vykoná v iný deň s čerstvým zásobným roztokom X-VIVO™ 15 s testovanými chemikáliami a s nezávisle odobratými bunkami. Bunky môžu pochádzať z rovnakej pasáže.

Merania aktivity luciferázy

27. Luminiscencia sa meria pomocou luminometra pre 96-jamkovú mikrotitračnú platničku, ktorý je vybavený optickými filtrami, napr. radu Phelios (ATTO, Tokio, Japonsko), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Nemecko) a ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Luminometer je potrebné pre každý test kalibrovať, aby sa zabezpečila reprodukovateľnosť (19). Na účely tejto kalibrácie sú k dispozícii rekombinantné luciferázy emitujúce oranžové a červené svetlo.

28. Do jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá obsahuje bunkovú suspenziu ošetrenú alebo neošetrenú chemikáliou, sa prenesie 100 µl zahriateho reagentu Tripluc® na skúšku s luciferázou (Tripluc). Mikrotitračná platnička sa 10 minút pretrepáva pri teplote okolia približne 20 °C. Mikrotitračná platnička sa umiestni do luminometra s cieľom zmerať aktivitu luciferázy. Bioluminiscencia sa meria počas 3 sekúnd bez prítomnosti (F0) a počas 3 sekúnd v prítomnosti (F1) optického filtra. Použitie alternatívnych nastavení je potrebné odôvodniť, napr. v závislosti od použitého modelu luminometra.

29. Parametre jednotlivých koncentrácií sa vypočítajú z nameraných hodnôt, napr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, stredná hodnota ± SD IL8LA, stredná hodnota ± SD GAPLA, stredná hodnota ± SD nIL8LA, stredná hodnota ± SD Ind-IL8LA, stredná hodnota ± SD Inh-GAPLA a 95 % interval spoľahlivosti Ind-IL8LA. Vymedzenia parametrov použitých v tomto odseku sa uvádzajú v dodatkoch 3.1 a 3.4.

30. Pred meraním sa rozlišovanie farieb vo viacfarebných reportérových skúškach vo všeobecnosti dosahuje pomocou detektorov (luminometra a snímača mikrotitračných platničiek), ktoré sú vybavené optickými filtrami, napríklad filtrami s ostrým ohraničením (prepúšťajúcimi dlhé alebo krátke vlnové dĺžky) alebo filtrami s pásmovým priepustom. Pred testovaním je potrebné kalibrovať koeficienty prenosu filtrov pre jednotlivé bioluminiscenčné signálne farby podľa dodatku 3.2.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

31. Z hľadiska kritérií na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej sa vyžaduje, aby v každom testovacom cykle platilo, že:

— prognóza skúšky IL-8 Luc sa považuje za pozitívnu, ak má testovaná chemikália hodnotu Ind-IL8LA ≥ 1,4 a dolný limit 95 % intervalu spoľahlivosti Ind-IL8LA ≥ 1,0,

— prognóza skúšky IL-8 Luc sa považuje za negatívnu, ak má testovaná chemikália hodnotu Ind-IL8LA < 1,4 a/alebo dolný limit 95 % intervalu spoľahlivosti Ind-IL8LA < 1,0.

Prognostický model

32. Testované chemikálie, pri ktorých sa dosiahnu dva pozitívne výsledky spomedzi 1., 2., 3. alebo 4. testovacieho cyklu, sa považujú za pozitívne, zatiaľ čo chemikálie, pri ktorých sa dosiahnu tri negatívne výsledky spomedzi 1., 2., 3. alebo 4. testovacieho cyklu sa považujú za pravdepodobne negatívne (tabuľka 2). Spomedzi pravdepodobne negatívnych chemikálií sa chemikálie rozpustené v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml považujú za negatívne, zatiaľ čo chemikálie nerozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml sa nemajú brať do úvahy (obrázok 1).

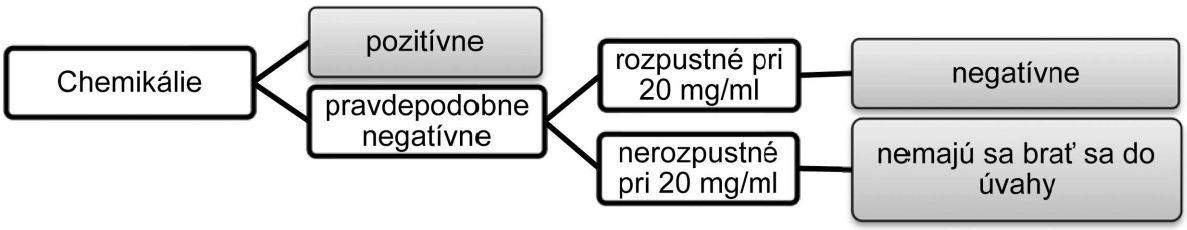
Tabuľka 2

Kritériá na identifikovanie pozitívnych a pravdepodobne negatívnych látok

1. testovací cyklus	2. testovací cyklus	3. testovací cyklus	4. testovací cyklus	Konečná prognóza
pozitívne	pozitívne	—	—	pozitívne
	negatívne	pozitívne	—	pozitívne
		negatívne	pozitívne	pozitívne
			negatívne	pravdepodobne negatívne
negatívne	pozitívne	pozitívne	—	pozitívne
		negatívne	pozitívne	pozitívne
			negatívne	pravdepodobne negatívne
	negatívne	pozitívne	pozitívne	pozitívne
			negatívne	pravdepodobne negatívne
		negatívne	—	pravdepodobne negatívne

Obrázok 1

Prognostický model pre konečné rozhodnutie



Kritériá prijateľnosti

33. Pri použití skúšky IL-8 Luc majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti:

— Hodnota Ind-IL8LA má byť vyššia ako 5,0 najmenej pri jednej koncentrácii pozitívnej kontroly, 4-NBB, v každom testovacom cykle.

— Hodnota Ind-IL8LA má byť nižšia ako 1,4 pri každej koncentrácii negatívnej kontroly, kyseliny mliečnej, v každom testovacom cykle.

— Zamietnu sa údaje z mikrotitračných platničiek, pri ktorých hodnota GAPLA kontrolných jamiek s bunkami a reagentom Tripluc, ale bez chemikálií predstavuje menej ako päťnásobok hodnoty jamky obsahujúcej len testovacie rastové médium (RPMI-1 640 s obsahom 10 % FBS v objeme 50 µl/jamka a X-VIVO™ 15 v objeme 50 µl/jamka).

— Zamietnu sa údaje z mikrotitračných platničiek, pri ktorých je hodnota Inh-GAPLA všetkých koncentrácií testovaných alebo kontrolných chemikálií nižšia ako 0,05. V takom prípade je potrebné zopakovať prvý test tak, aby najvyššia konečná koncentrácia opakovaného testu predstavovala najnižšiu konečnú koncentráciu predchádzajúceho testu.

Správa o teste

34. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testované chemikálie

Jednozložkové látky:

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— rozpustnosť v X-VIVO™ 15. V prípade chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa uvádza, či sa po centrifugácii pozoruje zrážanie alebo flotácia,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu, ak sa nepoužilo X-VIVO™ 15.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— rozpustnosť v X-VIVO™ 15. V prípade chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa uvádza, či sa po centrifugácii pozoruje zrážanie alebo flotácia,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu, ak sa nepoužilo X-VIVO™ 15.

Kontroly

Pozitívna kontrola:

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie, podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti.

— Negatívna kontrola:

identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade,

— že sa použijú iné negatívne kontroly ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitého testu,

— použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),

— číslo šarže a pôvod FBS, názov dodávateľa, číslo šarže 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom a číslo šarže reagentu Tripluc,

— počet pasáží a hustota buniek použitá pri testovaní,

— metóda stanovenia počtu buniek používaná na naočkovanie pred testovaním a opatrenia, ktorými sa zaručí rovnomerné rozdelenie buniek,

— použitý luminometer (napr. model) vrátane jeho nastavenia, použitý substrát luciferázy a preukázanie adekvátnych meraní luminiscencie založených na kontrolnom teste opísanom v dodatku 3.2,

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test (napr. testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti) alebo na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času.

Testovací postup

— počet replikátov a uskutočnených testovacích cyklov,

— koncentrácie testovaných chemikálií, postup ich použitia a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— opis použitých kritérií prijateľnosti štúdie,

— opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

— merania hodnôt IL8LA a GAPLA,

— výpočty hodnôt nIL8LA, Ind-IL8LA a Inh-GAPLA,

— 95 % interval spoľahlivosti hodnoty Ind-IL8LA,

— graf zobrazujúci krivky závislosti odozvy od dávky z hľadiska indukcie aktivity luciferázy a životaschopnosti,

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— rozbor dosiahnutých výsledkov pri skúške IL-8 Luc,

— posúdenie výsledkov skúšky v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

LITERATÚRA

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359 – 69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371 – 9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816 – 30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337 – 51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275 – 84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147 – 155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646 – 57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286 – 91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271 – 9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891 – 4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, K dispozícii na adrese: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046 – 9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Dodatok 3.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (16).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (20).

Chemikália: látka alebo zmes.

CV05: životaschopnosť buniek 05, t. j. minimálna koncentrácia, pri ktorej majú chemikálie hodnotu Inh-GAPLA nižšiu ako 0,05.

FInSLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty Ind-IL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu Ind-IL8LA.

GAPLA: aktivita luciferázy v prípade stabilnej luciferázy emitujúcej červené svetlo (SLR) (λmax = 630 nm), ktorú reguluje promótor GAPDH a ktorá preukazuje životaschopnosť buniek a počet životaschopných buniek.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

II-SLR-LA: skratka používaná na označenie hodnoty Inh-GAPLA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu Inh-GAPLA.

IL-8 (interleukín-8): cytokín odvodený od endotelových buniek, fibroblastov, keratinocytov, makrofágov a monocytov, ktorý spôsobuje chemotaxiu neutrofilov a T-lymfocytov.

IL8LA: aktivita luciferázy v prípade stabilnej luciferázy emitujúcej oranžové svetlo (SLO) (λmax = 580 nm), ktorú reguluje promótor IL-8.

Ind-IL8LA: násobná indukcia nIL8LA. Získava sa ako podiel hodnoty nIL8LA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami a hodnoty buniek THP-G8 nevystavených stimulácii a vyjadruje indukciu pôsobenia promótora IL-8 spôsobenú chemikáliami.

Inh-GAPLA: inhibícia hodnoty GAPLA. Získava sa ako podiel hodnoty GAPLA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami a hodnoty GAPLA neošetrených buniek THP-G8 a vyjadruje cytotoxicitu chemikálií.

Minimálna hranica indukcie (MIT): najnižšia koncentrácia, pri ktorej chemikália spĺňa kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna z hlavných zložiek zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

nIL8LA: aktivita luciferázy SLO odrážajúca pôsobenie promótora IL-8 (IL8LA) normalizovaná na základe aktivity luciferázy SLR odrážajúcej pôsobenie promótora GAPDH (GAPLA). Vyjadruje pôsobenie promótora IL-8 po zohľadnení životaschopnosti buniek alebo počtu buniek.

nSLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty nIL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu nIL8LA.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (16).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (16).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (16).

SLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty IL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu IL8LA.

SLR-LA: skratka používaná na označenie hodnoty GAPLA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu GAPLA.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (16).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo (TG437).

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto metódy.

THP-G8: reportérová bunková línia IL-8, ktorá sa používa v skúške IL-8 Luc. Ľudská bunková línia THP-1 podobná makrofágom bola transfektovaná pomocou génu luciferázy SLO riadeného promótorom IL-8 a génu luciferázy SLR riadeného promótorom GAPDH.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (21).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platná testovacia metóda: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu.

Dodatok 3.2

PRINCÍP MERANIA AKTIVITY LUCIFERÁZY A STANOVENIE KOEFICIENTOV PRENOSU OPTICKÉHO FILTRA PRE SLO A SLR

Systém viacnásobnej reportérovej skúšky – Tripluc – možno použiť s luminometrom pre mikrotitračnú platničku so systémom detekcie viacerých farieb, ktorý umožňuje použitie optického filtra [napr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Optický filter použitý pri meraní je filter prepúšťajúci dlhé alebo krátke vlnové dĺžky v rozsahu 600 – 620 nm alebo filter s pásmovým priepustom v rozsahu 600 – 700 nm.

Meranie luciferáz s dvomi farbami pomocou optického filtra

V tomto príklade sa používa model Phelios AB-2350 (ATTO). Tento luminometer je vybavený 600 nm filtrom prepúšťajúcim dlhé vlnové dĺžky (LP) (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) na rozklad luminiscencie SLO (λmax = 580 nm) a SLR (λmax = 630 nm).

S cieľom stanoviť koeficienty prenosu pre 600 nm filter LP najskôr pomocou čistených enzýmov luciferázy SLO a SLR zmerajte i) intenzitu bioluminiscencie SLO a SLR bez filtra (F0); ii) intenzitu bioluminiscencie SLO a SLR pri prechode cez 600 nm filter LP (filter 1) a iii) vypočítajte koeficienty prenosu 600 nm filtra LP pre SLO a SLR uvedené ďalej.

Koeficienty prenosu		Skratka	Definícia
SLO	koeficienty prenosu filter 1	κO_{R60}	koeficient prenosu filtra pre SLO
SLR	koeficienty prenosu filter 1	κR_{R60}	koeficient prenosu filtra pre SLR

Ďalej je opísaná i) intenzita svetla bez filtra (úplný optický prenos) F0 a ii) intenzita svetla pri prechode cez 600 nm filter LP (filter 1) F1, pričom intenzita SLO v testovacej vzorke je vymedzená ako O a intenzita SLR je vymedzená ako R.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Tieto vzorce možno preformulovať takto:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Pomocou vypočítaných faktorov priepustnosti (κO_{R60} a κR_{R60}) a nameraných hodnôt F0 a F1 možno vypočítať hodnoty O a R takto:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiály a metódy na určenie faktora priepustnosti

1. *Reagenty*

Jednotlivé čistené enzýmy luciferázy:

lyofilizovaný čistený enzým SLO,

lyofilizovaný čistený enzým SLR,

(ktoré sa na účely validácie získali z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko s využitím bunkovej línie THP-G8).

Skúšobný reagent:

reagent Tripluc® na skúšku s luciferázou (napríklad od spoločnosti TOYOBO kat. č. MRA-301).

Rastové médium: pre skúšku s luciferázou (30 ml, skladované pri teplote 2 − 8 °C).

Reagent	Konc.	Konečná koncentrácia v rastovom médiu	Požadované množstvo
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2. *Príprava enzymatického roztoku*

Rozpustite lyofilizovaný čistený enzým luciferázy v skúmavke pridaním 200 µl Tris/HCl alebo Hepes/HCl s koncentráciou 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0) doplneného glycerolom s koncentráciou 10 % (hm./obj.), rozdeľte enzymatický roztok na 10 µl alikvotné časti v jednorazových skúmavkách s objemom 1,5 ml a uskladnite ich v mrazničke pri teplote −80 °C. Zmrazený enzymatický roztok možno používať až 6 mesiacov. Pri použití do každej skúmavky obsahujúcej enzymatické roztoky (zriedený enzymatický roztok) pridajte 1 ml rastového média pre skúšku s luciferázou (RPMI-1640 s 10 % FBS) a uchovávajte ich na ľade, aby sa predišlo deaktivácii.

3. *Meranie bioluminiscencie*

Reagent Tripluc® na skúšku s luciferázou rozmrazte a uchovávajte pri izbovej teplote vo vodnom kúpeli alebo pri teplote okolia. Luminometer zapnite 30 minút pred začiatkom merania, aby došlo k stabilizácii fotonásobiča. Preneste 100 µl zriedeného enzymatického roztoku do čiernej 96-jamkovej mikrotitračnej platničky (s plochým dnom) (referenčnú vzorku SLO do jamiek B1, B2, B3, referenčnú vzorku SLR do jamiek D1, D2, D3). Potom pomocou pipety preneste 100 µl zahriateho reagentu Tripluc do každej jamky na mikrotitračnej platničke, ktorá obsahuje zriedený enzymatický roztok. Pomocou trepačky mikrotitračných platničiek pretrepávajte mikrotitračnú platničku 10 minút pri izbovej teplote (približne 25 °C). Ak sa v roztokoch v jamkách objavia bubliny, odstráňte ich. Umiestnite mikrotitračnú platničku do luminometra a odmerajte aktivitu luciferázy. Bioluminiscencia sa meria počas 3 sekúnd bez prítomnosti (F0) a počas 3 sekúnd v prítomnosti (F1) optického filtra.

Koeficient prenosu optického filtra sa vypočítal takto:

Koeficient prenosu [SLO (κO_{R60})] = (B1 s F1 + B2 s F1 + B3 s F1) / (B1 s F0 + B2 s F0 + B3 s F0)

Koeficient prenosu [SLR (κR_{R60})] = (D1 s F1 + D2 s F1 + D3 s F1) / (D1 s F0 + D2 s F0 + D3 s F0)

Vypočítané faktory prenosu sa používajú pre všetky merania uskutočnené pomocou toho istého luminometra.

Kontrola kvality zariadenia

Použijú sa postupy opísané v protokole skúšky IL-8 Luc (18).

Dodatok 3.3

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Pred rutinným použitím testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky IL-8 Luc v prípade 9 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 9 látok na preukázanie spôsobilosti (vybraných tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie). Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou skúšky IL-8 Luc. Pre skúšku IL-8 Luc sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (6) (1).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri skúške IL-8 Luc

Látky na preukázanie spôsobilosti	Číslo CAS	Skupenstvo	Rozpustnosť v X-VIVO 15 pri 20 mg/ml	Prognóza *in vivo* (1)	Prognóza skúšky IL-8 Luc (2)	Referenčný rozsah (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-dinitrochlórbenzén	97-00-7	tuhé	nerozpustné	senzibilizátor (extrémny)	pozitívne	2,3 – 3,9	0,5 – 2,3
formaldehyd	50-00-0	kvapalné	rozpustné	senzibilizátor (silný)	pozitívne	9 – 30	4 – 9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhé	nerozpustné	senzibilizátor (mierny)	pozitívne	250 – 290	60 – 250
etyléndiamín	107-15-3	kvapalné	rozpustné	senzibilizátor (mierny)	pozitívne	500 – 700	0,1 – 0,4
etylénglykol-dimetakrylát	97-90-5	kvapalné	nerozpustné	senzibilizátor (slabý)	pozitívne	> 2 000	0,04 – 0,1
4-alylanizol (estragol)	140-67-0	kvapalné	nerozpustné	senzibilizátor (slabý)	pozitívne	> 2 000	0,01 – 0,07
streptomycín sulfát	3810-74-0	tuhé	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000
glycerol	56-81-5	kvapalné	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000
izopropanol	67-63-0	kvapalné	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000

Skratky: Číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)
(1) Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (19).
(2) Na základe hodnôt pozorovaných v minulosti (1) (6).
(3) Hodnoty CV_{05} a IL-8 Luc MIT sa vypočítali na základe rozpustnosti vo vode podľa softvéru EPI Suite™.
(4) CV_{05}: minimálna koncentrácia, pri ktorej majú chemikálie hodnotu Inh-GAPLA nižšiu ako 0,05.
(5) MIT: najnižšia koncentrácia, pri ktorej chemikália spĺňa kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky.

Dodatok 3.4

INDEXY A KRITÉRIÁ POSUDZOVANIA

nIL8LA (nSLO-LA)

J-té opakovanie (j = 1 – 4) i-tej koncentrácie (i = 0 – 11) sa meria pre IL8LA (SLO-LA), resp. GAPLA (SLR-LA). Normalizovaná hodnota IL8LA sa označuje ako nIL8LA (nSLO-LA) a je vymedzená ako:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Je to základná jednotka merania v tejto skúške.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA, t. j. násobné zvýšenie spriemerovanej hodnoty nIL8LA (nSLO-LA) pre opakovanie pri i-tej koncentrácii, ktoré sa porovnáva s hodnotou pri koncentrácii 0, predstavuje hlavnú meranú hodnotu v tejto skúške. Tento pomer je vyjadrený týmto vzorcom:

$$Ind - IL8LA_i = \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\right\}$$

Podľa návrhu vedúceho laboratória zodpovedá hodnota 1,4 pozitívnemu výsledku testovanej chemikálie. Táto hodnota je stanovená na základe skúmania historických údajov vedúceho laboratória. Tím pre správu údajov následne používal túto hodnotu vo všetkých fázach validačnej štúdie. Hlavný výsledok, Ind-IL8LA, predstavuje pomer dvoch aritmetických priemerov, ako sa uvádza v rovnici.

95 % interval spoľahlivosti (95 % CI)

Na vyjadrenie presnosti hlavnej výslednej hodnoty možno vykonať odhad 95 % intervalu spoľahlivosti (95 % CI) na základe uvedeného pomeru. Keď je dolný limit 95 % CI ≥ 1, označuje to, že hodnota nIL8LA s i-tou koncentráciou je významne vyššia ako príslušná hodnota s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla. Na stanovenie 95 % CI existuje niekoľko spôsobov. V rámci tejto štúdie sa použila metóda známa pod označením Fiellerova teoréma. Táto teoréma 95 % intervalu spoľahlivosti sa získala z tohto vzorca:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

keď

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

predstavuje 97,5. percentil centrálnej distribúcie t s hodnotou v stupňa voľnosti, keď

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Hodnota Inh-GAPLA predstavuje pomer spriemerovanej hodnoty GAPLA (SLR-LA) pre opakovanie i-tej koncentrácie v porovnaní s hodnotou pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a vyjadruje sa ako

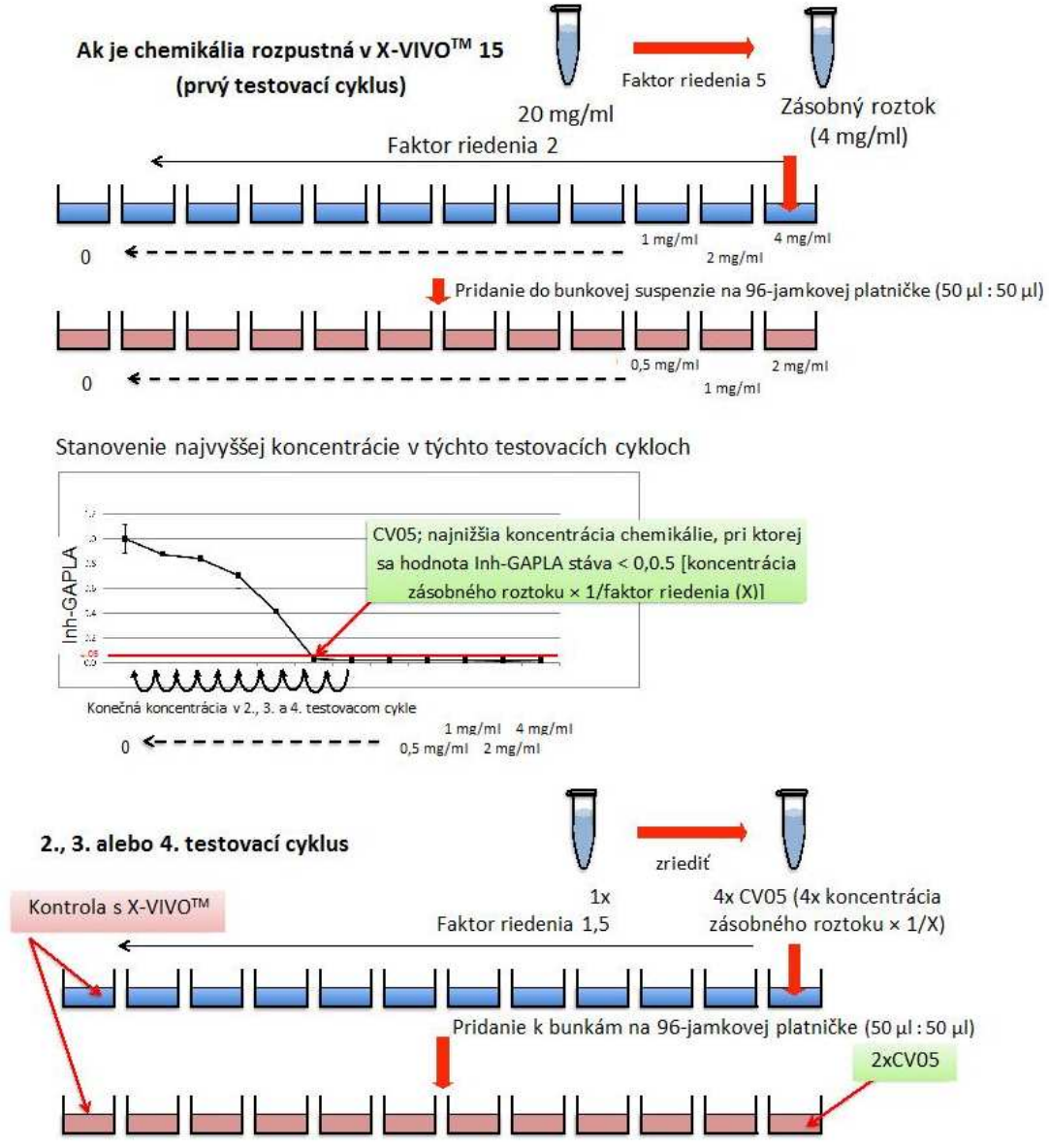
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Keďže hodnota GAPLA je menovateľ hodnoty nIL8LA, veľmi malá hodnota spôsobuje veľkú zmenu hodnoty nIL8LA. Hodnoty Ind-IL8LA s mimoriadne malou hodnotou Inh-GAPLA (menej ako 0,05) sa môžu považovať sa prejav nízkej presnosti.

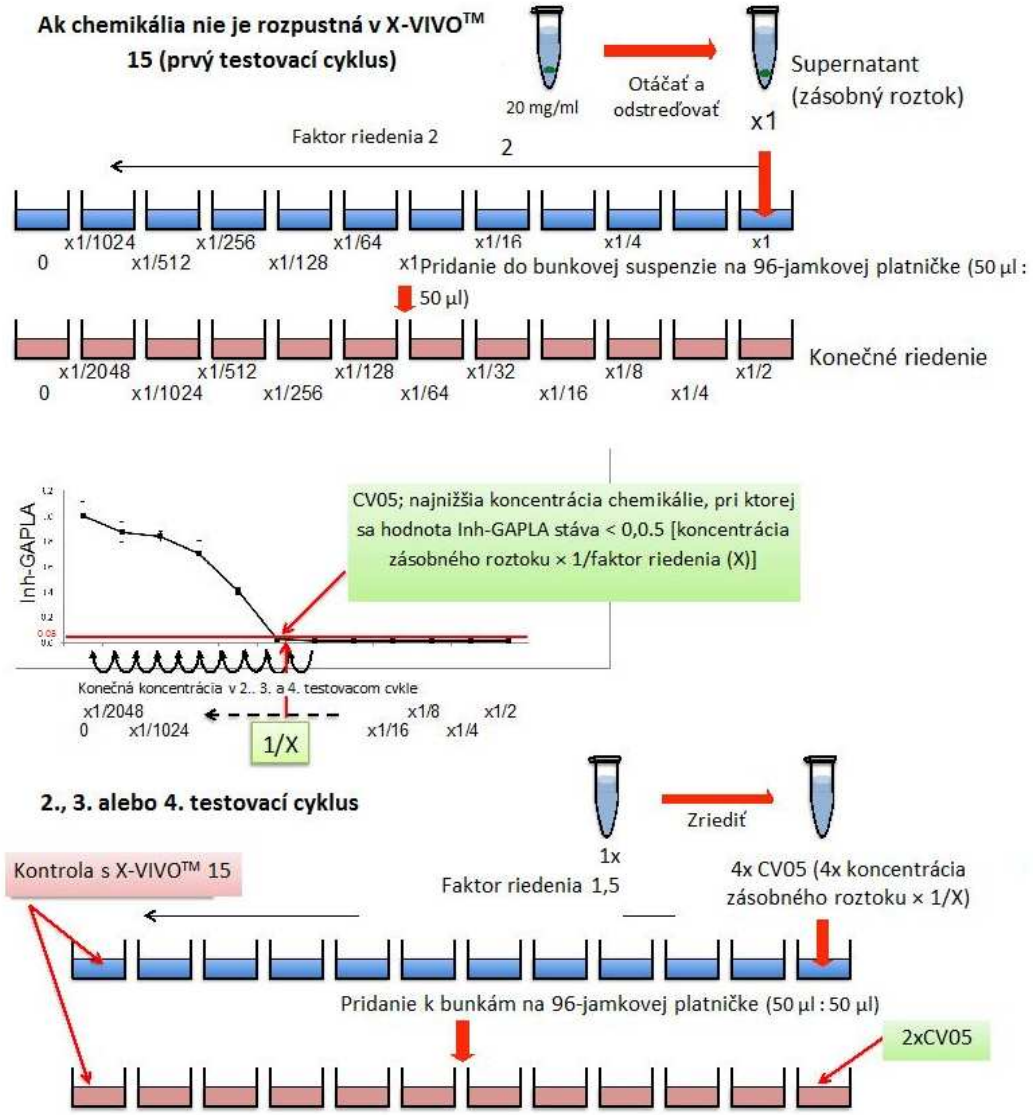
Dodatok 3.5

SCHÉMA METÓD NA ROZPUSTENIE CHEMIKÁLIÍ PRE SKÚŠKU IL-8 LUC

a) pre chemikálie rozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml

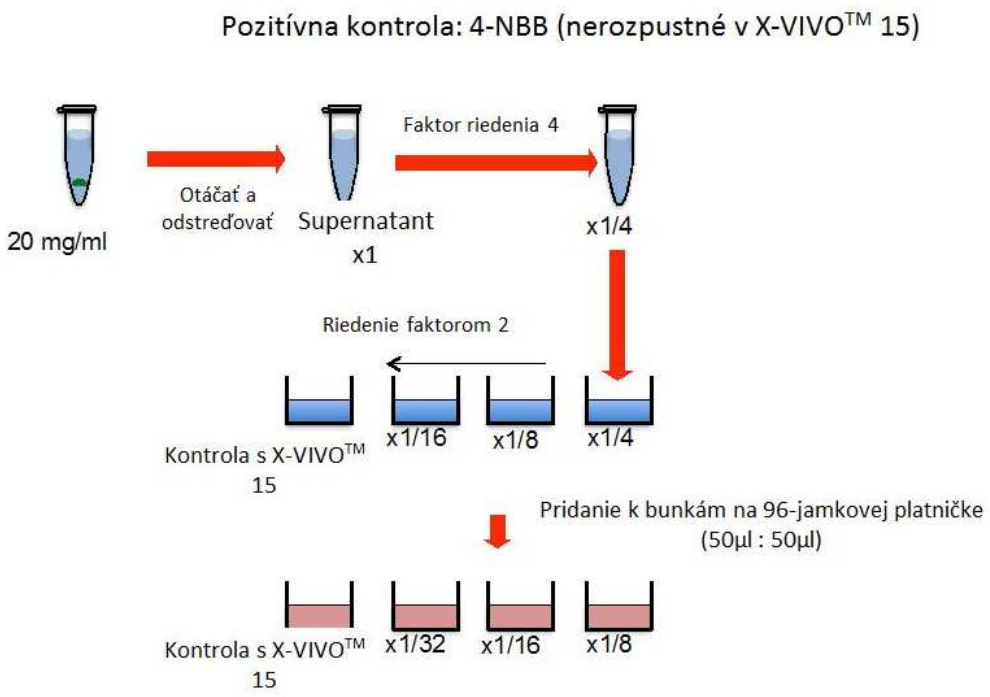


b) pre chemikálie nerozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml



Dodatok 3.6

SCHÉMA METÓDY NA ROZPUSTENIE 4-NBB PRE POZITÍVNU KONTROLU V SKÚŠKE IL-8 LUC



“

9. V časti C sa dopĺňajú tieto kapitoly:

„C.52 **ROZŠÍRENÝ JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST NA RYŽOVNÍČKE JAPONSKEJ (MEOGRT)**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 240 (2015). V rámci rozšíreného jednogeneračného reprodukčného testu na ryžovníčke japonskej (MEOGRT) sa opisuje komplexná testovacia metóda založená na expozícii rýb počas viacerých generácií s cieľom poskytnúť relevantné údaje z hľadiska ekologickej nebezpečnosti a posúdenia rizika chemikálií vrátane tých, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC). Expozícia v rámci testu MEOGRT pokračuje až do vyliahnutia (do dvoch týždňov po oplodnení) v druhej generácii (F2). Na odôvodnenie užitočnosti rozšírenia testu o obdobie po vyliahnutí generácie F2 by bolo potrebné ďalšie skúmanie. V súčasnosti neexistujú dostatočné informácie, na základe ktorých by boli dostupné relevantné podmienky alebo kritériá odôvodňujúce rozšírenie testu o ďalšie obdobie v rámci generácie F2. Táto testovacia metóda sa však môže aktualizovať po posúdení nových informácií a údajov. Za určitých okolností môže byť potenciálne užitočné napríklad usmernenie o rozšírení testu o ďalšie obdobie v rámci generácie F2 tak, aby zahŕňal reprodukciu (napr. v prípade chemikálií s vysokým biokoncentračným potenciálom alebo indikácií medzigeneračných účinkov v iných taxónoch). Pomocou tejto testovacej metódy možno hodnotiť potenciálne chronické účinky chemikálií vrátane potenciálnych endokrinných disruptorov na ryby. V rámci metódy sa kladie hlavný dôraz na potenciálne účinky relevantné z hľadiska populácie (konkrétne škodlivé vplyvy na prežitie, vývoj, rast a reprodukciu) pri výpočte hodnôt koncentrácie, pri ktorej sa nepozorujú účinky (NOEC), alebo účinnej koncentrácie (EC_x), hoci je potrebné poznamenať že prístupy s využitím účinnej koncentrácie EC_x sú zriedka vhodné pre rozsiahle štúdie tohto typu, v ktorých môže byť nepraktický rastúci počet testovacích koncentrácií, ktoré majú slúžiť na určenie požadovanej hodnoty EC_x, čo môže vzhľadom na veľký počet použitých zvierat viesť aj k značným obavám z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chemikálií, pri ktorých sa nevyžaduje posúdenie v prebehu viacerých generácií, alebo chemikálií, ktoré nie sú potenciálnymi endokrinnými disruptormi, môžu byť vhodnejšie iné testovacie metódy (1). Ryžovníčka japonská je vhodným druhom na použitie v tejto testovacej metóde vzhľadom na krátky životný cyklus a možnosti určiť jej genetické pohlavie (2), čo sa považuje za rozhodujúcu zložku v tejto testovacej metóde. Špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto metóde, sa vzťahujú len na ryžovníčku japonskú. V prípade iných malých druhov rýb (napr. danio pruhované) je možné prispôsobenie podobnému testovaciemu protokolu.

2. Touto testovacou metódou sa meria viacero biologických sledovaných parametrov. Hlavný dôraz sa kladie na relevantné parametre z hľadiska potenciálnych škodlivých účinkov na populáciu vrátane prežitia, vývoja výrazných znakov, rastu a reprodukcie. S cieľom poskytnúť mechanistické informácie a prepojenie medzi výsledkami z iných druhov terénnych a laboratórnych štúdií, v ktorých existujú dôkazy *a posteriori*, že chemikália vykazuje pôsobenie ako potenciálny endokrinný disruptor (napr. androgénne alebo estrogénové pôsobenie v iných testoch a skúškach), sa ďalej môžu získať ďalšie užitočné informácie meraním mRNA *vitelogenínu* (*vtg)* (alebo bielkoviny vitelogenínu, VTG), fenotypových sekundárnych pohlavných znakov (SSC) v súvislosti s genetickým pohlavím, ako aj posudzovaním histopatológie. Je potrebné poznamenať, že ak pri testovanej chemikálii alebo jej metabolitoch neexistuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory, nemusí byť potrebné merať tieto sekundárne sledované parametre a vhodnejšie môžu byť štúdie, ktoré sú menej náročné z hľadiska zdrojov a zvierat (1). Vymedzenie pojmov použitých v tejto testovacej metóde sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Vzhľadom na obmedzený počet testovaných chemikálií a laboratórií, ktoré sa zúčastnili na validácii tejto pomerne zložitej štúdie, sa predpokladá, že sa táto testovacia metóda prehodnotí a v prípade potreby zreviduje na základe získaných skúseností, keď bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na posúdenie vplyvu novej koncepcie štúdie. Údaje možno použiť na úrovni 5 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov (3). Testovacia metóda sa začína tým, že sa dospelá ryba (generácia F0) vystaví počas reprodukčnej fázy testovanej chemikálii. Expozícia pokračuje počas vývoja a reprodukcie v generácii F1 a liahnutia v generácii F2, vďaka čomu možno pomocou skúšky vyhodnotiť štrukturálne aj aktivačné endokrinné dráhy. Pri interpretácii sledovaných parametrov súvisiacich s endokrinným systémom možno použiť analýzu váhy dôkazov.

4. Súčasťou testu má byť dostatočný počet jedincov, aby sa zabezpečila dostatočná kapacita na vyhodnotenie sledovaných parametrov súvisiacich s reprodukciou (pozri dodatok 3), pričom zároveň sa má zabezpečiť, aby sa použil len minimálny potrebný počet zvierat z dôvodu zabezpečenia dobrých životných podmienok zvierat. Vzhľadom na veľký počet použitých pokusných zvierat je dôležité dôkladne zvážiť potrebu tohto testu v súvislosti s existujúcimi údajmi, ktoré už môžu obsahovať relevantné informácie o mnohých sledovaných parametroch testu MEOGRT. V tejto súvislosti môže do určitej miery pomôcť rámec OECD pre testovanie toxicity na rybách (1).

5. Táto testovacia metóda bola vyvinutá hlavne na rozlišovanie medzi účinkami jednotlivej látky. Ak sa však vyžaduje testovanie zmesi, je potrebné zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určený regulačný účel.

6. Pred začiatkom testu je dôležité mať k dispozícii informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach testovanej chemikálie, najmä na to, aby bolo možné pripraviť stabilné chemické roztoky. Je potrebné mať k dispozícii aj primerane citlivú analytickú metódu na overenie koncentrácií testovanej chemikálie.

PRINCÍP TESTU

7. Test sa začína trojtýždňovou expozíciou pohlavne dospelých samcov a samíc (najmenej 12 týždňov po oplodnení) v chovných pároch, počas ktorej dochádza k distribúcii testovanej chemikálie do organizmu rodičovskej generácie (F0) podľa jej toxikokinetických vlastností. Čo najbližšie k prvému dňu štvrtého týždňa sa zozbierajú vajíčka na začatie chovu generácie F1. Počas chovu generácie F1 (celkovo 15 týždňov) sa posudzuje liahnivosť a miera prežitia. Okrem toho sa 9 – 10 týždňov po oplodnení posudzujú vzorky rýb z hľadiska vývojových sledovaných parametrov a neresenie sa vyhodnocuje počas troch týždňov v období 12 až 14 týždňov po oplodnení. Generácia F2 sa začína chovať po treťom týždni posudzovania reprodukcie a chová sa až do dokončenia liahnutia.

KRITÉRIA PLATNOSTI TESTU

8. Uplatňujú sa tieto kritériá platnosti testu:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka má počas testu dosahovať ≥ 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,

— stredná teplota vody počas celého trvania štúdie má byť v rozsahu 24 až 26 °C. Krátke odchýlky od strednej hodnoty v jednotlivých akváriách nemajú prekročiť 2 °C,

— priemerná plodivosť kontrol v každej z generácií (F0 a F1) má byť vyššia ako 20 vajíčok na pár a deň. Fertilita všetkých vajíčok nakladených počas posudzovania má byť vyššia ako 80 %. Okrem toho má 16 z odporúčaných 24 kontrolných chovných párov (< 65 %) naklásť viac ako 20 vajíčok na pár a deň,

— liahnivosť vajíčok pri kontrolách má byť ≥ 80 % (priemer) (v každej z generácií F1 a F2),

— miera prežitia po vyliahnutí má byť v kontrolách (F1) do 3 týždňov po oplodnení ≥ 80 % (priemer) a od 3 týždňov po oplodnení do usmrtenia pri generácii F1 (t. j. 15 týždňov po oplodnení) má byť ≥ 90 % (priemer),

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % stredných nameraných hodnôt.

Hoci teplota vody nepredstavuje kritérium platnosti, replikáty v rámci testovanej skupiny sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať a rovnako ani testované skupiny v rámci testu sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať (na základe denných meraní teploty a s vylúčením krátkych odchýlok).

9. Hoci sa pri skupinách s vyššou expozíciou môže pozorovať znížená reprodukcia, prinajmenšom v tretej najvyššej skupine a vo všetkých nižších skupinách generácie F0 by mala byť dostatočná reprodukcia na naplnenie násadových inkubátorov. Navyše má byť dostatočná miera prežitia embryí v skupinách s treťou najvyššou expozíciou a nižšími expozíciami v generácii F1, aby bolo možné vyhodnotiť sledované parametre pri odbere vzoriek pred dosiahnutím dospelosti (pozri odseky 36 a 38 a dodatok 9). Okrem toho má byť prinajmenšom minimálna miera prežitia po vyliahnutí (~20 %) v skupine s druhou najvyššou expozíciou v generácii F1. Tieto požiadavky nepredstavujú samy osebe kritériá platnosti, ale odporúčania na to, aby bolo možné vypočítať spoľahlivé hodnoty NOEC.

10. Ak sa zistí odchýlka od kritérií platnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť výsledkov testu a tieto odchýlky a úvahy by mali byť zahrnuté do správy o teste.

OPIS METÓDY

Prístroje

11. Bežné laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

a) zariadenia na meranie kyslíka a pH;

b) zariadenie na stanovenie tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zariadenie na reguláciu teploty a podľa možnosti na kontinuálne monitorovanie;

d) nádrže z chemicky inertného materiálu a s vhodným objemom vo vzťahu k odporúčanej veľkosti násady a chovnej hustote (pozri dodatok 3);

e) vhodné presné váhy (t. j. s presnosťou ±0,5 mg).

Voda

12. Použiteľná voda na testovanie je každá voda, v ktorej testovací druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Má mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. S cieľom zaistiť, že voda na riedenie neovplyvní výsledky testu neprimeraným spôsobom (napríklad tvorbou komplexov testovanej chemikálie) alebo že nebude mať nepriaznivý vplyv na reprodukčnú schopnosť násady rýb, mali by sa z nej v pravidelných intervaloch odoberať vzorky na analýzu. Ak je známe, že voda má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej bude napríklad raz za šesť mesiacov merať obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napríklad Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a nerozpustných pevných látok. Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 2. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas jednotlivého testu má byť v rozsahu ±0,5 jednotky pH.

Expozičný systém

13. Konštrukcia a materiály použité na expozičný systém nie sú špecifikované. Na konštrukciu testovacieho systému sa použije sklo, nehrdzavejúca oceľ alebo iný chemicky inertný materiál, ktorý sa nekontaminoval počas predchádzajúcich testov. Na účely tohto testu môže vhodný expozičný systém obsahovať kontinuálny prietokový systém (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testované roztoky

14. Zásobný roztok testovanej chemikálie sa dopravuje do expozičného systému pomocou vhodného čerpadla. Prietok zásobného roztoku sa kalibruje v súlade s analytickým potvrdením testovaných roztokov pred začiatkom expozície a počas testu sa pravidelne kontroluje z hľadiska objemu. Testovaný roztok v jednotlivých komorách sa primerane obnovuje (napr. najmenej 5 obnovení objemu/deň až 16 obnovení objemu/deň alebo prietok do 20 ml/min.) v závislosti od stability testovanej chemikálie a kvality vody.

15. Testované roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok sa má podľa možnosti pripraviť jednoduchým miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny/systémy alebo pasívne dávkovacie metódy (14). Je potrebné vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu rozpúšťadiel alebo nosičov, pretože: 1. určité rozpúšťadlá môžu samy osebe spôsobovať toxicitu a/alebo nežiaduce alebo neočakávané reakcie; 2. testovanie chemikálií nad hranicou ich rozpustnosti vo vode (k čomu môže často dôjsť pri použití rozpúšťadiel) môže viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií; 3. použitie rozpúšťadiel v dlhodobejších testoch môže spôsobiť vznik značného stupňa biofilmu v súvislosti s mikrobiálnou aktivitou, ktorý môže mať vplyv na podmienky prostredia, ako aj na schopnosť udržať expozičné koncentrácie; a 4. v prípade, že neexistujú historické údaje, z ktorých vyplýva, že rozpúšťadlo neovplyvňuje výsledok štúdie, pri použití rozpúšťadiel sa vyžaduje použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, čo má dôsledky z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, keďže sú na uskutočnenie testu potrebné ďalšie zvieratá. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD č. 23 o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (15). Rozpúšťadlo sa vyberie na základe chemických vlastností testovanej chemikálie a dostupnosti historických údajov o používaní rozpúšťadla. Ak sa použijú nosiče s rozpúšťadlom, okrem (negatívnych) kontrol bez aplikácie rozpúšťadla (len voda na riedenie) je potrebné vyhodnotiť aj primerané kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. V prípade, že sa nemožno vyhnúť použitiu rozpúšťadla a vyskytne sa mikrobiálna aktivita (vznik biofilmu), počas celého testu sa odporúča v jednotlivých nádržiach (najmenej raz za týždeň) zaznamenávať vznik biofilmu/podávať správy o jeho vzniku. Koncentrácia rozpúšťadla má byť v ideálnom prípade v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla a vo všetkých testovacích vzorkách konštantná. Ak sa neudržiava konštantná koncentrácia rozpúšťadla, v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla sa má použiť najvyššia koncentrácia rozpúšťadla v testovacej vzorke. V prípadoch, keď sa použije nosič s rozpúšťadlom, nemajú maximálne koncentrácie rozpúšťadla prekročiť 100 µl/l alebo 100 mg/l (15) a odporúča sa udržiavať koncentráciu rozpúšťadla čo najnižšiu (napr. < 20 µl/l), aby sa predišlo potenciálnemu účinku rozpúšťadla na merané sledované parametre (16).

Pokusné zvieratá

Výber a chov rýb

16. Pokusným druhom je ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*) vzhľadom na krátky životný cyklus a možnosť určiť genetické pohlavie. Hoci možno podobnému testovaciemu protokolu prispôsobiť iné malé druhy rýb, špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto testovacej metóde, sa vzťahujú len na ryžovníčku japonskú (pozri odsek 1). Pri ryžovníčke japonskej možno jednoducho dosiahnuť rozmnožovanie sa v zajatí, existujú zverejnené metódy na jej chov (17) (18) (19) a sú k dispozícii údaje z krátkodobých testov letality, testov skorých štádií života a úplného životného cyklu (5) (6) (8) (9) (20). Pri všetkých rybách sa dodržiava fotoperióda so 16 hodinami svetla a 8 hodinami tmy. Ako krmivo pre ryby sa používajú živé naupliá žiabronôžky soľnej (rod *Artemia*), ktoré možno v prípade potreby doplniť komerčne dostupným vločkovým krmivom. Komerčne dostupné vločkové krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty.

17. Pokiaľ sa dodržiavajú vhodné postupy chovu, nevyžaduje sa špecifický chovný protokol. Ryžovníčku japonskú možno napríklad chovať v 2-litrových nádržiach s 240 rybami v larválnom štádiu na nádrž do 4 týždňov po oplodnení, potom ju možno chovať v 2-litrových nádržiach s 10 rybami na nádrž do 8 týždňov po oplodnení, pričom následne sa vytvoria chovné páry, ktoré sa prenesú do 2-litrových nádrží.

Aklimatizácia a výber rýb

18. Testované ryby sa vyberajú zo zásoby jedného laboratória, pričom sa pred testom najmenej dva týždne aklimatizujú v podobných podmienkach kvality vody a osvetlenia, aké sa používajú v teste, (poznámka: toto aklimatizačné obdobie nepredstavuje obdobie *in situ* pred expozíciou). Odporúča sa, aby sa testované ryby získali z chovu v rámci laboratória, keďže preprava predstavuje pre dospelé ryby stres a môže ovplyvňovať spoľahlivé trenie. Ryby sa kŕmia naupliami žiabronôžky soľnej dvakrát denne počas obdobia chovu a počas vychytávacej fázy, pričom sa táto potrava dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom. Na začatie tohto testu s cieľom zabezpečiť primeranú replikáciu sa vyžaduje najmenej 42 chovných párov (54 chovných párov, ak sa vyžaduje kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, sčasti pre nedostatok historických údajov, ktoré by podporovali len použitie kontroly bez aplikácie rozpúšťadla). Pri každom chovnom páre generácie F0 sa má navyše overiť zloženie chromozómov XX-XY (t. j. normálne zloženie pohlavných chromozómov v každom pohlaví), aby sa predišlo možnému začleneniu samcov spontánne obsahujúcich chromozómy XX (pozri odsek 39).

19. Počas aklimatizačnej fázy sa zaznamenáva mortalita chovných rýb a po 48-hodinovom období ustálenia sa uplatnia tieto kritériá:

— mortalita vyššia ako 10 % chovnej populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: celá násada sa vyradí,

— mortalita v rozsahu 5 % až 10 % chovnej populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: aklimatizácia počas ďalších siedmich dní, o ktoré sa predĺži dvojtýždňové aklimatizačné obdobie. Ak je počas týchto dodatočných siedmich dní mortalita vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,

— mortalita nižšia ako 5 % populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: násada sa akceptuje.

20. Počas dvojtýždňového aklimatizačného obdobia pred testom a počas obdobia expozície nemajú byť ryby liečené na choroby a pokiaľ je to možné, liečbe chorôb je potrebné sa úplne vyhnúť. V štúdii sa nemajú používať ryby s klinickými príznakmi choroby. Uchováva sa záznam o pozorovaniach a akejkoľvek profylaktickej a terapeutickej liečbe chorôb počas obdobia chovu pred testom.

21. Vychytávacia fáza sa začína s pohlavne dimorfnými dospelými rybami s geneticky odlíšeným pohlavím z laboratórnej zásoby pohlavne dospelých zvierat chovaných pri teplote 25 ±2 °C. Pri týchto rybách sa má počas týždňa pred expozíciou preukázať plodnosť (t. j. tým, že majú životaschopné potomstvo). V rámci celej skupiny rýb použitých v teste sa hmotnosť jednotlivých jedincov podľa pohlavia na začiatku testu má udržiavať v rozsahu ±20 % aritmetického priemeru hmotností toho istého pohlavia. Na odhad priemernej hmotnosti sa pred testom odváži podvzorka rýb. Vybraté ryby majú mať najmenej 12 týždňov po oplodnení, pričom samice majú mať hmotnosť ≥ 300 mg a samce ≥ 250 mg.

KONCEPCIA TESTU

Testované koncentrácie

22. Odporúča sa použiť päť koncentrácií chemikálie plus kontroly. Pri výbere rozsahu testovacích koncentrácií je potrebné zvážiť všetky zdroje informácií vrátane kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity (QSAR), prevzatých údajov z analogických zdrojov, výsledkov testov na rybách, napríklad skúšok akútnej toxicity (kapitola C.1 tejto prílohy), krátkodobej reprodukčnej skúšky na rybách (kapitola C.48 tejto prílohy) a iných testovacích metód, napríklad kapitoly C.15, C.37, C.41, C.47 alebo C.49 tejto prílohy (21) (22) (23) (24) (25) (26), ak sú k dispozícii, alebo v prípade potreby z testu na zistenie rozsahu, ktorý prípadne zahŕňa reprodukčnú fázu. V prípade potreby sa test na zistenie rozsahu môže uskutočniť pri podmienkach (kvalita vody, testovací systém, násada zvierat) podobných tým, ktoré sa používajú v konečnom teste. Ak sa vyžaduje použitie rozpúšťadla a nie sú k dispozícii historické údaje, pomocou testu na zistenie rozsahu možno zistiť vhodnosť rozpúšťadla. Najvyššia testovaná koncentrácia by nemala presiahnuť úroveň rozpustnosti vo vode, 10 mg/l alebo 1/10 96h-LC50 (27). Najnižšia koncentrácia by mala predstavovať desať- až stonásobne nižší faktor, než je najvyššia koncentrácia. Vďaka použitiu piatich koncentrácií možno v tomto teste merať nielen vzťah medzi dávkou a odozvou, ale aj získať hodnoty najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC) a NOEC, ktoré sú potrebné na posúdenie rizika v niektorých regulatórnych programoch alebo v niektorých jurisdikciách. Faktor rozstupu medzi nominálnymi koncentráciami testovanej chemikálie medzi susediacimi úrovňami aplikovanej dávky je vo všeobecnosti ≤ 3,2.

Replikáty v rámci testovaných skupín a kontrol

23. Je potrebné použiť minimálne šesť testovacích komôr s replikátmi na každú testovanú koncentráciu (pozri dodatok 7). Počas reprodukčnej fázy (s výnimkou generácie F0) sa na účely posúdenia plodivosti štruktúra replikátov zdvojuje a každý replikát obsahuje len jeden chovný pár (pozri odsek 42).

24. Okrem testovacích koncentrácií sa použije kontrola s vodou na riedenie a v prípade potreby kontrola s aplikáciou rozpúšťadla. Na zabezpečenie primeranej štatistickej váhy je potrebné použiť dvojnásobný počet komôr s replikátmi pre kontroly (t. j. v prípade kontrol sa má použiť najmenej dvanásť replikátov). Počas reprodukčnej fázy sa zdvojnásobuje počet replikátov v rámci kontrol (t. j. minimálne 24 replikátov, pričom každý replikát obsahuje len jeden páriaci sa pár). Po reprodukcii nemajú kontrolné replikáty obsahovať viac než 20 embryí (rýb).

POSTUP

Začiatok testu

25. Reprodukčne aktívne dospelé ryby, ktoré sa použijú na začatie generácie F0 v rámci testu, sa vyberú na základe dvoch kritérií: vek (zvyčajne viac ako 12 týždňov po oplodnení, odporúča sa však neprekročiť 16 týždňov po oplodnení) a hmotnosť (má byť ≥ 300 mg v prípade samíc a ≥ 250 mg v prípade samcov).

26. Páry zložené zo samíc a samcov spĺňajúcich uvedené špecifikácie sa premiestnia ako samostatné páry do jednotlivých nádrží replikátov, t. j. na začiatku testu bude dvanásť replikátov v rámci kontrol a šesť replikátov v skupinách s aplikovanou chemikáliou. Týmto nádržiam sa náhodne priradí testovaná skupina (napr. T1 – T5 a kontrola) a replikát (napr. A – L pri kontrolách a A – F pri skupinách s aplikovanou chemikáliou) a potom sa umiestnia do expozičného systému s príslušným prítokom do jednotlivých nádrží.

Podmienky expozície

27. Úplný súhrn parametrov a podmienok testu sa uvádza v dodatku 3. Dodržiavaním týchto špecifikácií sa majú v prípade kontrolných rýb dosiahnuť hodnoty sledovaných parametrov, ktoré sú podobné hodnotám uvedeným v dodatku 4.

28. Počas testu je potrebné merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH a teplotu najmenej v jednej testovacej nádobe v každej testovanej skupine a v kontrole. S výnimkou teploty sa tieto merania uskutočňujú počas obdobia expozície najmenej raz týždenne. Priemerná teplota vody v rámci testu počas celého trvania štúdie má byť v rozsahu 24 až 26 °C. Teplota sa meria každý deň počas celého obdobia expozície. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas jednotlivého testu má byť v rozsahu ±0,5 jednotky pH. Replikáty v rámci testovanej skupiny sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať a rovnako ani testované skupiny v rámci testu sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať (na základe denných meraní teploty a s vylúčením krátkych odchýlok).

Dĺžka expozície

29. V rámci testu dochádza k trojtýždňovej expozícii pohlavne dospelých rýb od generácie F0. V 4. týždni približne na 24. testovací deň sa vytvorí generácia F1, chovné páry generácie F0 sa humánnym spôsobom usmrtia a zaznamená sa ich hmotnosť a dĺžka (pozri odsek 34). Za tým nasleduje expozícia generácie F1 počas ďalších 14 týždňov (spolu 15 týždňov v prípade generácie F1) a expozícia generácie F2 počas dvoch týždňov až do vyliahnutia. Celkový čas trvania testu je primárne 19 týždňov (t. j. do vyliahnutia generácie F2). Harmonogram testu sa uvádza v tabuľke 2 a ďalej je podrobne vysvetlený v dodatku 9.

Kŕmny režim

30. Ryby možno kŕmiť žiabronôžkou soľnou rodu *Artemia* (24-hodinové naupliá) *ad libitum*, pričom sa táto potrava podľa potreby dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom. Komerčne dostupné vločkové krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty, napríklad organochlórové pesticídy, polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), polychlórované bifenyly (PCB). Je potrebné predísť podávaniu potravy so zvýšenou úrovňou látok s endokrinným pôsobením (t. j. fytoestrogénov), ktoré by mohli narušiť reakciu v rámci testu. Neskonzumovaná potrava a fekálny materiál sa odstraňujú z testovacích nádob podľa potreby, napríklad dôkladným vyčistením dna každej nádrže odsávaním. Bočné steny a dno každej nádrže je potrebné čistiť raz alebo dvakrát týždenne (napr. oškrabaním špachtľou). Príklad harmonogramu kŕmenia sa uvádza v dodatku 5. Dávka potravy závisí od počtu rýb na replikát. Dávka potravy sa preto znižuje, ak v replikáte dochádza k mortalite.

Analytické stanovenie a merania

31. Pred začiatkom obdobia expozície treba zabezpečiť riadne fungovanie systému prísunu chemikálie. Stanoviť by sa mali všetky potrebné analytické metódy vrátane dostatočných vedomostí o stabilite chemikálie v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie testovanej chemikálie stanovujú vo vhodných intervaloch, podľa možnosti aspoň raz týždenne v jednom replikáte v každej testovanej skupine so striedaním medzi replikátmi v tej istej testovanej skupine každý týždeň.

32. Počas testu by sa mali kontrolovať prietoky riediaceho a zásobného roztoku v príslušných intervaloch (napr. minimálne trikrát týždenne). Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % priemerných nameraných hodnôt počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt. V prípade chemikálií, pri ktorých dochádza k výraznej akumulácii v rybách, sa testovacie koncentrácie môžu znížiť nepriamo úmerne s rastom rýb. V takých prípadoch sa odporúča, aby sa miera obnovovania testovaného roztoku v každej komore prispôsobila tak, aby sa testovacie koncentrácie udržiavali čo najkonštantnejšie.

Pozorovanie a merané sledované parametre

33. Medzi merané sledované parametre patrí plodivosť, fertilita, liahnutie, rast a prežívanie na účely hodnotenia možných účinkov na úrovni populácie. Denne sa uskutočňujú aj pozorovania správania a akékoľvek nezvyčajné správanie sa zaznamená. Medzi ostatné mechanistické sledované parametre patria úrovne hepatickej mRNA *vtg* alebo bielkoviny VTG na základe imunologického testu (28), pohlavné fenotypové markery, ako sú charakteristické papily análnej plutvy pri samcoch, histologické hodnotenie gonadálneho pohlavia a histopatologické hodnotenie obličky, pečene a gonády (pozri zoznam sledovaných parametrov v tabuľke 1). Všetky tieto špecifické sledované parametre sa hodnotia z hľadiska určenia genetického pohlavia jedinca na základe prítomnosti alebo neprítomnosti génu *dmy* určujúceho samčie pohlavie pri ryžovníčke japonskej (pozri odsek 41). Okrem to sa hodnotí aj čas do trenia. Jednoduché fenotypové pomery pohlaví možno navyše odvodiť na základe informácií o počte papíl análnej plutvy, na základe čoho sa stanoví, či je jedinec ryžovníčky japonskej fenotypovo samec alebo samica. Pri tejto testovacej metóde sa neočakáva schopnosť rozpoznať mierne odchýlky od očakávaného pomeru pohlaví, keďže pri pomerne malom počte rýb na replikát sa nedosiahne dostatočná štatistická váha. Počas histopatologického posúdenia sa hodnotí aj gonáda a uskutočnia sa omnoho dôkladnejšie analýzy na posúdenie gonádového fenotypu v kontexte genetického pohlavia.

34. Hlavným účelom tejto testovacej metódy je posúdiť potenciálne relevantné účinky testovanej chemikálie z hľadiska populácie. Mechanistické sledované parametre (VTG, sekundárne pohlavné znaky a určité účinky na gonády z hľadiska histopatológie) môžu pomôcť pri stanovení, či je niektorý účinok sprostredkovaný endokrinným pôsobením. Na tieto mechanistické sledované parametre však môže mať vplyv aj systémová toxicita a iné toxicity. Následne možno podrobne posúdiť aj histopatológiu pečene a obličky s cieľom lepšie porozumieť reakciám pri mechanistických sledovaných parametroch. Ak sa však tieto podrobné hodnotenia neuskutočnia, je potrebné zaznamenať a uviesť v správe výrazné abnormality, ktoré sa mimochodom zistia počas histopatologického hodnotenia.

Humánne usmrcovanie rýb

35. Pri ukončení expozície generácií F0 a F1 a keď sa vykonáva výber podvzorky rýb pred dosiahnutím dospelosti, sa tieto ryby usmrtia vhodným množstvom anestetického roztoku [napr. trikaín metán sulfonát, MS-222 (CAS 886-86-2), 100 – 500 mg/l] tlmeného pridaním 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonát sodný, CAS 144-55-8) na zníženie podráždenia slizníc. Ak sa na rybách prejavujú príznaky značného utrpenia (vo veľmi závažnej miere a je možné spoľahlivo predpokladať smrť) a zvieratá sa považujú za moribundné, je potrebné im podať anestetikum a usmrtiť ich a na účely analýzy údajov ich považovať za uhynuté. Ak sa ryba usmrtí v dôsledku morbidity, zaznamená sa to a uvedie v správe. Ryba sa môže uchovať na účely histopatologickej analýzy (fixácia ryby na účely možnej histopatológie) v závislosti od toho, kedy počas štúdie dôjde k jej usmrteniu.

Manipulácia s vajíčkami a rybami v larválnom štádiu

Odber vajíčok od chovných párov na rozmnožovanie nasledujúcej generácie

36. Odber vajíčok sa uskutočňuje v prvý deň (alebo v prípade potreby v prvých dvoch dňoch) 4. testovacieho týždňa pri prechode z generácie F0 na F1 a 18. testovacieho týždňa pri prechode z generácie F1 na F2. 18. testovací týždeň zodpovedá dospelým rybám generácie F1 15 týždňov po oplodnení. Je dôležité deň pred odberom vajíčok z každej nádrže odstrániť všetky vajíčka, aby sa zabezpečilo, že odobraté vajíčka od chovného páru sú z jedného trenia. Samice ryžovníčky japonskej niekedy po trení nosia vajíčka v blízkosti močopohlavného otvoru, až kým ich nemôžu naklásť na substrát. Ak sa v nádrži nenachádza substrát, vajíčka možno nájsť buď prichytené k samici, alebo na dne nádrže. V závislosti od umiestnenia možno vajíčka opatrne odobrať zo samice alebo odsať z dna nádrže vo 4. testovacom týždni generácie F0 a v 18. testovacom týždni generácie F1. Všetky vajíčka odobraté v rámci testovanej skupiny sa zoskupia pred rozdelením do inkubačných komôr.

37. Vlákna, ktoré držia vajíčka vylúčené pri trení pohromade, sa odstránia. Od každého chovného páru sa odoberú oplodnené vajíčka (do 20) (1 pár na replikát), zoskupia sa v rámci testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do vhodných inkubačných komôr (dodatky 6 a 7). Pomocou kvalitného stereoskopického mikroskopu možno pozorovať charakteristické črty skorého štádia oplodnenia/vývoja, napríklad vystúpenie zárodkového obalu (choriónu), prebiehajúce delenie buniek alebo vznik blastuly. Inkubačné komory možno umiestniť buď v samostatných inkubačných akváriách pripravených pre jednotlivé testované skupiny (v takom prípade je v nich potrebné merať parametre kvality vody a koncentrácie testovanej chemikálie), alebo v akváriu s replikátom, v ktorom budú umiestnené vyliahnuté larvy (napr. eleuteroembryo). Ak sa vyžaduje druhý deň odberu (23. testovací deň), všetky vajíčka z oboch dní sa zoskupia a potom sa systematicky rozdelia do jednotlivých replikátov testovanej skupiny.

Starostlivosť o vajíčka do vyliahnutia

38. Oplodnené vajíčka sa priebežne premiešavajú, napr. v inkubátore na vajíčka, pomocou vzduchových bublín alebo vertikálnym nakláňaním inkubátora na vajíčka. Denne sa kontroluje a zaznamenáva mortalita oplodnených vajíčok (embryí). Mŕtve vajíčka sa z inkubátorov odstránia (dodatok 9). Na 7. deň po oplodnení sa premiešavanie zastaví alebo obmedzí, aby sa oplodnené vajíčka usadili na dne inkubátora. Tým sa podporí liahnutie, ku ktorému dôjde zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch nasledujúcich dní. V každej skupine s aplikovanou chemikáliou a kontrole sa spočítajú plôdiky (mladé larvy; eleuteroembryo) (zlúčia sa podľa replikátov). Oplodnené vajíčka, ktoré sa nevyliahli za dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole (zvyčajne 16 alebo 18 dní po oplodnení), sa považujú za neživotaschopné a vyradia sa.

39. Do každej nádrže s replikátom sa prenesie 12 plôdikov. Plôdiky z inkubačných komôr sa zoskupia a systematicky rozdelia do nádrží s replikátom (dodatok 7). Možno to uskutočniť náhodným výberom plôdika zo zlúčenej testovanej skupiny a postupným pridávaním jedného plôdika bez rozlišovania do akvária s replikátom. Každá z nádrží má obsahovať rovnaký počet (n = 12) vyliahnutých lariev (v každej najviac 20 lariev). Ak nie je k dispozícii dostatok plôdikov na naplnenie všetkých replikátov testovanej skupiny, odporúča sa zabezpečiť, aby sa v čo najväčšom počte replikátov nachádzalo 12 plôdikov. S plôdikmi možno bezpečne manipulovať pomocou sklenej pipety s veľkým priemerom. Všetky ďalšie plôdiky sa humánne usmrtia pomocou anestetika. Počas niekoľkých týždňov pred vytvorením chovných párov sa zaznamená deň, keď sa pri každom replikáte pozoruje prvé trenie.

Vytvorenie chovných párov

Odobratie odrezkov plutiev a stanovenie genotypového pohlavia

40. Stanovenie genotypového pohlavia prostredníctvom odrezkov plutiev sa uskutočňuje 9 až 10 týždňov po oplodnení (t. j. 12. až 13. testovací týždeň pri generácii F1). Všetkým rybám v nádrži sa podá anestetikum (pomocou schválenej metódy, napr. IACUC) a z dorzálnej alebo ventrálnej časti chvostovej plutvy každej ryby sa odoberie malá vzorka tkaniva na určenie genotypového pohlavia jedinca (29). Ryby z replikátu sa môžu v nádrži s replikátom umiestniť do malých klietok, pokiaľ možno jednotlivo. Prípadne možno do každej klietky umiestniť dve ryby, ak ich možno od seba odlíšiť. Jednou možnou metódou je pri odbere vzorky tkaniva odlišne narezať chvostovú plutvu (napr. pri jednej rybe z dorzálnej a pri druhej z ventrálnej strany).

41. Genotypové pohlavie ryžovníčky japonskej sa určuje na základe identifikovaného a sekvenovaného génu (*dmy*), ktorý sa nachádza v chromozóme Y. Prítomnosť génu *dmy* znamená, že ide o jedinca s chromozómami XY bez ohľadu na fenotyp, zatiaľ čo chýbajúci gén *dmy* znamená, že ide o jedinca s chromozómami XX bez ohľadu na fenotyp (30) (31). Z každého odrezku sa extrahuje deoxyribonukleová kyselina (DNA) a prítomnosť alebo neprítomnosť génu *dmy* možno určiť metódami polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) [pozri dodatok 9 v kapitole C.41 tejto prílohy alebo dodatok 3 a 4 v referencii (29)].

Stanovenie chovných párov

42. Pomocou informácií o genotypovom pohlaví sa vytvoria chovné páry s chromozómami XX-XY bez ohľadu na externý fenotyp, ktorý môže byť zmenený v dôsledku expozície testovanej chemikálii. Deň po stanovení genotypového pohlavia každej ryby sa náhodne vyberú dve ryby s chromozómami XX a dve ryby s chromozómami XY z každého replikátu a vytvoria sa dva chovné páry s chromozómami XX-XY. Ak sa v replikáte nenachádzajú dve ryby s chromozómami XX alebo dve ryby s chromozómami XY, vhodné ryby je potrebné získať z iných replikátov v rámci testovanej skupiny. Prioritou je mať odporúčaný počet replikovaných chovných párov (12) v každej testovanej skupine a v kontrolách (24). Pri vytváraní chovných párov sa vylúčia ryby so zrejmými abnormalitami (problémy s plávacím mechúrom, deformity chrbtice, mimoriadne odlišnosti vo veľkosti atď.). Počas reprodukčnej fázy generácie F1 obsahuje každá nádrž s replikátom len jeden chovný pár.

Odber vzoriek rýb pred dosiahnutím dospelosti a posúdenie sledovaných parametrov

Odber vzoriek rýb, ktoré nepatria do chovných párov

43. Po vytvorení chovných párov sa ryby, ktoré nie sú vybraté na ďalší chov, humánne usmrtia na účely merania sledovaných parametrov pred dosiahnutím dospelosti v 12. – 13. testovacom týždni (F1). Je mimoriadne dôležité, aby sa s týmito rybami zaobchádzalo tak, aby bolo možné k jednotlivým rybám priradiť genotypové pohlavie určené na účely výberu chovného páru. Všetky získané údaje sa analyzujú v kontexte genotypového pohlavia konkrétnej ryby. Každá ryba sa používa na merania rôznych sledovaných parametrov vrátane: stanovenia miery prežitia mladých rýb/rýb pred dosiahnutím dospelosti [7. – 12/13. testovací týždeň (F1)], rastu do dĺžky (štandardnú dĺžku možno

merať, ak sa skrátila chvostová plutva v dôsledku odberu vzoriek na analýzu genetického pohlavia. Celkovú dĺžku možno merať, ak sa na stanovenie génu *dmy* použila len časť chvostovej plutvy, dorzálna alebo ventrálna) a telesnej hmotnosti (t. j. vlhká hmotnosť, vysušené do sucha), pečeňovej hodnoty mRNA *vtg* (alebo VTG) a papíl análnej plutvy (pozri tabuľky 1 a 2). Na výpočet priemerného rastu v testovanej skupine sú potrebné aj hmotnosti a dĺžky chovných párov.

Odber vzoriek tkaniva a meranie vitelogenínu

44. Vykoná sa pitva pečene a pečeň sa uloží pri teplote ≤ −70 °C až do uskutočnenia meraní mRNA *vtg* (alebo VTG). Chvost ryby vrátane análnej plutvy sa uchová vo vhodnom fixačnom prostriedku (napr. Davidsonovom) alebo sa odfotografuje tak, aby bolo možné neskôr spočítať papily análnej plutvy. V prípade potreby sa v tomto čase môže odobrať a zakonzervovať vzorka iných tkanív (t. j. gonády). Koncentrácia VTG v pečeni sa má kvantifikovať pomocou homológnej techniky ELISA (pozri odporúčané postupy pre ryžovníčku japonskú v dodatku 6 v kapitole C.48 tejto prílohy). Prípadne existujú metódy na kvantifikáciu mRNA vtg, t. j. na extrakciu mRNA génu *vtg I* zo vzorky pečene a kvantifikáciu počtu kópií génu *vtg I* (na ng celkovej mRNA) pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie, ktoré stanovila Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (29). Namiesto stanovenia počtu kópií génu *vtg* v kontrolných a testovaných skupinách možno pomocou metódy, ktorá je menej náročná z hľadiska zdrojov a má nižšiu technickú náročnosť, stanoviť relatívnu (násobnú) zmenu expresie *vtg I* z kontrolných a testovaných skupín.

Sekundárne pohlavné znaky

45. Za normálnych okolností len pohlavne dospelé samce ryžovníčky japonskej majú papily, ktoré sa vyvíjajú na spojených platničkách určitých lúčov análnej plutvy ako sekundárne pohlavné znaky, čím slúžia ako potenciálny biologický marker účinkov narúšajúcich endokrinný systém. Metóda na určenie počtu papíl análnej plutvy (počtu spojených platničiek s papilami) sa uvádza v dodatku 8. Na účely výpočtu jednoduchého pomeru pohlaví na replikát možno jedince kategorizovať ako samce alebo samice z hľadiska externého fenotypu aj na základe počtu papíl análnej plutvy na jedinca. Ryžovníčka japonská s akýmkoľvek počtom papíl análnej plutvy väčším ako nula sa považuje za samca a jedinec s nulovým počtom papíl análnej plutvy sa považuje za samicu.

Posúdenie plodivosti a fertility

46. Plodivosť a fertilita sa posudzujú v 1. až 3. testovacom týždni v generácii F0 a v 15. až 17. testovacom týždni v generácii F1. Počas 21 za sebou nasledujúcich dní sa odoberajú vajíčka od každého chovného páru. Vajíčka sa každé ráno opatrne odoberú od samíc zachytených v sieťach a/alebo sa odsajú z dna akvária. Pri každom chovnom páre v jednotlivých replikátoch sa denne zaznamenáva plodivosť a fertilita. Plodivosť sa vymedzuje ako počet vajíčok nakladených pri trení a fertilita sa funkčne vymedzuje ako počet oplodnených a životaschopných vajíčok v čase počítania. Spočítanie sa má uskutočniť čo najskôr po odbere vajíčok.

47. Plodivosť replikátu sa zaznamenáva denne ako počet vajíčok na chovný pár, ktorý sa analyzuje odporúčanými štatistickými postupmi na základe priemerov replikátov. Fertilita replikátu je súčet počtu oplodnených vajíčok vyprodukovaných chovným párom, ktorý sa vydelí súčtom počtu vajíčok vyprodukovaných daným párom. Štatisticky sa fertilita analyzuje ako pomer na replikát. Liahnivosť replikátu je podiel počtu plôdikov a počtu nasadených embryí (zvyčajne 20). Štatisticky sa liahnivosť analyzuje ako pomer na replikát.

Odber vzoriek dospelých rýb a posúdenie sledovaných parametrov

Odber vzoriek rýb, ktoré patria do chovných párov

48. Po 17. testovacom týždni (t. j. po tom, ako sa úspešne začala generácia F2) sa dospelé ryby z generácie F1 humánne usmrtia a vyhodnotia sa rôzne sledované parametre (pozri tabuľky 1 a 2). Vytvorí sa obrazový záznam análnej plutvy na posúdenie papíl análnej plutvy (pozri dodatok 8) a/alebo sa chvost priamo za močopohlavným otvorom odstráni a zafixuje, aby bolo možné neskôr stanoviť počet papíl. V tomto čase možno odobrať a archivovať vzorku časti chvostovej plutvy, aby bolo v prípade potreby možné overiť genetické pohlavie (*dmy*). V prípade potreby sa môže odobrať vzorka tkaniva na účely zopakovania analýzy *dmy*, aby bolo možné overiť genetické pohlavie konkrétnej ryby. Pred ponorením celého tela do vhodného fixačného prostriedku (napr. Davidsonov fixačný prostriedok) sa telová dutina otvorí, aby bola možná perfúzia pomocou daného fixačného prostriedku. Ak sa však pred fixáciou vykoná vhodný krok na zabezpečenie priepustnosti, nie je potrebné otvorenie telovej dutiny.

Histopatológia

49. Každá ryba sa histologicky posudzuje z hľadiska výskytu patologických javov v gonadálnom tkanive (30) (29). Ako sa uvádza v odseku 33, na ostatné mechanistické sledované parametre vyhodnocované v rámci tejto skúšky (t. j. VTG, sekundárne pohlavné znaky a určité gonadálne účinky z hľadiska histopatológie) môže mať vplyv systémová toxicita alebo iné toxicity. Následne možno podrobne posúdiť aj histopatológiu pečene a obličky s cieľom lepšie porozumieť reakciám pri mechanistických sledovaných parametroch. Ak sa však tieto podrobné hodnotenia neuskutočnia, je potrebné zaznamenať a uviesť v správe výrazné abnormality, ktoré sa mimochodom zistia počas histopatologického hodnotenia. Je možné zvážiť postup smerom k nižším úrovniam, a to od testovanej skupiny s najvyššou dávkou (v porovnaní s kontrolou) po testovanú skupinu s dávkou nespôsobujúcou žiadny účinok, odporúča sa však zohľadniť usmernenie v oblasti histopatológie (29). Všetky vzorky sa zvyčajne spracujú/pripravia sa z nich rezy a ďalej ich vyhodnocuje patológ. Ak sa použije prístup založený na postupe smerom k nižším úrovniam, je potrebné uviesť, že pri postupe RSCABS (Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices) sa vychádza z očakávania, že so zvyšujúcimi sa úrovňami dávky sa bude zvyšovať aj biologický účinok (patologický jav). Pri skúmaní len jednej vysokej dávky bez medziľahlých dávok tak nebude možné dosiahnuť dostatočnú štatistickú váhu. Ak na stanovenie toho, že táto vysoká dávka nemá žiaden účinok, nie je potrebná štatistická analýza, môže byť tento prístup prijateľný. Z tohto hodnotenia sa odvodzuje aj gonádový fenotyp.

Ďalšie pozorovania

50. Na základe testu MEOGRT sa získavajú údaje, pomocou ktorých možno súčasne vyhodnotiť (napr. v analýze váhy dôkazov) aspoň dva všeobecné typy dráh nepriaznivého účinku (AOP), ktoré vedú k reprodukčnej poruche: a) dráhy spostredkované endokrinným systémom zahŕňajúce narušenie endokrinnej osi hypotalamus – hypofýza – gonády (HPG) a b) dráhy, ktoré spôsobujú zníženie prežívania, rastu (dĺžka a hmotnosť) a reprodukcie prostredníctvom toxicity nesprostredkovanej endokrinným systémom. Súčasťou tohto testu sú aj sledované parametre, ktoré sa zvyčajne merajú v testoch chronickej toxicity, ako je test úplného životného cyklu a test skorých štádií života, a možno ich použiť na posúdenie nebezpečenstva, ktoré predstavujú spôsoby toxického účinku nesprostredkované endokrinným systémom aj dráhy toxicity sprostredkovanej endokrinným systémom. Počas testu sa denne uskutočňujú pozorovania správania a akékoľvek nezvyčajné správanie sa zaznamená. Okrem toho sa zaznamená mortalita a vypočíta sa miera prežitia po selekciu rýb (6./7. testovací týždeň), miera prežitia od selekcie po odber vzoriek jedincov pred dosiahnutím dospelosti (9 – 10 týždňov po oplodnení) a miera prežitia od vytvorenia párov po výber vzorky dospelých rýb.

Tabuľka 1

Prehľad sledovaných parametrov testu MEOGRT (*)

Vývojové štádium	Sledovaný parameter	Generácia
embryo (2 týždne po oplodnení)	liahnutie (% a čas do liahnutia)	F1, F2
mladý jedinec (4 týždne po oplodnení)	miera prežitia	F1
jedinec pred dosiahnutím dospelosti (9 alebo 10 týždňov po oplodnení)	miera prežitia	F1
	rast (dĺžka a hmotnosť)	
	vitelogenín (mRNA alebo bielkovina)	
	sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy)	
	pomer pohlaví z externého hľadiska	
	čas do prvého trenia	
dospelý jedinec (12 – 14 týždňov po oplodnení)	rozmnožovanie (plodivosť a fertilita)	F0, F1
dospelý jedinec (15 týždňov po oplodnení)	miera prežitia	F1
	rast (dĺžka a hmotnosť)	
	Sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy)	
	Histopatológia (gonáda, pečeň, oblička)	

(*) Tieto sledované parametre sa majú štatisticky analyzovať

HARMONOGRAM

51. Test je uvedený v harmonograme testu MEOGRT znázornenom v tabuľke 2. Súčasťou testu MEOGRT sú 4 týždne expozície dospelých jedincov generácie F0 a 15 týždňov expozície jedincov generácie F1, ako aj obdobie expozície druhej generácie (F2) až do vyliahnutia (2 týždne po oplodnení). Súhrn činností v priebehu testu MEOGRT sa uvádza v dodatku 9.

Tabuľka 2

Harmonogram expozície a merania sledovaných parametrov v teste MEOGRT

Harmonogram expozície a sledovaných parametrov v teste MEOGRT																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Testovací	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Označenie vývojového štádia					**embryo**					**larva**					**mladý jedinec**			**jedinec pred dosiahnutím**	**dospelý jedinec**
Sledované parametre																			
plodivosť	F_0														F_1				
plodnosť	F_0														F_1				
liahnutie					F_1														F_2
miera prežitia						F_1						F_1						F_1	
rast				F_0								F_1						F_1	
vitelogenín												F_1							
sekundárne pohlavné znaky												F_1						F_1	
histopatológia																		F_1	
Testovací týždeň	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- V koncepcii pokusu sa používa 7 skupín replikátov
  - 5 pre skupiny s aplikovanou chemikáliou
  - 2 pre kontrolné skupiny (4 v prípade použitia rozpúšťadla)
- Koncepcia v rámci skupiny
  - 12 replikátov na účely reprodukcie, patológie dospelých jedincov a sekundárnych pohlavných znakov (10. až 18 týždeň)
  - 6 replikátov na účely liahnutia, miery prežitia, Vtg a, pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti, sekundárnych pohlavných znakov a rastu (1. až 9. týždeň)

Vtg: vitelogenín

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Štatistická analýza

52. Keďže sa genotypové pohlavie určuje pre všetky testované ryby, údaje je potrebné analyzovať samostatne z hľadiska každého genotypového pohlavia (t. j. samce XY a samice XX). V opačnom prípade sa výrazne zníži štatistická váha analýzy. Pri štatistických analýzach údajov by sa podľa možnosti malo vychádzať z postupov uvedených v dokumente OECD Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: usmernenie k uplatňovaniu (32). V dodatku 10 sa uvádza ďalšie usmernenie k štatistickej analýze.

53. Koncepcia testu a výber štatistických testov by mali poskytovať dostatočnú váhu na detekciu zmien biologického významu v sledovaných parametroch, pri ktorých sa má uvádzať hodnota NOEC (32). Uvedenie príslušných účinných koncentrácií a parametrov môže závisieť od regulačného rámca. Je potrebné identifikovať percentuálnu zmenu v každom sledovanom parametri, ktorú je dôležité zistiť alebo odhadnúť. Koncepcia pokusu by sa mala prispôsobiť tak, aby to bolo možné. Nie je pravdepodobné, že rovnaká percentuálna zmena bude platiť pre všetky sledované parametre, a nie je pravdepodobné ani to, že sa podarí navrhnúť uskutočniteľný pokus, ktorý bude spĺňať tieto kritériá pre všetky sledované parametre, preto je v záujme správneho naplánovania pokusu dôležité zamerať sa na sledované parametre, ktoré sú dôležité pre daný pokus. V dodatku 10 je k dispozícii štatistický vývojový diagram a usmernenie s cieľom pomôcť pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu, ktorý sa použije. Možno použiť aj iné štatistické prístupy za predpokladu, že sú vedecky podložené.

54. V každom súbore replikátov bude potrebné analyzovať variabilitu použitím analýzy rozptylu alebo kontingenčnej tabuľky a na základe tejto analýzy použiť dostatočne vhodné metódy štatistickej analýzy. Na to, aby bolo možné mnohonásobné porovnávanie medzi výsledkami pre jednotlivé koncentrácie a pre kontroly, sa pri spojitých reakciách odporúča postup na základe trendu (napr. Jonckheerov-Terpstrov test trendu). V prípade, že údaje nezodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie, mal by sa použiť Dunnettov alebo Dunnov test (podľa potreby po vhodnej transformácii údajov).

55. Z hľadiska plodivosti sa počty vajíčok zaznamenávajú denne, ale možno ich analyzovať ako celkové počty vajíčok alebo ako opakované meranie. V dodatku 10 sa uvádzajú podrobnosti o spôsobe analýzy tohto sledovaného parametra. Pre histopatologické údaje, ktoré sú v podobe skóre závažnosti, bol vytvorený nový štatistický test RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33).

56. Je potrebné uviesť všetky sledované parametre pozorované v testovaných skupinách s aplikovaním testovanej chemikálie, ktoré sa významne líšia od príslušných kontrol.

Úvahy v súvislosti s analýzou údajov

Používanie úrovní narušenia skupiny s určitou koncentráciou chemikálie

57. Pri rozhodovaní, či replikát alebo celá skupina s určitou koncentráciou chemikálie vykazuje zjavnú toxicitu a mala by sa vylúčiť z analýzy, sa zohľadňuje viacero faktorov. Zjavná toxicita je vymedzená > 4 mortalitami v ktoromkoľvek z replikátov v období od 3 do 9 týždňov po oplodnení, ktoré nemožno vysvetliť technickou chybou. Iné príznaky zjavnej toxicity zahŕňajú krvácanie, abnormálne správanie, abnormálne vzory plávania, anorexiu a akékoľvek iné klinické známky choroby. V prípade subletálnych toxických príznakov môžu byť potrebné kvalitatívne hodnotenia, ktoré by sa vždy mali vykonať porovnaním s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie (len čistá voda). Ak sa zjavná toxicita vyskytuje pri testovaných skupinách s najvyššou dávkou, odporúča sa, aby sa tieto skupiny vylúčili z analýzy.

Kontroly s aplikáciou rozpúšťadla

58. O použití rozpúšťadla by sa malo uvažovať až ako o poslednej možnosti, ak sa zvážili všetky ostatné možnosti aplikovania chemikálie. Ak sa použije rozpúšťadlo, mala by sa zároveň vykonať analýza kontroly s vodou na riedenie. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálnych vplyvov rozpúšťadla. To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolnej skupiny s vodou na riedenie. Medzi najrelevantnejšie sledované parametre na posúdenie v rámci tejto analýzy patria faktory rastu (hmotnosť), keďže na ne môžu mať vplyv celkové toxicity. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s vodou na riedenie a kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, je potrebné na základe najlepšieho odborného úsudku určiť, či nedošlo k narušeniu platnosti testu. Ak sa tieto dve kontroly líšia, testované skupiny vystavené chemikálii sa majú porovnať s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla, pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie s kontrolou s vodou na riedenie. Ak neexistuje štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvomi kontrolnými skupinami, odporúča sa, aby sa testované skupiny vystavené testovanej chemikálii porovnali so zoskupenými kontrolami (kontrolné skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a s vodou na riedenie), pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie buď len s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie, alebo len s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla.

Správa o teste

59. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália: fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— údaje na identifikáciu chemikálie.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organického uhlíka, ak to je vhodné).

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovaný druh:

— vedecký názov, kmeň, ak je dostupný, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.

Podmienky testu:

— fotoperiódy,

— koncepcia testu (napr. veľkosť a materiál komory a objem vody, počet testovacích komôr a replikátov, počet plôdikov na replikát),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),

— metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),

— miera výťažnosti metódy a nominálne testované koncentrácie, kvantifikačný limit, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úrovne zvyškového chlóru (ak boli merané), celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), nerozpustené pevné látky (ak boli merané), salinita v testovacom médiu (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,

— nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky,

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, teplota (meraná denne) a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky:

— dôkaz, že kontroly splnili celkové kritériá validity,

— tieto údaje týkajúce sa kontroly (vrátane kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa použila) a testovaných skupín: liahnutie (liahnivosť a čas do vyliahnutia) v generáciách F1 a F2, miera prežitia po vyliahnutí v generácii F1, rast (dĺžka a telesná hmotnosť) v generácii F1, genotypové pohlavie a pohlavná diferenciácia (napr. sekundárne pohlavné znaky na základe papíl análnej plutvy a gonadálnej histológie) v generácii F1, fenotypové pohlavie v generácii F1, sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy) v generácii F1, mRNA *vtg* (alebo bielkovina VTG) v generácii F1, histopatologické posúdenie (gonáda, pečeň a obličky) v generácii F1 a reprodukcia (plodivosť a fertilita) v generácii F0, F1 (pozri tabuľky 1 a 2),

— prístup uplatnený pri štatistickej analýze (regresná analýza alebo analýza rozptylu) a spracovaní údajov (použité štatistické testy alebo modely),

— koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) pre každú posudzovanú reakciu,

— najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) (pri p = 0,05) pre každú posudzovanú reakciu; v prípade potreby hodnota EC_x pre každú posudzovanú reakciu vrátane intervalov spoľahlivosti (napr. 90 % alebo 95 %) a grafu zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky závislosti veličiny od koncentrácie, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby,

— akákoľvek odchýlka od tejto testovacej metódy a odchýlky od kritérií prijateľnosti a úvahy o možných dôsledkoch v súvislosti s výsledkom testu.

60. V prípade výsledkov merania sledovaných parametrov sa uvádzajú priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky (na základe replikátov aj koncentrácií, ak je to možné).

LITERATÚRA

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457-464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-*Tert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. K dispozícii na adrese: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Kapitola C.15 tejto prílohy, Ryby, krátkodobý test toxicity na embryách a vývojovom štádiu plodového vaku.

(22) Kapitola C.37 tejto prílohy, 21-dňový test na rybách: Krátkodobý skríning estrogénneho a androgénneho pôsobenia a inhibícia aromatázy.

(23) Kapitola C.41 tejto prílohy, Test pohlavného vývinu rýb.

(24) Kapitola C.48 tejto prílohy, Krátkodobý reprodukčný test na rybách.

(25) Kapitola C.47 tejto prílohy, Test toxicity v ranom štádiu vývoja rýb.

(26) Kapitola C.49 tejto prílohy, Test akútnej toxicity na rybích embryách (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie.

Plodivosť = počet vajíčok.

Fertilita = počet životaschopných vajíčok/plodivosť.

Vidlicová dĺžka (FL) označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec stredných lúčov chvostových plutiev a používa sa pri rybách, pri ktorých je ťažké rozoznať, kde sa končí chrbtica (www.fishbase.org).

Liahnivosť = počet plôdikov/počet embryí nasadených do inkubátora.

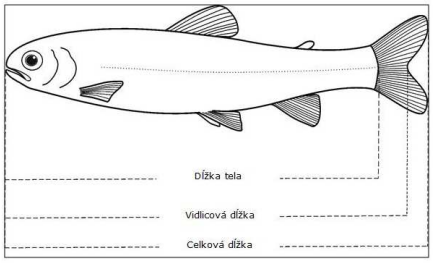
IACUC: Výbor pre inštitucionálnu starostlivosť o zvieratá a ich používanie.

Dĺžka tela (SL) označuje dĺžku ryby meranú od špičky rypáka po zadný koniec posledného stavca alebo po zadný koniec stredu bočnej časti hypurálnej kosti. Jednoducho povedané, v tomto rozmere nie je zahrnutá dĺžka chvostovej plutvy. (www.fishbase.org)

Celková dĺžka (TL) označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec dlhšieho laloka chvostovej plutvy, spravidla meranú s lalokmi stlačenými pozdĺž stredovej čiary. Meria sa dĺžka priamky, teda nie so zakrivením tela (www.fishbase.org).

Obrázok 1

Opis rôznych používaných dĺžok



ECx: (účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného obdobia expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC50 je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzeného obdobia expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

Prietokový test je test s neustálym prietokom testovaných roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Os HPG: os hypotalamus – hypofýza – gonády.

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

Veľkosť násady: vlhká hmotnosť rýb na objem vody.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC). Usmernenie sa uvádza v dodatkoch 5 a 6.

Stredná letálna koncentrácia (LC50): predstavuje koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovaných organizmov počas trvania testu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného obdobia expozície.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

Chovná hustota: počet rýb na objem vody.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

VTG: vitelogenín. Je to fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

WPF: týždne po oplodnení.

Dodatok 2

NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

Látka	Koncentračný limit
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

Dodatok 3

PODMIENKY TESTU MEOGRT

1. Odporúčaný druh	ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*)
2. Typ testu	s nepretržitým prietokom
3. Teplota vody	Nominálna testovacia teplota je 25 °C. Priemerná teplota v každej nádrži počas celého testu je 24 – 26 °C.
4. Kvalita osvetlenia	Fluorescenčné svietidlá (so širokým spektrom a dosahujúce ~150 lúmenov/m^2) (~150 luxov).
5. Fotoperióda	16 hodín svetla a 8 hodín tmy
6. Veľkosť násady	F0: 2 dospelé jedince/replikát; F1: začína sa maximálne s 20 vajíčkami (embryami)/replikát, so znížením na 12 embryí/replikát pri vyliahnutí, potom 2 dospelé jedince (chovný pár s chromozómami XX-XY) 9 – 10 týždňov po oplodnení v reprodukčnej fáze
7. Minimálny využiteľný objem testovacej komory	1,8 l (napr. rozmery testovacej komory: 18 × 9 × 15 cm)
8. Výmeny objemu testovaných roztokov	od minimálne 5 obnovení objemu/deň do 16 obnovení objemu/deň (alebo prietok do 20 ml/min.)
9. Vek testovaných organizmov na začiatku	F0: > 12 týždňov po oplodnení, odporúča sa však neprekročiť 16 týždňov po oplodnení
10. Počet organizmov na replikát	F0: 2 ryby (pár samec – samica); F1: maximálne 20 rýb (vajíčok)/replikát (získané z chovných párov v generáciách F0 a F1).
11. Počet testovaných skupín	5 skupín s aplikovanou testovanou chemikáliou plus príslušné kontroly
12. Počet replikátov na testovanú skupinu	minimálne 6 replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a minimálne 12 na kontrolu a na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa používa (v reprodukčnej fáze generácie F1 sa počet replikátov zdvojnásobuje)
13. Počet organizmov na test	minimálne 84 rýb v generácii F0 a 504 v generácii F1. (Ak sa používa kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, počet rýb v generácii F0 je 108 a v generácii F1 je 648.) Počítaná jednotka predstavuje štádium po eleuteroembryu.
14. Kŕmny režim	Ryby sa kŕmia žiabronôžkou soľnou rodu *Artemia* (24-hodinové naupliá) *ad libitum*, pričom sa táto potrava podľa potreby dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom (príklad harmonogramu kŕmenia na zabezpečenie primeraného rastu a vývoja a podporu spoľahlivej reprodukcie sa nachádza v dodatku 5).
15. Prevzdušňovanie	žiadne, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude blížiť k < 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka
16. Voda na riedenie	čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu

17. Obdobie expozície	primárne 19 týždňov (od generácie F0 po vyliahnutie generácie F2)
18. Biologické sledované parametre (primárne)	liahnivosť (F1 a F2); miera prežitia [F1, od vyliahnutia do 4 týždňov po oplodnení (koniec štádia larvy/začiatok štádia mladej ryby), od 4 do 9 (alebo 10) týždňov po oplodnení (od začiatku štádia mladej ryby po štádium ryby pred dosiahnutím dospelosti) a od 9 do 15 týždňov po oplodnení (štádium pred dosiahnutím dospelosti až po usmrtenie dospelej ryby)]; rast (F1, dĺžka a hmotnosť 9 a 15 týždňov po oplodnení); sekundárne pohlavné znaky (F1, papily análnej plutvy 9 a 15 týždňov po oplodnení); vitelogenín (F1, mRNA *vtg* alebo bielkovina VTG 15 týždňov po oplodnení); fenotypové pohlavie (F1, prostredníctvom histológie gonády 15 týždňov po oplodnení); reprodukcia (F0 a F1, plodivosť a fertilita počas 21 dní); čas do trenia (F1) a histopatológia (F1, gonáda, pečeň a oblička 15 týždňov po oplodnení)
19. Kritériá platnosti testu	Koncentrácia rozpusteného kyslíka ≥ 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka; priemerná teplota vody počas celého testu 24 – 26 °C; úspešná reprodukcia ≥ 65 % samičiek v kontrolách; priemerná denná plodivosť ≥ 20 vajíčok v kontrolách; liahnivosť ≥ 80 % (priemer) v kontrolách (v každej z generácií F1 a F2); miera prežitia po vyliahnutí do 3 týždňov po oplodnení ≥ 80 % (priemer) a od 3 týždňov po oplodnení do usmrtenia v rámci danej generácie ≥ 90 % (priemer) v kontrolách (F1), koncentrácie testovanej chemikálie v roztoku sa majú uspokojivo udržiavať v rozsahu ±20 % priemerných nameraných hodnôt.

Dodatok 4

USMERNENIE K TYPICKÝM HODNOTÁM KONTROL

Je potrebné poznamenať, že hodnoty týchto kontrol vychádzajú z obmedzeného počtu validačných štúdií a môžu podliehať zmenám na základe ďalších skúseností.

Rast

Hmotnosť a dĺžka sa merajú pri všetkých rybách vybratých do vzorky 9 (alebo 10) a 15 týždňov po oplodnení. Pri postupe podľa tohto protokolu sa dosiahne 9 týždňov po oplodnení očakávaná vlhká hmotnosť 85 – 145 mg pri samcoch a 95 – 150 mg pri samiciach. Očakávaná hmotnosť 15 týždňov po oplodnení je 250 – 330 mg pri samcoch a 280 – 350 mg pri samiciach. Hoci pri jednotlivých rybách môžu existovať značné odchýlky od týchto rozsahov, priemerné hmotnosti kontrol, ktoré by boli výrazne mimo týchto rozsahov, najmä ak by boli pod spodnou hranicou, by naznačovali problémy v súvislosti s kŕmením, riadením teploty, kvalitou vody, chorobami alebo kombináciu týchto faktorov.

Liahnutie

Úspešnosť liahnutia v kontrolách je zvyčajne okolo 90 %, nie sú však zriedkavé ani hodnoty dosahujúce len 80 %. Úspešnosť liahnutia nižšia ako 75 % môže naznačovať nedostatočné premiešavanie vyvíjajúcich sa vajíčok alebo nedostatočnú starostlivosť pri manipulácii s vajíčkami, napríklad ak sa včas neodstraňujú mŕtve vajíčka, čo vedie k napadnutiu hubami.

Miera prežitia

Miery prežitia od vyliahnutia do 3 týždňov po oplodnení a po 3 týždňoch po oplodnení sú v prípade kontrol zvyčajne 90 % alebo viac, v skorých štádiách života však ani miery prežitia dosahujúce v prípade kontrol len 80 % nepredstavujú dôvod na znepokojenie. Miery prežitia nižšie ako 80 % by v prípade kontrol boli dôvodom na obavy a môžu naznačovať nedostatočné čistenie akvárií, čo vedie k stratám rýb v larválnom štádiu v dôsledku chorôb alebo udusenia z dôvodu nízkych úrovní rozpusteného kyslíka. K mortalite môže dôjsť aj v dôsledku zranenia počas čistenia nádrže alebo stratou rýb v larválnom štádiu cez odtokový systém nádrže.

Gén vitelogenínu

Zatiaľ čo sa absolútne úrovne génu *vitelogenínu* (*vtg*), vyjadrené ako počet kópií/ng celkovej mRNA, môžu medzi laboratóriami výrazne líšiť v dôsledku použitých postupov alebo prístrojového vybavenia, pomer *vtg* má byť pri kontrolných samiciach približne dvestokrát vyšší v porovnaní s kontrolnými samcami. Nie je nezvyčajné, ak tento pomer dosahuje 1 000- až 2 000-násobok, pomery nižšie ako 200 sú však podozrivé a môžu naznačovať problémy s kontamináciou vzorky alebo problémy s postupom a/alebo použitými reagentmi.

Sekundárne pohlavné znaky

Normálny rozsah sekundárnych pohlavných znakov, ktorý sa vymedzuje ako celkový počet segmentov v plutvových lúčoch papíl análnej plutvy, v prípade samcov predstavuje 40 – 80 segmentov 9 – 10 týždňov po oplodnení. 15 týždňov po oplodnení má byť tento počet v rozsahu 80 – 120 v prípade kontrolných samcov a 0 v prípade kontrolných samíc. Z nevysvetliteľných dôvodov dochádza v zriedkavých prípadoch k tomu, že pri niektorých samcoch nie sú 9 týždňov po oplodnení prítomné papily, ale keďže sa papily vyvinú pri všetkých kontrolných samcoch do 15. týždňa po oplodnení, je to s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené oneskoreným vývojom. Prítomnosť papíl pri kontrolných samiciach naznačuje, že sa v populácii vyskytujú samce s chromozómami XX.

Samce s chromozómami XX

Bežný všeobecný výskyt samcov s chromozómami XX v rámci kultúry je zvyčajne približne 4 % alebo menej pri teplote 25 °C, pričom miera výskytu sa zvyšuje pri vyššej teplote. Je potrebné vykonať kroky s cieľom minimalizovať podiel samcov s chromozómami XX v populácii. Keďže sa zdá, že pri výskyte samcov s chromozómami XX zohráva úlohu genetická zložka a ide preto o dedičný jav, monitorovanie kultivačnej násady a zabezpečenie toho, aby sa samce s chromozómami XX nepoužívali na rozmnožovanie kultivačnej násady, predstavuje účinný prostriedok na zníženie výskytu samcov s chromozómami XX v populácii.

Aktivita trenia

Denne je potrebné monitorovať aktivitu trenia v kontrolných replikátoch pred uskutočnením merania plodivosti. S cieľom potvrdiť aktivitu trenia možno kontrolné páry kvalitatívne posudzovať vizuálne. 12 – 14 týždňov po oplodnení by malo dochádzať k treniu pri väčšine kontrolných párov. Nízky počet párov, ktoré sa trú, v tomto čase naznačuje možné problémy so zdravím, s imunitou alebo dobrými životnými podmienkami rýb.

Plodivosť

Zdravé a správne kŕmené jedince ryžovníčky japonskej vo veku 12 – 14 týždňov po oplodnení sa vo všeobecnosti trú denne, pričom každý deň vyprodukujú 15 až 50 vajíčok. Z hľadiska produkcie vajíčok má 16 z odporúčaných 24 kontrolných chovných párov (> 65 %) naklásť viac ako 20 vajíčok na pár a deň, pričom tento počet môže dosiahnuť až 40 vajíčok za deň. Nižšie než uvedené množstvo môže naznačovať, že páry, ktoré sa trú, sú nezrelé, podvyživené alebo choré.

Fertilita

Percentuálny podiel oplodnených vajíčok v prípade kontrolných párov, ktoré sa trú, je zvyčajne vyšší než 90 %, pričom nie sú nezvyčajné hodnoty dosahujúce 95 % a vyššie. Miery fertility nižšie ako 80 % v prípade kontrolných vajíčok sú podozrivé a môžu naznačovať nezdravé jedince alebo nevhodné kultivačné podmienky.

Dodatok 5

PRÍKLAD HARMONOGRAMU KŔMENIA

Príklad harmonogramu kŕmenia na zabezpečenie primeraného rastu a vývoja a podporu spoľahlivej reprodukcie sa uvádza v tabuľke 1. Odchýlky od tohto harmonogramu kŕmenia môžu byť prijateľné, odporúča sa však ich testovanie s cieľom overiť dosiahnutie prijateľného rastu a reprodukcie. Na to, aby bolo možné dodržať navrhovaný harmonogram kŕmenia, je potrebné pred začiatkom testu stanoviť suchú hmotnosť žiabronôžky soľnej na objem suspenzie žiabronôžky soľnej. Možno to dosiahnuť odvážením vymedzeného objemu suspenzie žiabronôžky soľnej, ktorá sa nechala 24 hodín schnúť pri teplote 60 °C na vopred odvážených miskách. Na zohľadnenie hmotností solí v suspenzii sa identický objem rovnakého soľného roztoku, aký sa použil v suspenzii, takisto vysuší, odváži a odpočíta od hmotnosti vysušenej suspenzie žiabronôžky soľnej. Alternatívne možno žiabronôžku soľnú prefiltrovať a prepláchnuť destilovanou vodou pred sušením, vďaka čomu nebude potrebné merať hmotnosť zvyškového obsahu solí. Tieto informácie slúžia na prepočítanie údajov v tabuľke zo suchej hmotnosti žiabronôžky soľnej na objem suspenzie žiabronôžky soľnej, ktorá predstavuje kŕmnu dávku na jednu rybu. Okrem toho sa odporúča, aby sa týždenne vážili alikvoty suspenzie žiabronôžky soľnej s cieľom overiť suchú hmotnosť žiabronôžky soľnej podávanej ako krmivo.

Tabuľka 1

Príklad harmonogramu kŕmenia

Čas (po vyliahnutí)	Žiabronôžka soľná (suchá hmotnosť v mg/ryba/deň)
1. deň	0,5
2. deň	0,5
3. deň	0,6
4. deň	0,7
5. deň	0,8
6. deň	1,0
7. deň	1,3
8. deň	1,7
9. deň	2,2
10. deň	2,8
11. deň	3,5
12. deň	4,2
13. deň	4,5

Čas (po vyliahnutí)	Žiabronôžka soľná (suchá hmotnosť v mg/ryba/deň)
14. deň	4,8
15. deň	5,2
16. – 21. deň	5,6
4. týždeň	7,7
5. týždeň	9,0
6. týždeň	11,0
7. týždeň	13,5
8. týždeň – usmrtenie	22,5

Dodatok 6

PRÍKLADY KOMORY NA INKUBÁCIU VAJÍČOK

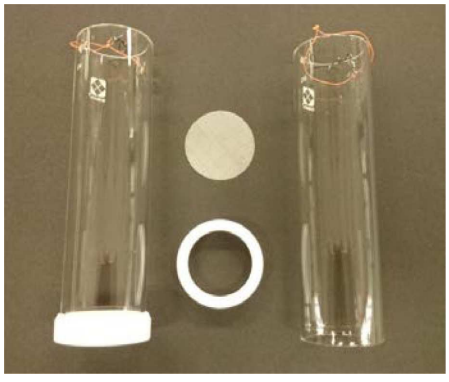
Príklad A





Tento inkubátor sa skladá z rozdelenej sklenej odstredivkovej skúmavky pripojenej pomocou objímky z nehrdzavejúcej ocele a upevnenej na mieste pomocou vrchného skrutkovacieho odstredivkového uzáveru. Cez uzáver prechádza tenká trubica zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele, ktorej koniec sa nachádza v blízkosti zaobleného dna a ktorá slúži na jemné vpúšťanie vzduchu, aby dochádzalo k nadnášaniu vajíčok a zníženiu prenosu saprofytických hubových infekcií medzi vajíčkami, pričom sa takisto uľahčuje chemická výmena medzi inkubátorom a chovnou nádržou.

Príklad B





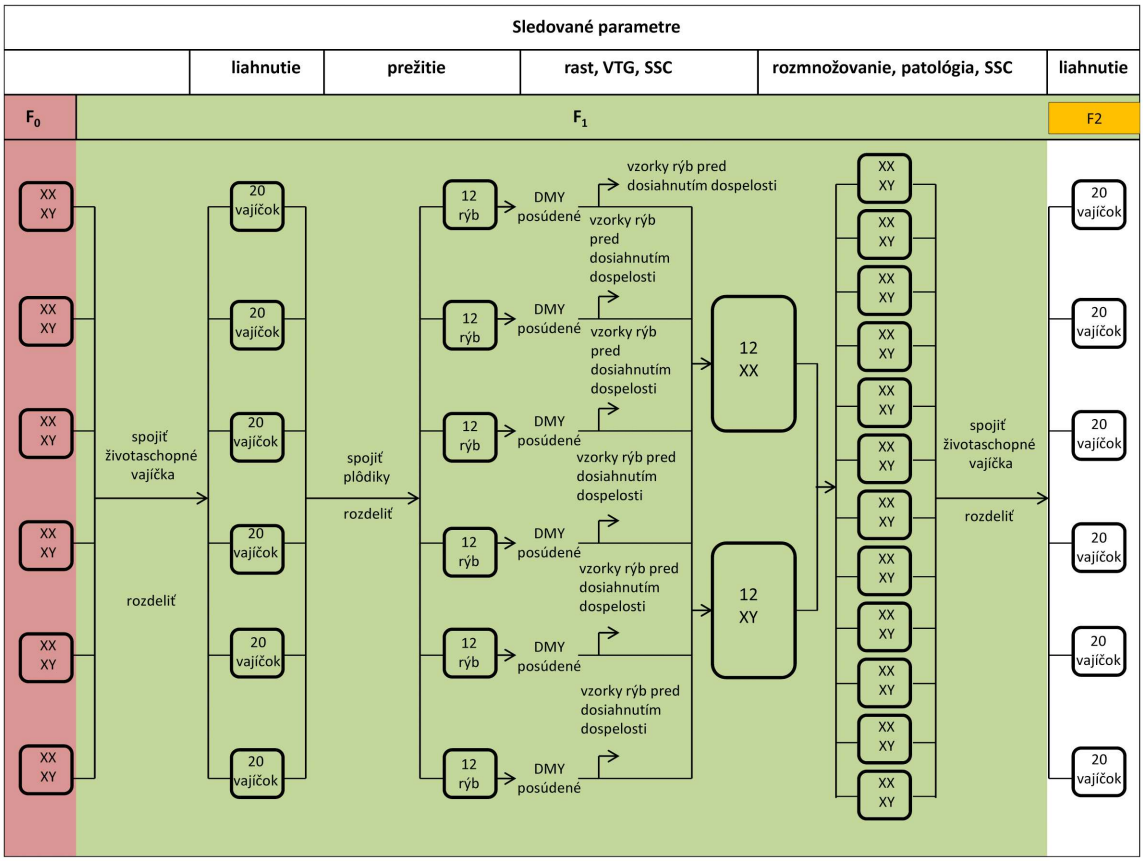
Tento inkubátor sa skladá zo skleného valca (s priemerom 5 cm a dĺžkou 10 cm) a mriežky z nehrdzavejúceho drôtu (rozmery mriežky: φ 0,25 a 32), ktorá je upevnená k spodnej časti valca pomocou krúžku z PTFE. Tieto inkubátory sú zavesené v nádržiach na zdvíhacej tyči a vertikálne sa pretrepávajú (s amplitúdou približne 5 cm) v cykle vhodnom pre vajíčka ryžovníčky japonskej (približne každé 4 sekundy).

Dodatok 7

SCHEMATICKÝ DIAGRAM ZOSKUPOVANIA A NASADZOVANIA REPLIKÁTOV POČAS TESTOVACEJ METÓDY MEOGRT

Obrázok 1

Zoskupovanie a nasadzovanie replikátov počas testu MEOGRT. Na obrázku je znázornená jedna skupina s aplikovanou chemikáliou alebo ½ kontroly. V dôsledku zoskupovania sa nezachováva identita replikátu počas celého testu. Výraz „vajíčka“ označuje životaschopné, oplodnené vajíčka (ekvivalentné embryám).



Skupiny s aplikovanou chemikáliou a replikácia

V rámci tejto testovacej metódy sa odporúča päť skupín s aplikovanou testovanou chemikáliou pomocou materiálov technickej akostnej triedy a negatívna kontrola. Počet replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou nezostáva počas testu MEOGRT konštantný a počet replikátov v kontrolnej skupine predstavuje dvojnásobok počtu použitého v danej skupine s aplikovanou testovanou chemikáliou. V generácii F0 sa v každej skupine s aplikovanou testovanou chemikáliou nachádza šesť replikátov, zatiaľ čo v skupine negatívnej kontroly sa nachádza 12 replikátov. Dôrazne sa odporúča nepoužívať rozpúšťadlá a v prípade, že sa použijú, je potrebné v správe o teste MEOGRT uviesť odôvodnenie použitia a výberu rozpúšťadla. Ak sa použije rozpúšťadlo, sú ďalej potrebné dva druhy kontrol: a) kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a b) negatívna kontrola. Obe tieto kontrolné skupiny majú obsahovať úplnú množinu replikátov vo všetkých bodoch v rámci harmonogramu testu MEOGRT. Počas celého vývoja testovaných organizmov v generácii F1 (a v generácii F2 do vyliahnutia) zostáva uvedená štruktúra replikátov rovnaká. V dospelom štádiu, keď sa vytvárajú chovné páry generácie F1, sa počet replikátov rozmnožujúcich sa párov na testovanú skupinu optimálne zdvojnásobuje, preto existuje až 12 replikovaných párov v každej skupine s aplikovanou chemikáliou a 24 replikovaných párov v kontrolnej skupine (a v prípade potreby ďalších 24 replikovaných párov v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla). Stanovenie liahnutia z embryí vyprodukovaných pri trení párov generácie F1 sa uskutočňuje v rovnakej štruktúre replikátov ako v prípade embryí vyprodukovaných pri trení párov generácie F0, čo predstavuje na začiatku šesť replikátov na skupinu s aplikovanou testovanou chemikáliou a 12 replikátov v kontrolných skupinách.

Dodatok 8

URČENIE POČTU PAPÍL ANÁLNEJ PLUTVY

Hlavné materiály a reagenty

— stereoskopický mikroskop (s pripojenou voliteľnou kamerou),

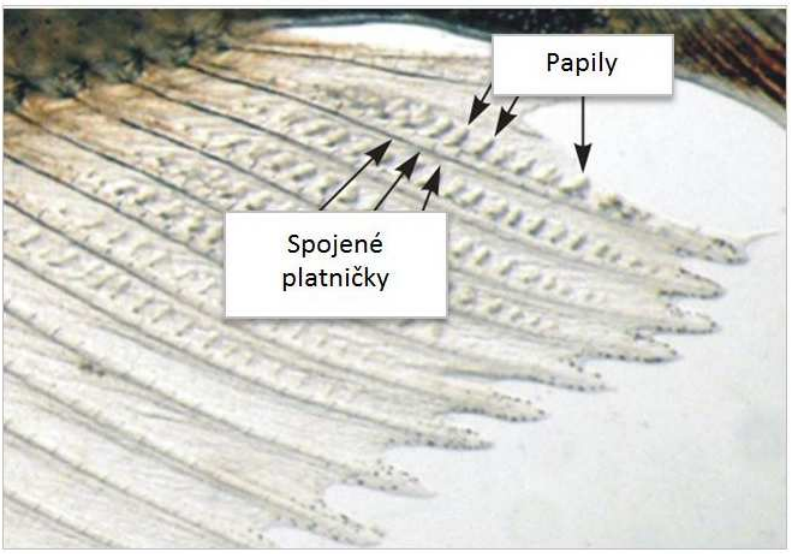
— fixačný prostriedok [napr. Davidsonov (Bouinov sa neodporúča)], ak sa počet nestanovuje na základe obrazového záznamu.

Postupy

Po pitve sa má vytvoriť obrazový záznam análnej plutvy, aby bolo možné ľahko stanoviť počet papíl análnej plutvy. Hoci je odporúčanou metódou vytvorenie obrazového záznamu, análnu plutvu možno zafixovať v Davidsonovom alebo inom vhodnom fixačnom prostriedku približne počas 1 minúty. Je dôležité, aby bola análna plutva počas fixácie umiestnená naplocho, čím sa uľahčí stanovenie počtu papíl. Telo ryby s análnou plutvou možno uložiť v Davidsonovom alebo inom vhodnom fixačnom prostriedku až do analýzy. Spočítajte spojené platničky (**obrázok 1**) s papilami, ktoré prečnievajú zo zadného okraja spojenej platničky.

Obrázok 1

Papily análnej plutvy



Dodatok 9

PODROBNÝ HARMONOGRAM TESTU MEOGRT

1. – 3. testovací týždeň (F0)

Pri rybách generácie F0, ktoré sa trú a ktoré spĺňajú kritériá výberu (pozri odseky 16 – 20), sa uskutoční trojtýždňová expozícia s cieľom vystaviť gaméty a gonadálne tkanivá testovanej chemikálii. V každej nádrži replikátu je umiestnený jeden chovný pár rýb (chovný pár so samicou s chromozómami XX a samcom s chromozómami XY). Vajíčka vyprodukované pri trení sa zberajú, stanovuje sa ich počet a posudzuje sa fertilita počas 21 za sebou nasledujúcich dní od 1. testovacieho dňa.

4. testovací týždeň (F0 a F1)

Uprednostňuje sa zber oplodnených a životaschopných vajíčok (embryí) v jeden deň. Ak však počet embryí nie je dostatočný, môžu sa zbierať počas dvoch dní. Ak zber prebieha počas dvoch dní, všetky embryá v rámci daných testovaných skupín, ktoré sa zozbierali v prvý deň, sa zlúčia s embryami zozbieranými na druhý deň. Potom sa všetky zlúčené embryá pre každú testovanú skupinu náhodne rozdelia do jednotlivých inkubátorov replikátov v počte 20 embryí na inkubátor. Denne sa kontroluje a zaznamenáva mortalita oplodnených vajíčok (embryí). Mŕtve vajíčka sa z inkubátorov odstránia (smrť oplodnených vajíčok môže predovšetkým v ranných štádiách naznačovať výrazná strata priehľadnosti a zmena v zafarbení spôsobená koaguláciou a/alebo vyzrážaním bielkovín, čo vedie k bielemu nepriehľadnému vzhľadu; OECD 2010).

Poznámka: Ak sa pri jednej testovanej skupine vyžaduje druhý deň zberu, je tento postup potrebné uskutočniť vo všetkých testovaných skupinách (vrátane kontrol). Ak po druhom dni zberu nie je k dispozícii dostatočný počet embryí v rámci testovanej skupiny na nasadenie 20 embryí na inkubátor, znížte počet embryí nasadených v rámci tejto konkrétnej testovanej skupiny na 15 embryí na inkubátor. Ak nie je k dispozícii dostatočný počet embryí na nasadenie 15 embryí na inkubátor, znížte počet inkubátorov replikátov tak, aby bolo možné nasadiť do každého inkubátora 15 embryí. Navyše je možné v generácii F0 pridať viac chovných párov na testovanú skupinu a kontroly s cieľom vyprodukovať viac vajíčok, aby sa dosiahol odporúčaný počet 20 na replikát.

Na 24. testovací deň sa chovné páry generácie F0 humánnym spôsobom usmrtia a zaznamená sa hmotnosť a dĺžka. V prípade potreby možno chovné páry generácie F0 chovať ešte ďalšie 1 – 2 dni, aby sa znovu začala generácia F1.

5. – 6. testovací týždeň (F1)

Jeden až dva dni pred predpokladaným začiatkom liahnutia zastavte alebo obmedzte premiešavanie vajíčok počas inkubácie, aby sa urýchlilo liahnutie. Ako sa embryá každý deň liahnu, plôdiky sa zoskupia podľa testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do jednotlivých nádrží replikátov s larvami v rámci konkrétnej testovanej skupiny tak, aby v žiadnej nebolo viac ako 12 plôdikov. Uskutočňuje sa to náhodným výberom plôdikov, ktoré sa bez rozlišovania po jednom umiestňujú do za sebou nasledujúcich replikátov, pričom sa postupuje podľa poradia replikátov konkrétnej testovanej skupiny, až kým sa vo všetkých replikátoch v rámci príslušnej testovanej skupiny nenachádza 12 plôdikov. Ak nie je k dispozícii dostatok plôdikov na naplnenie všetkých replikátov, zabezpečte, aby sa v čo najväčšom počte replikátov nachádzalo 12 plôdikov, aby bolo možné začať s fázou F1.

Vajíčka, ktoré sa nevyliahli za dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole, sa považujú za neživotaschopné a vyradia sa. Zaznamená sa počet plôdikov a v každom replikáte sa vypočíta úspešnosť liahnutia (liahnivosť).

7. – 11. testovací týždeň (F1)

Denne sa vo všetkých replikátoch kontroluje a zaznamenáva prežitie rýb v larválnom štádiu. Na 43. testovací deň sa v každom replikáte zaznamená počet rýb, ktoré prežili, ako aj pôvodný počet plôdikov umiestnených do replikátu (nominálne dvanásť). Možno tak vypočítať percentuálny podiel prežitia od vyliahnutia po štádium pred dosiahnutím dospelosti.

12. testovací týždeň (F1)

Na 78. – 85. testovací deň sa z chvostovej plutvy každej ryby odoberie malá vzorka na určenie genotypového pohlavia jedinca (t. j. odobratie odrezkov plutiev) v prípade všetkých rýb. Tieto informácie sa použijú pri vytváraní chovných párov.

Do troch dní po stanovení genotypového pohlavia každej ryby sa náhodne vytvorí 12 chovných párov na testovanú skupinu a 24 párov na kontrolu. Dve ryby s chromozómami XX a XY z každého replikátu sa náhodne vyberú a zoskupia podľa pohlavia a potom sa z nich na základe náhodného výberu vytvorí chovný pár (t. j. pár s chromozómami XX – XY). Vytvorí sa najmenej 12 replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a najmenej 24 replikátov pre kontrolu, pričom v každom replikáte sa nachádza jeden chovný pár. Ak v replikáte nie sú na účely zoskupenia k dispozícii dve ryby s chromozómami XX alebo dve ryby s chromozómami XY, ryby s vhodným pohlavným genotypom je potrebné získať z iných replikátov v rámci danej testovanej skupiny.

Zvyšné ryby (najviac 8 rýb na replikát) sa humánne usmrtia a použijú sa ako vzorky na meranie rôznych sledovaných parametrov pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti. Údaje o géne *dmy* (XX alebo XY) pre všetky vzorky rýb pred dosiahnutím dospelosti sa uchovávajú, aby bolo možné priradiť údaje o všetkých sledovaných parametroch ku genetickému pohlaviu jednotlivých rýb.

13. – 14. testovací týždeň (F1)

Expozícia pokračuje v čase, keď sa chovné páry zložené z rýb pred dosiahnutím dospelosti vyvíjajú na dospelé ryby. Na 98. testovací deň (t. j. deň pred začiatkom zberu vajíčok) sa odstránia vajíčka, ktoré sa nachádzajú v akváriách aj na samiciach.

15. – 17. testovací týždeň (F1)

Vajíčka vyprodukované pri trení sa v každom replikáte zberajú denne počas 21 za sebou nasledujúcich dní a posudzujú sa z hľadiska plodivosti a fertility.

18. testovací týždeň (opakovanie 4. testovacieho týždňa) (F1 a F2)

Na 120. testovací deň ráno sa v každej nádrži replikátu uskutoční zber vajíčok. Odobraté vajíčka sa posúdia a oplodnené vajíčka (s odstránenými vláknami) od každého z chovných párov sa zoskupia podľa testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do komôr na inkubáciu vajíčok tak, aby sa v každom inkubátore nachádzalo 20 oplodnených vajíčok. Inkubátory možno umiestniť do samostatných inkubačných nádrží pripravených pre jednotlivé testované skupiny alebo do nádrže replikátu, v ktorej sa po vyliahnutí budú nachádzať vyliahnuté larvy. Uprednostňuje sa zber embryí v jeden deň, ak však počet embryí nie je dostatočný, môžu sa zbierať počas dvoch dní. Ak zber prebieha počas dvoch dní, všetky embryá v rámci daných testovaných skupín, ktoré sa zozbierali v prvý deň, sa zlúčia s embryami zozbieranými na druhý deň. Potom sa všetky zlúčené embryá pre každú testovanú skupinu náhodne rozdelia do jednotlivých inkubátorov replikátov v počte 20 embryí na inkubátor. Poznámka: Ak sa pri jednej testovanej skupine vyžaduje druhý deň zberu, je tento postup potrebné uskutočniť vo všetkých testovaných skupinách (vrátane kontrol). Ak po druhom dni zberu nie je k dispozícii dostatočný počet embryí v rámci testovanej skupiny na nasadenie 20 embryí na inkubátor, znížte počet embryí nasadených v rámci tejto konkrétnej testovanej skupiny na 15 embryí na inkubátor. Ak nie je k dispozícii dostatočný počet embryí na nasadenie 15 embryí na inkubátor, znížte počet inkubátorov replikátov tak, aby bolo možné nasadiť do každého inkubátora 15 embryí.

Na 121. testovací deň (alebo na 122. testovací deň, aby sa zabezpečil správny začiatok generácie F2) sa chovné páry generácie F1 humánnym spôsobom usmrtia a analyzujú sa z hľadiska sledovaných parametrov dospelých rýb. V prípade potreby možno chovné páry generácie F1 chovať ešte ďalšie 1 – 2 dni, aby sa znovu začala generácia F2.

19. – 20. testovací týždeň (F2)

Jeden až dva dni pred predpokladaným začiatkom liahnutia zastavte alebo obmedzte premiešavanie vajíčok počas inkubácie, aby sa urýchlilo liahnutie. Ak sa test ukončí do dokončenia liahnutia v generácii F2, plôdiky sa každý deň zaznamenajú a vyradia. (Embryá, ktoré sa nevyliahli počas predĺženého inkubačného času, ktorý je vymedzený ako dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole, sa považujú za neživotaschopné.)

Dodatok 10

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Typy biologických údajov získaných v teste MEOGRT nie sú jedinečné pre tento test a s výnimkou údajov týkajúcich sa patológie bolo vytvorených množstvo vhodných štatistických metodík na primerané analyzovanie podobných údajov v závislosti od ich charakteristík, a to vrátane normality, homogenity rozptylu, toho, či je koncepcia štúdie vhodná na testovanie hypotéz alebo regresnú analýzy, na parametrické alebo neparametrické testy atď. Všeobecnou zásadou je, že pri navrhovaných štatistických analýzach sa vychádza z odporúčaní OECD v súvislosti s údajmi o ekotoxicite (OECD 2006). Na obrázku 2 sa nachádza vývojový diagram na prijímanie rozhodnutí v súvislosti s analýzou údajov testu MEOGRT.

Predpokladá sa, že pri množinách údajov sa budú najčastejšie vyskytovať monotónne reakcie. Okrem toho je potrebné zvážiť rozdiel pri použití jednostranného alebo dvojstranného štatistického testu. Pokiaľ neexistuje biologické odôvodnenie, na základe ktorého by sa jednostranný test považoval za nevhodný, odporúča sa použitie jednostranných testov. Hoci sa v nasledujúcej časti odporúčajú určité štatistické testy, ak sa vyvinú vhodnejšie a/alebo výkonnejšie štatistické metódy, ktoré možno použiť pri konkrétnych údajoch získaných v teste MEOGRT, majú sa použiť tieto štatistické testy, aby sa využili ich výhody.

Údaje z testu MEOGRT sa analyzujú samostatne pre každé genotypové pohlavie. Na analýzu údajov týkajúcich sa rýb so zmeneným pohlavím (samce s chromozómami XX alebo samice s chromozómami XY) sú k dispozícii dve stratégie. 1. Všetky údaje týkajúce sa rýb so zmeneným pohlavím v celom teste sa cenzurujú s výnimkou situácie, keď zmena pohlavia prevláda v jednotlivých replikátoch. 2. Údaje týkajúce sa všetkých rýb so zmeneným pohlavím sa ponechajú v množine údajov a analyzujú sa na základe genotypu.

Histopatologické údaje

Histopatologické údaje sa uvádzajú v podobe skóre závažnosti, ktoré sa hodnotia pomocou novovytvoreného štatistického postupu RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (Green a kol., 2014). Pomocou *Raovej-Scottovej* úpravy sa zachovávajú informácie o replikácii v rámci testu a v postupe s označením *by Slices* je začlenené biologické očakávanie, že skóre závažnosti majú tendenciu zvyšovať sa so zvyšujúcimi sa koncentráciami testovanej chemikálie. Pri jednotlivých diagnostických postupoch sa na základe výstupu RSCABS určuje, pri ktorých skupinách s aplikovanou chemikáliou dochádza v porovnaní s kontrolami k vyššej prevalencii patologických javov, ako aj súvisiaca úroveň závažnosti.

Údaje týkajúce sa plodivosti

Súčasťou analýz údajov týkajúcich sa plodivosti je Jonckheerov-Terpstrov test trendu alebo Williamsov test s cieľom určiť účinky aplikovania testovanej chemikálie, a to za predpokladu, že údaje zodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie. V prípade step-down testu trendu sa všetky porovnávania uskutočňujú na úrovni významnosti 0,05 a neuplatňuje sa úprava na základe počtu porovnaní. Očakáva sa, že údaje zodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie, možno to však overiť vizuálnou kontrolou údajov alebo stanovením lineárnych a kvadratických kontrastov stredných hodnôt aplikovania testovanej chemikálie po transformácii údajov podľa poradia. Ak kvadratický kontrast nie je významný a lineárny kontrast je nevýznamný, uskutoční sa testovanie trendov. V opačnom prípade sa použije Dunnettov test s cieľom určiť účinky aplikovania testovanej chemikálie, ak majú údaje normálne rozdelenie s homogénnymi rozptylmi. Ak uvedené požiadavky nie sú splnené, použije sa Dunnov test s Bonferonniho-Holmovou úpravou. Všetky uvedené testy sa uskutočňujú nezávisle od akéhokoľvek celkového F-testu alebo Kruskalovho-Wallisovho testu. Podrobnejšie údaje sa uvádzajú v dokumente OECD 2006.

Ak je to štatisticky odôvodnené, možno použiť alternatívne metódy, napr. generalizovaný lineárny model so zohľadnením chýb v Poissonovom rozdelení v súvislosti s počtami vajíčok (bez transformácie) (Cameron a Trividi, 2013). V prípade použitia alternatívneho prístupu sa odporúča využiť poradenstvo v oblasti štatistiky.

Denný počet vajíčok v rámci jednej generácie

Model ANOVA vychádza z parametrov Y=čas*čas+ aplikovanie testovanej chemikálie + * aplikovanie testovanej chemikálie + čas*aplikovanie testovanej chemikálie + *čas* aplikovanie testovanej chemikálie so zahrnutím náhodných účinkov replikátu (generácia* aplikovanie testovanej chemikálie), čo umožňuje zohľadniť nerovnaké zložky rozptylu oboch typov medzi generáciami. Parametrom čas sa tu označuje frekvencia počítania vajíčok (napr. deň alebo týždeň). Ide o analýzu na základe opakovaných meraní s koreláciami medzi pozorovaniami na rovnakých replikátoch, pričom sa zohľadňuje povaha údajov získaných z opakovaných meraní.

Hlavné účinky aplikovania testovanej chemikálie sa testujú pomocou Dunnettovho (alebo Dunnettovho-Hsuovho) testu, ktorý zahŕňa úpravu na základe počtu porovnaní. Potrebné sú úpravy na základe hlavného účinku generácie a času, keďže pre tieto dva faktory neexistuje „kontrolná“ úroveň a každá dvojica úrovní predstavuje porovnanie, ktoré je možným predmetom záujmu. Pokiaľ ide o tieto dva hlavné účinky, ak je F-test pri hlavnom účinku významný na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy testovať párové porovnania medzi úrovňami daného faktora na úrovni 0,05.

Súčasťou modelu sú dvojfaktorové a trojfaktorové interakcie, keďže hlavný účinok, napríklad v prípade času, nemusí byť významný, hoci má čas významný vplyv na výsledky. Ak je preto dvojfaktorová a trojfaktorová interakcia zahŕňajúca čas významná na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy akceptovať porovnania úrovní času na úrovni významnosti 0,05.

Ďalej nasledujú F-testy významnosti aplikovania testovanej chemikálie v rámci času, tzv. rezy v tabuľke ANOVA. Ak je napríklad rez pre aplikovanie testovanej chemikálie v rámci generácie F1 a času 12 významný na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy akceptovať párové porovnania aplikovania testovanej chemikálie v rámci generácie F1 a času 12 na úrovni 0,05. Podobné postupy sa vzťahujú na testy týkajúce sa času v rámci generácie F1 a aplikovania testovanej chemikálie a na testy týkajúce sa generácie v rámci času a aplikovania testovanej chemikálie.

A nakoniec, v prípade porovnaní, ktoré nepatria ani do jednej z vyššie uvedených kategórií, je potrebné porovnania upraviť pomocou Bonferroniho-Holmovej úpravy podľa hodnôt p. Ďalšie informácie o analýzach takýchto modelov možno nájsť v zdrojoch Hocking (1985) a Hochberg a Tamhane (1987).

Alternatívne sa nespracované údaje zaznamenajú a uvedú v správe o štúdii ako plodivosť (počet vajíčok) na replikát za každý deň. Vypočíta sa stredná hodnota nespracovaných údajov replikátu a použije sa transformácia druhej odmocniny. Uskutoční sa jednosmerná analýza ANOVA na transformovaných stredných hodnotách replikátu a následne sa vypočítajú kontrasty Dunnettovou metódou. Užitočná môže byť aj vizuálna kontrola údajov o plodivosti pre každú testovanú skupinu a/alebo replikát pomocou bodového grafu, v ktorom sa zobrazujú údaje v priebehu času. Umožňuje to neformálne posúdenie potenciálnych účinkov v priebehu času.

Všetky ostatné biologické údaje

Pri štatistických analýzach sa vychádza z východiskového predpokladu, že pri správnom výbere dávky budú údaje monotónne. Údaje sa tak považujú za monotónne a formálne sa vyhodnocuje ich monotónnosť pomocou lineárnych a kvadratických kontrastov. Ak sú údaje monotónne, odporúča sa na mediány replikátu použiť Jonckheerov-Terpstrov test trendu (podľa OECD 2006). Ak je kvadratický kontrast významný a lineárny kontrast nie je významný, údaje sa považujú za nemonotónne.

Ak sú údaje nemonotónne, najmä z dôvodu nižšej reakcie v jednej alebo dvoch testovaných skupinách s najvyššou dávkou, je potrebné zvážiť cenzurovanie množiny údajov tak, aby sa analýza uskutočnila bez uvedených testovaných skupín. Toto rozhodnutie bude potrebné prijať na základe odborného úsudku a všetkých dostupných údajov, obzvlášť údajov, ktoré naznačujú zjavnú toxicitu pri uvedených úrovniach aplikovania testovanej chemikálie.

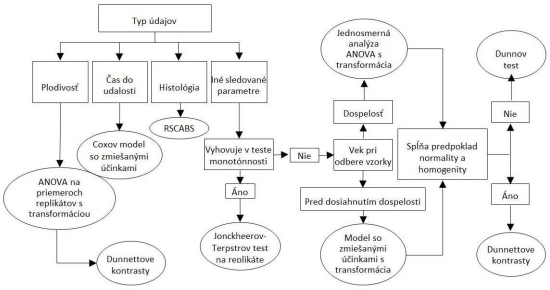
V prípade hmotnosti a dĺžky sa neodporúčajú transformácie, hoci príležitostne môžu byť nevyhnutné. V prípade údajov o vitelogeníne sa však odporúča logaritmická transformácia, v prípade údajov o sekundárnych pohlavných znakoch (papily análnej plutvy) sa odporúča transformácia druhej odmocniny a v prípade údajov o proporciálnom liahnutí, percentuálnej miere prežitia, pomere pohlaví a percentuálnej hodnote oplodnených vajíčok sa odporúča arkussínusová transformácia druhej odmocniny. Čas do vyliahnutia a čas do prvého trenia sa považujú za údaje vyjadrujúce čas do udalosti, pričom na údaje predstavujúce jednotlivé embryá, ktoré sa vo vymedzenom období nevyliahnu, alebo replikáty, pri ktorých nikdy nenastane trenie, sa uplatní cenzurovanie sprava. Čas do vyliahnutia sa vypočíta z mediánu dňa liahnutia jednotlivých replikátov. Tieto sledované parametre sa analyzujú pomocou Coxovho modelu proporcionálnych rizík so zmiešanými účinkami.

V biologických údajoch pochádzajúcich zo vzoriek dospelých jedincov sa nachádza jedno meranie na replikát, t. j. zahŕňajú jednu rybu s chromozómami XX a jednu rybu s chromozómami XY na akváriu s replikátom. Odporúča sa preto, aby sa na stredných hodnotách replikátu uskutočnila jednosmerná analýza ANOVA. Ak sú splnené predpoklady analýzy ANOVA (normalita a homogenita rozptylu na základe posúdenia na rezíduách z analýzy ANOVA pomocou Shapirovho-Wilkovho testu, resp. Levenovho testu), na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa majú použiť kontrasty stanovené Dunnettovou metódou. Naopak, ak nie sú splnené predpoklady analýzy ANOVA, na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa má použiť Dunnov test. Podobný postup sa odporúča v prípade údajov, ktoré sú v percentuálnej podobe (fertilita, liahnutie a prežitie).

Biologické údaje zo vzoriek jedincov pred dosiahnutím dospelosti obsahujú 1 až 8 meraní na replikát, čo znamená, že môžu zahŕňať premenlivé počty jedincov započítaných do strednej hodnoty replikátu za každé genotypové pohlavie. Preto sa odporúča použitie modelu ANOVA so zmiešanými účinkami a následne použitie kontrastov stanovených Dunnettovou metódou, ak sú splnené predpoklady normality a homogenity rozptylu (na rezíduách modelu ANOVA so zmiešanými účinkami). Ak nie sú splnené, na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa má použiť Dunnov test.

Obrázok 2

Vývojový diagram odporúčaných štatistických postupov na analýzu údajov testu MEOGRT



LITERATÚRA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 SKÚŠKA VÝVOJA A RASTU OBOJŽIVELNÍKOV V LARVÁLNOM ŠTÁDIU (LAGDA)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 241 (2015). Potreba vytvorenia a validácie skúšky, pomocou ktorej možno identifikovať a charakterizovať nežiaduce dôsledky expozície obojživelníkov toxickým látkam, vychádza z obáv, že úrovne chemikálií v životnom prostredí môžu spôsobovať nežiaduce účinky v prípade ľudí aj voľne žijúcich živočíchov. V usmernení OECD na vykonávanie testov ku skúške vývoja a rastu obojživelníkov v larválnom štádiu (LAGDA) sa opisuje test toxicity v prípade druhu obojživelníka, pri ktorom sa posudzuje rast a vývoj od oplodnenia a počas raného obdobia juvenilného jedinca. V skúške (zvyčajne v trvaní 16 týždňov) sa posudzuje raný vývoj, metamorfóza, prežitie, rast a čiastočné reprodukčné dozrievanie. Pomocou skúšky možno merať aj viacero ďalších sledovaných parametrov umožňujúcich diagnostické hodnotenie chemikálií, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC), alebo iných typov vývojovo a reprodukčne toxických látok. Postup opísaný v tejto testovacej metóde je odvodený z validačných činností s použitím africkej pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*), ktoré vykonala Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (US EPA), s prispením podporných činností vykonaných v Japonsku (1). Hoci v oblasti rastu a vývoja možno testovaciemu protokolu, ktorého dôležitou zložkou je schopnosť stanoviť genetické pohlavie, prispôsobiť iné druhy obojživelníkov, špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto testovacej metóde, sa vzťahujú len na druh *Xenopus laevis*.

2. Skúška LAGDA slúži ako test vyššieho stupňa v prípade obojživelníkov na získanie komplexnejších informácií o nežiaducich účinkoch, pokiaľ ide o závislosť reakcie od koncentrácie, ktoré sú vhodné na použitie na identifikáciu a charakterizáciu nebezpečnosti a na posudzovanie ekologického rizika. Skúška zodpovedá úrovni 4 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov, v rámci ktorej sa pomocou skúšok *in vivo* získavajú aj údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému (2). V rámci všeobecnej koncepcie pokusu sa uskutoční expozícia embryí *X. laevis* v Nieuwkoopovom a Faberovom (NF) štádiu 8 – 10 (3) najmenej štyrom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie (všeobecne s odstupmi nie menšími ako polovica logaritmického intervalu) a kontrolám, a to do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole, s jednou predbežnou podvzorkou v NF štádiu 62 [(≤ 45 dní po oplodnení; zvyčajne približne 45 dní (dni po oplodnení)]. Pri každej testovanej koncentrácii existujú štyri replikáty, pričom pri kontrole sa používa osem replikátov. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície (v predbežnej podvzorke a konečnej vzorke pri ukončení testu), patria tie, ktoré signalizujú celkovú toxicitu: mortalitu, abnormálne správanie a parametre stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť), ako aj sledované parametre určené na charakterizovanie špecifických toxických spôsobov účinku na endokrinný systém s pôsobením na fyziologické procesy sprostredkované estrogénom, androgénom alebo štítnou žľazou. V rámci metódy sa kladie hlavný dôraz na potenciálne účinky relevantné z hľadiska populácie (konkrétne škodlivé vplyvy na prežitie, vývoj, rast a reprodukčný vývoj) pri výpočte hodnôt koncentrácie, pri ktorej sa nepozorujú účinky, (NOEC) alebo účinnej koncentrácie, ktorá spôsobuje × % zmenu (ECx) v meranom sledovanom parametri. Je však potrebné poznamenať že prístupy s využitím účinnej koncentrácie ECx sú zriedka vhodné pre rozsiahle štúdie tohto typu, v ktorých môže byť nepraktický rastúci počet testovaných koncentrácií, ktoré majú slúžiť na určenie požadovanej hodnoty ECx. Takisto je potrebné poznamenať, že sa táto metóda nevzťahuje na samotnú reprodukčnú fázu. Vymedzenie pojmov použitých v tejto testovacej metóde sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Vzhľadom na obmedzený počet testovaných chemikálií a laboratórií, ktoré sa zúčastnili na validácii tejto pomerne zložitej štúdie, pričom obzvlášť medzilaboratórna reprodukovateľnosť nebola doposiaľ zdokumentovaná na základe údajov z pokusov, sa predpokladá, že sa usmernenie OECD na vykonávanie testov 241 prehodnotí a v prípade potreby sa zreviduje na základe získaných skúseností, keď bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na posúdenie vplyvu novej koncepcie štúdie. LAGDA predstavuje dôležitú skúšku na posúdenie látok, ktoré potenciálne prispievajú k poklesu populácie obojživelníkov, hodnotením účinkov expozície chemikáliám počas citlivého larválneho štádia, keď môžu účinky na prežitie a vývoj vrátane normálneho vývoja reprodukčných orgánov nepriaznivo ovplyvňovať populácie týchto živočíchov.

4. Test je určený na detekciu konečných účinkov v dôsledku endokrinných aj neendokrinných mechanizmov a jeho súčasťou sú diagnostické sledované parametre, ktoré sú sčasti špecifické pre kľúčové endokrinné modality. Je potrebné poznamenať, že pred vyvinutím skúšky LAGDA neexistovala žiadna validovaná skúška, ktorá by slúžila na tento účel v prípade obojživelníkov.

5. Pred začiatkom skúšky je dôležité mať k dispozícii informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach testovanej chemikálie, najmä na to, aby bolo možné pripraviť stabilné chemické roztoky. Je potrebné mať k dispozícii aj primerane citlivú analytickú metódu na overenie koncentrácií testovanej chemikálie. Počas obdobia približne 16 týždňov sa v rámci skúšky celkovo vyžaduje 480 zvierat, t. j. embryí *X. laevis* (alebo 640 embryí v prípade použitia kontroly s aplikáciou rozpúšťadla), aby sa zabezpečila dostatočná kapacita testu na vyhodnotenie sledovaných parametrov súvisiacich s populáciou, napr. rastu, vývoja a reprodukčného dozrievania.

6. Pred použitím tejto testovacej metódy na regulačné testovanie zmesi treba zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určené regulačné účely. V tejto skúške sa navyše priamo nevyhodnocuje plodivosť, preto sa nemusí dať použiť v pokročilejších fázach, než je úroveň 4 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

VEDECKÝ ZÁKLAD TESTOVACEJ METÓDY

7. Súčasná miera porozumenia biológii obojživelníkov sa do veľkej miery dosiahla prostredníctvom vzorového laboratórneho druhu *X. laevis*. Tento druh možno bežne kultivovať v laboratóriu, ovuláciu možno vyvolať pomocou ľudského chorionického gonadotropínu (hCG) a zásoby zvierat sú jednoducho dostupné od komerčných chovateľov.

8. Podobne ako pri všetkých stavovcoch reprodukciu obojživelníkov riadi os hypotalamus – hypofýza – gonády (HPG) (4). Estrogény a androgény slúžia ako mediátory tohto endokrinného systému a ovplyvňujú vývoj a fyziológiu pohlavne dimorfných tkanív. V životnom cykle obojživelníkov sa vyskytujú tri samostatné fázy, počas ktorých je táto os obzvlášť aktívna: 1. diferenciácia gonád počas larválneho vývoja; 2. vývoj sekundárnych pohlavných znakov a gonadálne dozrievanie počas juvenilnej fázy a 3. funkčná reprodukcia dospelých jedincov. Počas každého z týchto vývojových období sa pravdepodobne prejavuje vnímavosť na narušenie endokrinného systému určitými chemikáliami, ako sú estrogény a androgény, čo v konečnom dôsledku vedie k strate reprodukčnej spôsobilosti organizmov.

9. Vývoj gonád sa začína v NF štádiu 43, keď sa prvýkrát objavuje bipotenciálna gonadálna ryha. Diferenciácia gonád sa začína v NF štádiu 52, keď sa primordiálne zárodočné bunky buď premiestnia do medulárneho tkaniva (samce), alebo zostanú v kortikálnej oblasti (samice) vyvíjajúcich sa gonád (3). Náchylnosť tohto procesu pohlavnej diferenciácie gonád na chemickú zmenu v prípade rodu *Xenopus* sa prvýkrát pozorovala v 50. rokoch dvadsiateho storočia (5) (6). Expozícia žubrienok estradiolu počas tohto obdobia diferenciácie gonád vedie k zmene pohlavia samcov, z ktorých sa pri dosiahnutí dospelosti stávajú úplne funkčné samice (7) (8). Možná je aj funkčná zmena pohlavia samíc na samce, ktorá bola zaznamenaná po implantácii tkaniva semenníkov do žubrienok (9). Aj keď expozícia

inhibítoru aromatázy spôsobuje funkčnú zmenu pohlavia aj pri druhu *X. tropicalis* (10), tento jav sa pri druhu *X. laevis* nepreukázal. Historicky sa účinky toxických látok na diferenciáciu gonád posudzovali histologickým vyšetrením gonád pri metamorfóze a zmenu pohlavia bolo možné stanoviť len na základe analýzy pomerov pohlaví. Až donedávna neexistovali prostriedky na priame stanovenie genetického pohlavia rodu *Xenopus*. Stanovením markerov súvisiacich s pohlavím pri druhu *X. laevis* je však v súčasnosti možné určiť genetické pohlavie a priamo identifikovať zvieratá so zmeneným pohlavím (11).

10. Pri samcoch sa v rámci juvenilného vývoja zvyšujú úrovne testosterónu v krvi v súvislosti s vývojom sekundárnych pohlavných znakov a vývojom semenníkov. Pri samiciach sa vo vaječníkoch vytvára estradiol, čo vedie k prítomnosti vitelogenínu (VTG) v plazme, vitelogenínových oocytov vo vaječníku a k vývoju vajcovodov (12). Vajcovody sú samičie sekundárne pohlavné znaky, ktoré sa podieľajú na dozrievaní oocytov počas reprodukcie. Na vonkajší povrch oocytov sa počas prechodu vajcovodom nanáša rôsolovitý povlak a následne sa oocyty, pripravené na oplodnenie, zhromažďujú vo vaku na vajíčka. Vývoj vajcovodov podľa všetkého regulujú estrogény, keďže ich vývoj koreluje s úrovňami estradiolu v krvi pri druhoch *X. laevis* (13) a *X. tropicalis* (12). V prípade samcov sa pozoroval vývoj vajcovodov po expozícii zlúčeninám polychlórovaných bifenylov (14) a 4-*terc*-oktylfenolu (15).

PRINCÍP TESTU

11. V rámci koncepcie testu sa uskutoční expozícia embryí *X. laevis* v NF štádiu 8 – 10 vodnou cestou štyrom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie a kontrolám do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole, s jednou predbežnou podvzorkou v NF štádiu 62. Hoci môže existovať aj možnosť podávania dávok výrazne hydrofóbnych chemikálií prostredníctvom krmiva, v rámci tejto skúšky doteraz existujú len obmedzené skúsenosti s touto expozičnou cestou. Pri každej testovanej koncentrácii existujú štyri replikáty, pričom pri každej použitej kontrole sa používa osem replikátov. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície, patria tie, ktoré signalizujú celkovú toxicitu [t. j. mortalita, abnormálne správanie a parametre stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť)], ako aj sledované parametre určené na charakterizovanie špecifických toxických spôsobov účinku na endokrinný systém s pôsobením na fyziologické procesy sprostredkované estrogénom, androgénom a štítnou žľazou [t. j. histopatologické vyšetrenie štítnej žľazy, histopatologické vyšetrenie gonád a gonadálneho kanála, abnormálny vývoj, vitelogenín v plazme (voliteľné) a genotypové/fenotypové pomery pohlaví].

KRITÉRIÁ PLATNOSTI TESTU

12. Uplatňujú sa tieto kritériá platnosti testu:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka má počas testu dosahovať ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,

— teplota vody má byť v rozsahu 21 ±1 °C a rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by nemali byť väčšie ako 1,0 °C,

— pH testovaného roztoku sa má udržiavať v rozsahu 6,5 až 8,5 a rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by nemali byť väčšie ako 0,5,

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % stredných nameraných hodnôt,

— mortalita počas obdobia expozície má byť ≤ 20 % pri každom replikáte v kontrolách,

— ≥ 70 % životaschopnosť znášky zvolenej na začiatku štúdie,

— medián času do NF štádia 62 kontrol má byť ≤ 45 dní.

— Priemerná hmotnosť testovaných organizmov v NF štádiu 62 a pri ukončení štúdie v kontrolách a kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (ak sa používajú) má dosiahnuť1,0 ±0,2, resp. 11,5 ±3 g.

13. Odporúča sa, aby boli na analýzu k dispozícii najmenej tri úrovne koncentrácie chemikálie s tromi nenarušenými replikátmi, hoci to nepredstavuje kritérium platnosti. Nadmerná mortalita v rámci testovanej skupiny je vymedzená > 4 úhynmi (< 20 %) najmenej v 2 replikátoch, ktoré nemožno vysvetliť technickou chybou. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň tri úrovne koncentrácie chemikálie bez zjavnej toxicity. Medzi známky zjavnej toxicity môže okrem iného patriť plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety, ako aj morfologické abnormality (napr. deformácie končatín), hemoragické lézie a opuch brucha.

14. Ak sa zistí odchýlka od kritérií platnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť výsledkov testu a tieto odchýlky a úvahy by mali byť zahrnuté do správy o teste.

OPIS METÓD

Prístroje

15. Bežné laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

a) prístroje na reguláciu teploty (napr. ohrievače alebo chladiče nastaviteľné na teplotu 21 ±1 °C);

b) teplomer;

c) binokulárny stereoskopický mikroskop a pitevné nástroje;

d) digitálna kamera s rozlíšením aspoň 4 megapixle a s funkciou mikro (v prípade potreby);

e) analytické váhy schopné vážiť na 0,001 mg alebo 1 μg;

f) zariadenia na meranie koncentrácie rozpusteného kyslíka a pH;

g) prístroj na meranie intenzity svetla schopný merať v luxoch.

Voda

Zdroj a kvalita

16. Môže sa použiť akákoľvek voda na riedenie, ktorá je lokálne dostupná (napr. pramenitá voda alebo voda z vodovodu filtrovaná cez uhlie) a umožňuje normálny rast a vývoj druhu *X. laevis*, pričom má byť k dispozícii dôkaz o normálnom raste v danej vode. Keďže kvalita miestnej vody sa môže medzi jednotlivými oblasťami výrazne líšiť, mala by sa vykonať analýza kvality vody, najmä ak nie sú dostupné historické údaje o použiteľnosti vody na chov lariev obojživelníkov. Ak je známe, že voda na riedenie má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej pred začiatkom testovania a/alebo napríklad raz za šesť mesiacov zmeria obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napríklad Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a nerozpustných pevných látok. Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 2.

Koncentrácia jodidu vo vode na testovanie

17. Na to, aby mohla v štítnej žľaze prebiehať syntéza hormónov štítnej žľazy na podporu normálnej metamorfózy, majú mať larvy k dispozícii dostatok jodidu z kombinácie zdrojov vo vode a v potrave. V súčasnosti neexistujú empiricky odvodené usmernenia v súvislosti s minimálnymi koncentráciami jodidu v potrave alebo vo vode na to, aby sa zabezpečil správny vývoj. Dostupnosť jodidu však môže ovplyvniť schopnosť systému štítnej žľazy reagovať na látky pôsobiace v štítnej žľaze a je známe, že jodid reguluje základnú činnosť štítnej žľazy, čo si zasluhuje pozornosť pri interpretácii výsledkov histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy. Na základe predchádzajúcich prác sa správna výkonnosť skúšky preukázala v rozsahu koncentrácií jodidu (I^{-}) vo vode na riedenie od 0,5 do 10 µg/l. V ideálnom prípade má byť minimálna koncentrácia jodidu vo vode na riedenie počas celého testu 0,5 µg/l (pridáva sa ako sodná alebo draselná soľ). Ak sa voda na testovanie rekonštituuje z deionizovanej vody, mal by sa pridať jód v minimálnej koncentrácii 0,5 µg/l. Je potrebné uviesť namerané koncentrácie jodidu vo vode na testovanie (t. j. vode na riedenie) a doplnenie jodidu alebo iných solí do vody na testovanie (ak sa použilo). Okrem vody na testovanie možno obsah jodidu merať aj v potrave.

Expozičný systém

18. Test bol navrhnutý pomocou prietokového systému s riedením. Zložky systému, ktoré prichádzajú do kontaktu s vodou, majú byť zo skla, z nehrdzavejúcej ocele a/alebo iných chemicky inertných materiálov. Expozičné nádrže sú akváriá zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele a využiteľný objem nádrže je od 4,0 do 10,0 l (minimálna hĺbka vody 10 až 15 cm). Systém má byť schopný umožniť použitie všetkých expozičných koncentrácií, kontroly a v prípade potreby kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ako aj štyroch replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a ôsmich replikátov v kontrolách. Prietok v každej nádrži má byť konštantný, aby bolo možné udržiavať biologické podmienky aj expozíciu chemikálii. Odporúča sa, aby sa použili vhodné prietoky (napr. najmenej 5 výmen obsahu nádrží denne) s cieľom predísť poklesu koncentrácie chemikálie v dôsledku metabolizmu testovaných organizmov aj vodných mikroorganizmov, ktoré sa vyskytujú v akváriách, alebo v dôsledku abiotických ciest degradácie (hydrolýza, fotolýza) alebo disipácie (prchavosť, sorpcia). Testovacie nádrže by sa mali náhodne prideliť na určitú pozíciu v expozičnom systéme, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy pozície vrátane miernych odchýlok v teplote, intenzite svetla atď. Ďalšie informácie o inštalácii prietokových expozičných systémov sa nachádzajú v štandardnom usmernení ASTM na vykonávanie testov akútnej toxicity na testovaných materiáloch pre ryby, makrobezstavovce a obojživelníky (16).

Aplikovanie chemikálie: príprava testovaných roztokov

19. Na prípravu testovaných roztokov v expozičnom systéme sa zásobný roztok testovanej chemikálie dávkuje do expozičného systému pomocou vhodného čerpadla alebo iného zariadenia. Prietok zásobného roztoku sa kalibruje v súlade s analytickým potvrdením testovaných roztokov pred začiatkom expozície a počas testu sa pravidelne kontroluje z hľadiska objemu. Objem testovaného roztoku v každej komore sa obnovuje minimálne päťkrát denne.

20. Metódy používané na aplikovanie testovanej chemikálie do systému sa môžu líšiť v závislosti od jej fyzikálno-chemických vlastností. Preto je pred testom potrebné získať základné informácie o chemikálii relevantné z hľadiska určenia testovateľnosti. Medzi užitočné informácie o špecifických vlastnostiach testovanej chemikálie patrí štruktúrny vzorec, molekulová hmotnosť, čistota, stabilita vo vode a na svetle, hodnoty pK_a a K_{ow}, rozpustnosť vo vode (prednostne v testovacom médiu) a tlak pár, ako aj výsledky testu ľahkej biologickej odbúrateľnosti [testovacia metóda C.4 (17) alebo C.29 (18)]. Rozpustnosť a tlak pár možno použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude udávať, či môže dôjsť k stratám v dôsledku vyparovania testovanej chemikálie. Uskutočnenie tohto testu bez vyššie uvedených informácií je potrebné dôkladne zvážiť, keďže koncepcia štúdie je závislá od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie a bez týchto údajov môže byť náročné interpretovať výsledky testu alebo tieto výsledky nemusia byť zmysluplné. Na kvantifikáciu testovanej chemikálie v testovaných roztokoch je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom. Testované chemikálie rozpustné vo vode možno rozpustiť v alikvotných častiach vody na riedenie v koncentrácii, ktorá umožňuje aplikovanie pri cieľovej testovanej koncentrácii v prietokovom systéme. Pri chemikáliách, ktoré sú kvapalné alebo tuhé pri izbovej teplote a stredne rozpustné vo vode, sa môžu vyžadovať saturačné kolóny typu kvapalina – kvapalina alebo kvapalina – tuhá látka (napríklad kolóna so sklenou vatou) (19). Hoci môže existovať aj možnosť podávania dávok veľmi hydrofóbnych testovaných chemikálií prostredníctvom krmiva, v rámci tejto skúšky existujú len obmedzené skúsenosti s touto expozičnou cestou.

21. Testované roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok sa má podľa možnosti pripraviť jednoduchým miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny/systémy alebo pasívne dávkovacie metódy (20). Uprednostňuje sa použitie testovacieho systému bez kosolventu, rôzne testované chemikálie však budú mať odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré si pravdepodobne budú vyžadovať rôzne prístupy k príprave vody na expozíciu chemikáliám. Je potrebné vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu rozpúšťadiel alebo nosičov, pretože: 1. určité rozpúšťadlá môžu samy osebe spôsobovať toxicitu a/alebo nežiaduce alebo neočakávané reakcie; 2. testovanie chemikálií nad hranicou ich rozpustnosti vo vode (k čomu môže často dôjsť pri použití rozpúšťadiel) môže viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií; 3. použitie rozpúšťadiel v dlhodobejších testoch môže spôsobiť vznik značného stupňa biofilmu v súvislosti s mikrobiálnou aktivitou, ktorý môže mať vplyv na podmienky prostredia, ako aj na schopnosť udržať expozičné koncentrácie; a 4. v prípade, že neexistujú historické údaje, z ktorých vyplýva, že rozpúšťadlo neovplyvňuje výsledok štúdie, pri použití rozpúšťadiel sa vyžaduje použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, čo má významné dôsledky z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, keďže sú na uskutočnenie testu potrebné ďalšie zvieratá. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (21). Rozpúšťadlo sa vyberie na základe chemických vlastností testovanej chemikálie a dostupnosti historických údajov o kontrolách v súvislosti s rozpúšťadlom. Pokiaľ nie sú dostupné historické údaje, vhodnosť rozpúšťadla sa musí stanoviť pred uskutočnením konečnej štúdie. V prípade, že sa nemožno vyhnúť použitiu rozpúšťadla a vyskytne sa mikrobiálna aktivita (vznik biofilmu), počas celého testu sa odporúča v jednotlivých nádržiach (najmenej raz za týždeň) zaznamenávať vznik biofilmu/podávať správy o jeho vzniku. Koncentrácia rozpúšťadla má byť v ideálnom prípade v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla a vo všetkých testovacích vzorkách konštantná. Ak sa neudržiava konštantná koncentrácia rozpúšťadla, v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla sa má použiť najvyššia koncentrácia rozpúšťadla v testovacej vzorke. V prípadoch, keď sa použije nosič s rozpúšťadlom, nemajú maximálne koncentrácie rozpúšťadla prekročiť 100 µl/l alebo 100 mg/l (21) a odporúča sa udržiavať koncentráciu rozpúšťadla čo najnižšiu (napr. 20 µl/l), aby sa predišlo potenciálnym účinkom rozpúšťadla na merané sledované parametre (22).

Pokusné zvieratá

Testovaný druh

22. Testovaný druh je *X. laevis*, pretože: 1. sa bežne kultivuje v laboratóriách na celom svete; 2. možno ho jednoducho získať prostredníctvom komerčných dodávateľov a 3. umožňuje stanovenie genetického pohlavia.

Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne

23. Správna starostlivosť o druh *X. laevis* a jeho párenie sa opisuje v štandardizovaných usmerneniach (23). Umiestnenie a starostlivosť o druh *X. laevis* sa opisuje aj v zdroji: Read (24). Na vyvolanie párenia sa trom až piatim párom dospelých samíc a samcov intraperitoneálne vstrekne ľudský chorionický gonadotropín (hCG). Samiciam sa vstrekne

približne 800 – 1 000 IU a samcom približne 500 – 800 IU hCG rozpusteného v 0,6 – 0,9 % fyziologickom roztoku (alebo Ringerovom roztoku pre žaby, čo je izotonický fyziologický roztok na použitie pri obojživelníkoch). Dávkovaný objem má byť približne 10 µl/g telesnej hmotnosti (~1 000 µl). Páry, pri ktorých sa vyvolalo párenie, sa následne držia vo veľkých nádržiach nerušené a za statických podmienok, aby sa podporil amplexus. Na spodku každej rozmnožovacej nádrže by malo byť falošné dno tvorené sitom z nehrdzavejúcej ocele (napríklad s otvormi s veľkosťou 1,25 cm), ktoré umožňuje padanie vajíčok na spodok nádrže. Žaby, ktorým bol vstreknutý hCG neskoro popoludní, zvyčajne nakladú väčšinu vajíčok do polovice dopoludnia nasledujúceho dňa. Po uvoľnení a oplodnení dostatočného množstva vajíčok je potrebné vybrať dospelé jedince z rozmnožovacích nádrží. Vajíčka sa potom zozbierajú a odstráni sa z nich rôsolovitý povlak ošetrením pomocou L-cysteínu (23). Pripraví sa 2 % roztok L-cysteínu a hodnota pH sa upraví na 8,1 pomocou NaOH s koncentráciou 1 M. Tento roztok s teplotou 21 °C sa pridá do Erlenmeyerovej banky s objemom 500 ml, v ktorej sa nachádzajú vajíčka z jednej znášky, a jemnými krúživými pohybmi sa mieša jednu až dve minúty a potom sa dôkladne premyje 6 až 8 ráz kultivačnou vodou s teplotou 21 °C. Vajíčka sa potom prenesú na kryštalizačnú misku a stanoví sa, či dosahujú > 70 % životaschopnosť s minimálnymi abnormalitami pri embryách, v ktorých dochádza k deleniu buniek.

KONCEPCIA TESTU

Testované koncentrácie

24. Odporúča sa použiť najmenej štyri koncentrácie chemikálie a vhodné kontroly (v prípade potreby vrátane kontrol s aplikáciou rozpúšťadla). Vo všeobecnosti sa odporúča odstup koncentrácií (faktor odstupu), ktorý neprekračuje hodnotu 3,2.

25. Na účely tohto testu sa majú, pokiaľ je to možné, použiť výsledky existujúcich štúdií týkajúcich sa obojživelníkov na stanovenie najvyššej testovanej koncentrácie, aby sa predišlo koncentráciám, ktoré sú zjavne toxické. K stanoveniu takejto koncentrácie môžu prispieť napríklad informácie z kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity, prevzatých údajov a údajov z existujúcich štúdií týkajúcich sa obojživelníkov, napríklad zo skúšky metamorfózy obojživelníkov, testovacej metódy C.38 (25) a skúšky teratogenézy žabích embryí – *Xenopus* (23) a/alebo z testov na rybách, napr. testovacích metód C.48, C.41 a C.49 (26) (27) (28). Pred uskutočnením skúšky LAGDA sa môže vykonať pokus na zistenie rozsahu. Odporúča sa, aby sa expozícia na zistenie rozsahu začala do 24 hodín po oplodnení a trvala 7 až 14 dní (alebo v prípade potreby dlhšie) a aby sa testované koncentrácie stanovili tak, že intervaly medzi nimi neprekračujú faktor 10. Výsledky pokusu na zistenie rozsahu slúžia na stanovenie najvyššej testovanej koncentrácie v skúške LAGDA. Ak sa má použiť rozpúšťadlo, možno v rámci štúdie na zistenie rozsahu stanoviť vhodnosť rozpúšťadla (t. j. či môže mať vplyv na výsledok štúdie).

Replikáty v rámci testovaných skupín a kontrol

26. Použiť sa majú najmenej štyri nádrže s replikátom na testovanú koncentráciu a najmenej osem replikátov pre kontroly (a v prípade potreby pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla) (t. j. počet replikátov v kontrole a akejkoľvek kontrole s aplikáciou rozpúšťadla má predstavovať dvojnásobok počtu replikátov v každej testovanej skupine, aby sa zabezpečila vhodná štatistická váha). V každom replikáte má byť najviac 20 zvierat. Minimálny počet skúmaných zvierat má byť 15 (5 v podvzorke v NF štádiu 62 a 10 juvenilných jedincov). Do každého replikátu sa však pridávajú ďalšie zvieratá, aby sa zohľadnila možnosť úhynu a zároveň sa zachoval kritický počet 15 jedincov.

POSTUP

Prehľad skúšky

27. Skúška sa začína s novovyprodukovanými embryami (NF štádium 8 – 10) a pokračuje až do obdobia juvenilného vývoja. Pri zvieratách sa denne kontroluje mortalita a akékoľvek príznaky abnormálneho správania. V NF štádiu 62 sa získa podvzorka jedincov v larválnom štádiu (do 5 zvierat na replikát) a skúmajú sa rôzne sledované parametre (tabuľka 1). Keď ako všetky zvieratá dosiahnu NF štádium 66, t. j. dokončila sa metamorfóza (alebo 70 dní od začiatku skúšky, podľa toho, čo nastane skôr), vykoná sa náhodná selekcia (avšak bez odberu podvzoriek), aby sa znížil počet zvierat (10 na nádrž) (pozri odsek 43), a expozícia zvyšných zvierat pokračuje až do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole. Pri ukončení testu (odber vzoriek juvenilných jedincov) sa uskutočnia dodatočné merania (tabuľka 1).

Podmienky expozície

28. Úplný súhrn parametrov testu sa uvádza v dodatku 3. Počas obdobia expozície je potrebné denne merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, teplotu a pH testovaných roztokov. Raz mesačne sa meria vodivosť, alkalita a tvrdosť. Pokiaľ ide o teplotu vody testovaných roztokov, rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by (v rámci jedného dňa) nemali byť väčšie ako 1,0 °C. V prípade pH testovaných roztokov nemajú byť rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami väčšie ako 0,5.

29. Expozičné nádrže sa môžu denne odsávať, aby sa odstránila neskonzumovaná potrava a odpadové produkty, pričom treba postupovať opatrne, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii nádrží. Je potrebné minimalizovať stres a traumatizovanie zvierat, obzvlášť počas premiestňovania, čistenia akvárií a manipulácie. Je potrebné vyhýbať sa stresujúcim podmienkam/činnostiam, ako je silný a/alebo nepretržitý hluk, búchanie na akváriá či vibrácie v nádrži.

Dĺžka expozície testovanej chemikálii

30. Expozícia sa začína s novovyprodukovanými embryami (NF štádium 8 – 10) a pokračuje až do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 (≤ 45 dní od začiatku skúšky) v kontrolnej skupine. Skúška LAGDA vo všeobecnosti trvá 16 týždňov (maximálne 17 týždňov).

Začiatok skúšky

31. V prípade rodičovských zvierat použitých na začatie skúšky je potrebné preukázať, že už mali potomstvo, pri ktorom bolo možné odlíšiť genetické pohlavie (dodatok 5). Po trení dospelých jedincov sa embryá zozbierajú, ošetria sa cysteínom, aby sa odstránil rôsolovitý povlak, a overí sa ich životaschopnosť (23). Vďaka ošetreniu cysteínom možno počas skríningu manipulovať s embryami bez toho, aby sa prichytávali k povrchom. Skríning sa uskutočňuje pod stereoskopickým mikroskopom, pričom sa pomocou očného kvapkadla vhodnej veľkosti odstránia neživotaschopné embryá. Uprednostňuje sa, aby sa v rámci testu použila jedna znáška so životaschopnosťou vyššou ako 70 %. Embryá v NF štádiu 8 – 10 sa náhodne rozdelia do expozičných testovacích nádrží, ktoré obsahujú vhodný objem vody na riedenie, až kým každá nádrž nebude obsahovať 20 embryí. S embryami sa počas tohto prenosu musí manipulovať opatrne, aby sa minimalizoval stres pri manipulácii a aby nedošlo k poraneniu. 96 hodín po oplodnení by sa žubrienky mali premiestniť nahor vo vodnom stĺpci a začať sa prichytávať k stenám nádrže.

Kŕmny režim

32. Zmeny krmiva a dávky potravy počas rôznych vývojových štádií druhu *X. laevis* predstavujú veľmi dôležitý aspekt protokolu LAGDA. Nadmerné kŕmenie počas larválnej fázy zvyčajne vedie k zvýšenému výskytu a závažnosti skoliózy (dodatok 8) a je potrebné mu predchádzať. Na druhej strane, nedostatočné kŕmenie počas larválnej fázy vedie k veľmi premenlivému tempu vývoja medzi kontrolami, čo môže potenciálne viesť k narušeniu štatistickej váhy alebo zneprehľadneniu výsledkov testu. V dodatku 4 s uvádza odporúčaná potrava a režimy kŕmenia pre druh *X. laevis* v larválnom a juvenilnom štádiu v prietokových podmienkach, prípustné sú však aj alternatívy za predpokladu, že testované organizmy uspokojivo rastú a vyvíjajú sa. Je dôležité poznamenať, že ak sa merajú sledované parametre špecifické pre endokrinný systém, v potrave sa nemajú nachádzať látky s účinkom na endokrinný systém, napríklad sójový šrot.

Kŕmenie lariev

33. Odporúčaná potrava pre larvy obsahuje štartovacie krmivo pre pstruhy, disky z rias *Spirulina* a lupienky potravy pre karasa zlatého (napr. vločky TetraFin®, Tetra, Nemecko) zmiešané v kultivačnej vode (alebo vo vode na riedenie). Táto zmes sa podáva trikrát denne v pracovných dňoch a raz denne počas víkendov. Žubrienky sa kŕmia aj živými 24-hodinovými naupliami žiabronôžky soľnej rodu *Artemia*, a to dvakrát denne počas pracovných dní a raz denne počas víkendov od 8. dňa po oplodnení. Kŕmenie lariev má byť zhodné v jednotlivých testovacích nádobách a má umožňovať primeraný rast a vývoj pokusných zvierat, aby sa zabezpečila reprodukovateľnosť a prenosnosť výsledkov skúšky: 1. medián času do NF štádia 62 v kontrolách má byť ≤ 45 dní a 2. odporúča sa priemerná hmotnosť v rozsahu 1,0 ±0,2 g v NF štádiu 62 v kontrolách.

Kŕmenie juvenilných jedincov

34. Po dokončení metamorfózy sa kŕmny režim skladá z prémiového vodného krmiva pre žaby, napr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (dodatok 4). V prípade malých žiab (juvenilných jedincov v ranom štádiu) sa pelety krátko pomelú v mlynčeku na kávu, mixéri alebo sa rozdrvia pomocou trecej misky a paličky, aby sa zmenšila ich veľkosť. Keď juvenilné jedince dosiahnu dostatočnú veľkosť nato, aby mohli konzumovať celé pelety, mletie alebo drvenie už nie je potrebné. Zvieratá sa kŕmia raz denne. Kŕmenie juvenilných jedincov má umožňovať primeraný rast a vývoj organizmov: v prípade kontrolných juvenilných jedincov sa odporúča priemerná hmotnosť v rozsahu 11,5 ±3 g pri ukončení štúdie.

Analytická chémia

35. Pred začatím skúšky by sa mala stanoviť stabilita testovanej chemikálie (napr. rozpustnosť, odbúrateľnosť a prchavosť) a všetky potrebné analytické metódy, napríklad na základe existujúcich informácií a vedomostí. Pri dávkovaní prostredníctvom vody na riedenie sa pred začatím testu odporúča analyzovať testované roztoky z každej nádrže replikátu, aby sa overila výkonnosť systému. Počas obdobia expozície sa koncentrácie testovanej chemikálie stanovujú vo vhodných intervaloch, podľa možnosti každý týždeň najmenej v jednom replikáte v každej testovanej skupine so striedaním medzi replikátmi v tej istej testovanej skupine každý týždeň. Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % nominálnej koncentrácie počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt. V každej koncentrácii sa má okrem toho počas celého testovacieho obdobia udržiavať variačný koeficient (CV) nameraných testovaných koncentrácií v rámci testovanej skupiny na úrovni 20 % alebo menej. Keď namerané koncentrácie nezostanú v rozsahu 80 až 120 % nominálnej koncentrácie (napr. pri testovaní chemikálií s vysokou mierou biodegradácie alebo adsorpcie), účinná koncentrácia sa má stanoviť a vyjadriť vzhľadom na aritmetický priemer koncentrácie v prietokových testoch.

36. Počas trvania expozície sa prietok vody na riedenie a zásobného roztoku kontroluje vo vhodných intervaloch (napr. trikrát týždenne). V prípade chemikálií, ktoré nemožno detegovať pri niektorých alebo pri všetkých nominálnych koncentráciách (napríklad z dôvodu rýchlej degradácie alebo adsorpcie v testovacích nádobách alebo z dôvodu značnej akumulácie chemikálie v telách exponovaných zvierat), sa odporúča, aby sa miera obnovovania testovaného roztoku v každej komore prispôsobila tak, aby sa testované koncentrácie udržiavali čo najkonštantnejšie.

Pozorovania a merania sledovaných parametrov

37. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície, patria tie, ktoré signalizujú toxicitu vrátane mortality, abnormálneho správania, ako sú klinické príznaky choroby a/alebo všeobecnej toxicity, a parametrov stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť), ako aj sledované parametre z hľadiska patológie, ktoré môžu predstavovať reakciu na spôsoby účinku z hľadiska všeobecnej toxicity a spôsoby účinku na endokrinný systém s pôsobením na dráhy sprostredkované estrogénom, androgénom alebo štítnou žľazou. Navyše sa pri ukončení štúdie môže voliteľne merať koncentrácia VTG v plazme. Meranie VTG môže byť užitočné pri porozumení výsledkom štúdie v kontexte endokrinných mechanizmov pri chemikáliách, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC). Sledované parametre a harmonogram meraní sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Prehľad sledovaných parametrov v skúške LAGDA

Sledované parametre (*)	Denne	Predbežný odber vzoriek (Odber vzoriek jedincov v larválnom štádiu)	Ukončenie testu (Odber vzoriek juvenilných jedincov)
Mortalita a abnormality	X		
Čas do NF štádia 62		X	
Histo(pato)lógia (štítna žľaza)		X	
Morfometrika (rast z hľadiska hmotnosti a dĺžky)		X	X
Index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI)			X
Genotypové/fenotypové pomery pohlaví			X
Histopatológia (gonády, reprodukčné trubice, oblička a pečeň)			X
Vitelogenín (VTG) (voliteľné)			X

(*) Všetky sledované parametre sa analyzujú štatisticky.

Mortalita a denné pozorovania

38. Všetky testovacie nádrže sa musia každý deň kontrolovať, či v nich nie sú zvieratá, pričom v každej nádrži sa zaznamenáva uhynuté mortalita. Mŕtve zvieratá sa musia z nádrže odstrániť ihneď po zistení úhynu. Vývojové štádium uhynutých zvierat sa kategorizuje ako NF štádium skoršie ako 58 (pred vyvinutím predných končatín), NF štádium 58 – NF štádium 62, NF štádium 63 – NF štádium 66 (od NF štádia 62 po úplnú absorpciu chvosta) a obdobie po NF štádiu 66 (ukončené larválne štádium). Mortalita presahujúca 20 % môže znamenať nevhodné testovacie podmienky alebo zjavne toxické účinky testovanej chemikálie. Zvieratá sú zvyčajne najviac citlivé z hľadiska mortality, ktorá nie je vyvolaná chemikáliami, počas prvých dní vývoja po trení a počas vrcholu metamorfózy. Takáto mortalita môže byť zrejmá z kontrolných údajov.

39. Okrem toho je potrebné zaznamenať akékoľvek známky abnormálneho správania, zreteľne viditeľné malformácie (napr. skolióza) alebo lézie. Pozorované výskyty skoliózy je potrebné spočítať (incidencia) a ohodnotiť z hľadiska závažnosti (napr. nepozorovaná – NR, minimálna – 1, mierna – 2, závažná – 3; dodatok 8). Je potrebné usilovať sa o to, aby sa v rámci celej štúdie obmedzila prevalencia miernej a závažnej skoliózy (napr. menej ako 10 % v kontrolách), hoci vyššia prevalencia abnormalít v kontrolách nemusí byť nevyhnutne dôvodom na ukončenie testu. Normálne správanie jedincov v larválnom štádiu je charakterizované rozptýlením vo vodnom stĺpci s chvostom vztýčeným nad hlavou, pravidelným rytmickým pohybom chvostovou plutvou, pravidelným vychádzaním na hladinu, vytvorením žiabrových viečok a reagovaním na podnety. Abnormálne správanie zahŕňa napríklad plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety. V prípade zvierat, pri ktorých prebehla metamorfóza, sa okrem takéhoto abnormálneho správania majú zaznamenať aj výrazné rozdiely v príjme potravy. Zreteľné malformácie a lézie môžu okrem iného zahŕňať morfologické abnormality (napr. deformácie končatín), hemoragické lézie, opuch brucha a bakteriálne alebo plesňové infekcie. Výskyt lézií na hlave juvenilných jedincov bezprostredne za nozdrami môže naznačovať nedostatočnú úroveň vlhkosti. Tieto stanovenia sú kvalitatívne a mali by sa považovať za podobné klinickým príznakom ochorenia/stresu a porovnať s kontrolnými zvieratami. Ak je miera výskytu v exponovaných nádržiach vyššia ako v kontrolných nádržiach, malo by sa to považovať za dôkaz zjavnej toxicity.

Odber podvzoriek jedincov v larválnom štádiu

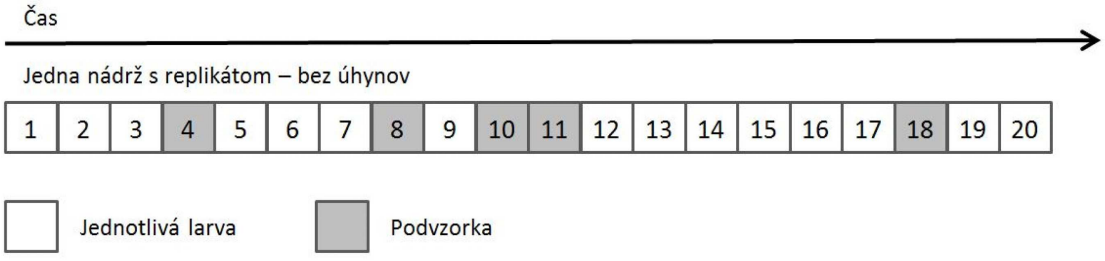
Prehľad odberu podvzoriek jedincov v larválnom štádiu:

40. Žubrienky, ktoré dosiahli NF štádium 62, sa vyberú z nádrží a buď sa z nich odoberú vzorky, alebo sa presunú do nasledujúcej časti expozície v novej nádrži, prípadne sa fyzicky oddelia od zvyšných žubrienok v rovnakej nádrži pomocou oddeľovača. Denne sa vykonáva kontrola žubrienok a zaznamená sa deň štúdie, v ktorom jednotlivá žubrienka dosiahla NF štádium 62. Určujúcou charakteristikou, ktorá sa použije pri tomto posúdení, je tvar hlavy. Keď sa veľkosť hlavy zmenší tak, že má na pohľad približne rovnakú šírku ako trup žubrienky, a predné končatiny sa nachádzajú na úrovni stredu srdca, pri danom jedincovi sa zaznamená dosiahnutie NF štádia 62.

41. Cieľom je odobrať vzorku obsahujúcu celkovo päť žubrienok v NF štádiu 62 na nádrž s replikátom. Postupuje sa pri tom celkom náhodne, rozhodnutie je však potrebné uskutočniť *a priori*. Hypotetický príklad nádrže s replikátom je uvedený na **obrázku 1**. Ak sa v čase, keď prvý jedinec dosiahne NF štádium 62, v príslušnej nádrži nachádza 20 žubrienok, ktoré prežili, vyberie sa päť náhodných čísel z rozsahu 1 – 20. Žubrienka č. 1 je prvý jedinec, ktorý dosiahol NF štádium 62, a žubrienka č. 20 je posledný jedinec v nádrži, ktorý dosiahol NF štádium 62. Podobne, ak je v príslušnej nádrži 18 žubrienok, ktoré prežili, vyberie sa päť náhodných čísel z rozsahu 1 – 18. Tento postup sa uskutoční v každej nádrži s replikátom, keď prvý jedinec v teste dosiahne NF štádium 62. Ak počas odberu vzoriek v NF štádiu 62 dôjde k úhynom, zvyšné vzorky je potrené opätovne randomizovať na základe počtu zostávajúcich lariev, ktoré ešte nedosiahli NF štádium 62, a na základe toho, koľko ďalších vzoriek je potrebných, aby sa dosiahlo celkovo päť vzoriek z daného replikátu. V deň, keď žubrienka dosiahne NF štádium 62, sa na základe pripravenej schémy na odber vzoriek stanoví, či sa daný jedinec vyberie do vzorky alebo či sa fyzicky oddelí od zvyšných žubrienok na účely pokračovania expozície. V uvedenom príklade (obrázok 1) sa prvý jedinec, ktorý dosiahne NF štádium 62 (t. j. políčko č. 1), fyzicky oddelí od ostatných lariev a pokračuje jeho expozícia, pritom sa zaznamená deň štúdie, v ktorom tento jedinec dosiahol NF štádium 62. Následne sa pri jedincoch č. 2 a č. 3 postupuje rovnako ako v prípade jedinca č. 1 a potom sa jedinec č. 4 vyberie do vzorky na posúdenie rastu a histológie štítnej žľazy (podľa tohto príkladu). V tomto postupe sa pokračuje, až kým sa nedospeje k 20. jedincovi, ktorý sa buď zaradí k ostatným jedincom po NF štádiu 62, alebo sa vyberie do vzorky. Musí sa použiť taký náhodný postup, aby bola pri každom testovanom organizme rovnaká pravdepodobnosť, že bude vybratý. To možno dosiahnuť použitím akejkoľvek randomizačnej metódy, ale vyžaduje sa, aby sa každá žubrienka vybrala sieťkou v určitom bode počas obdobia odberu podvzoriek v NF štádiu 62.

Obrázok 1

Hypotetický príklad režimu odberu vzoriek v NF štádiu 62 pre jednu nádrž s replikátom



42. Pri odbere podvzoriek jedincov v larválnom štádiu sa získavajú tieto sledované parametre: 1. čas do NF štádia 62 (t. j. počet dní od oplodnenia po dosiahnutie NF štádia 62); 2. vonkajšie abnormality; 3. morfometrika (napr. hmotnosť a dĺžka) a 4. histológia štítnej žľazy.

Humánne usmrcovanie žubrienok

43. Podvzorka žubrienok v NF štádiu 62 (5 jedincov na replikát) sa usmrtí ponorením na 30 minút do vhodného množstva (napr. 500 ml) anestetického roztoku (napr. 0,3 % roztok MS-222, trikaín metán sulfonát, CAS 886-86-2). Roztok MS-222 sa tlmí pridaním bikarbonátu sodného na hodnotu pH približne 7,0, pretože netlmený roztok MS-222 je kyslý a dráždi kožu žiab, čo vedie k nedostatočnej absorpcii a nežiaducemu dodatočnému stresu, ktorému sú organizmy vystavené.

44. Pomocou ponornej sieťky sa žubrienka vyberie z pokusnej komory a prenesie sa (umiestni sa) do usmrcovacieho roztoku. Zviera je riadne usmrtené a pripravené na pitvu, keď nereaguje na externé stimuly, napríklad zovretie zadnej končatiny pomocou pinzety.

Morfometrika (hmotnosť a dĺžka)

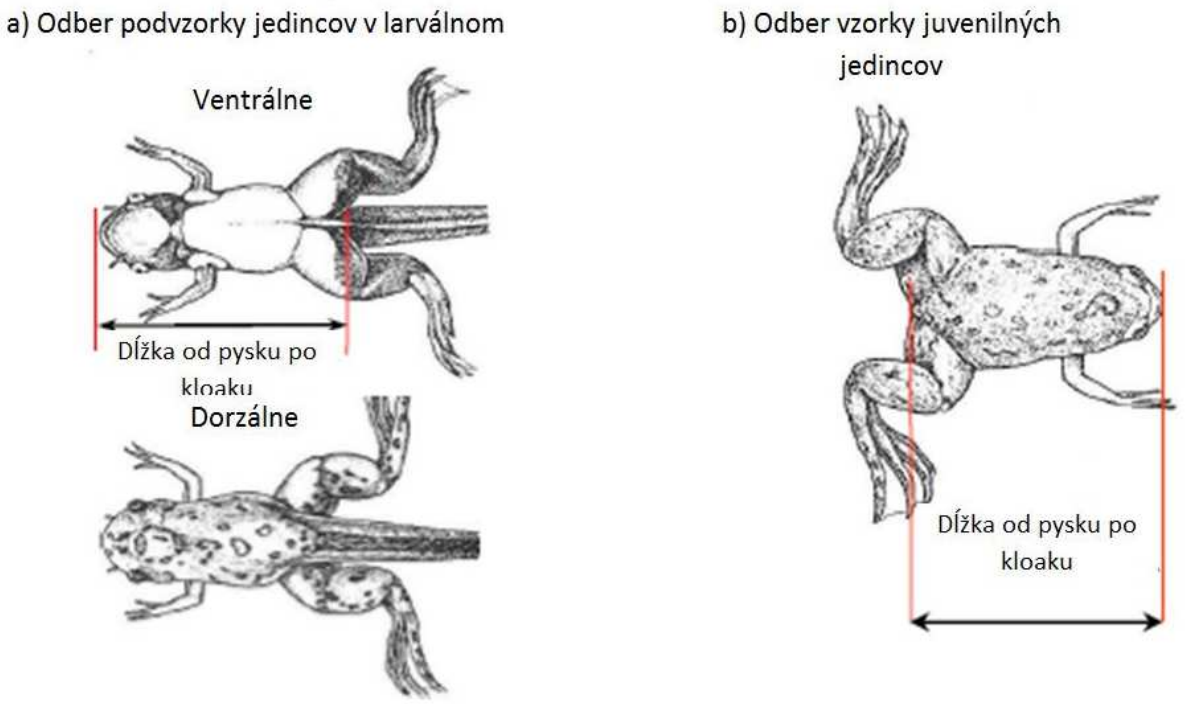
45. Meranie vlhkej hmotnosti (s presnosťou na mg) a dĺžky od pysku po kloaku (SVL) (s presnosťou na 0,1 mm) pri každej žubrienke sa uskutočňuje hneď po tom, ako žubrienka prestane reagovať v dôsledku anestézie (obrázok 2a). Na meranie SVL z fotografie možno použiť softvér na obrazovú analýzu. Žubrienky možno pred vážením osušiť, aby sa z nich odstránila prebytočná voda. Po uskutočnení meraní veľkosti tela (hmotnosť a SVL) sa zaznamenajú alebo zapíšu zreteľné morfologické abnormality a/alebo klinické príznaky toxicity, napríklad skolióza (pozri dodatok 8), petechie a hemorágia, pričom sa odporúča vytvorenie digitálnej dokumentácie. Petechie sú malé červené alebo fialové krvné výrony v kožných kapilárach.

Odber a fixácia tkaniva

46. V prípade podvzorky jedincov v larválnom štádiu sa posudzujú štítne žľazy z hľadiska histológie. Spodná časť trupu za prednými končatinami sa odstráni a vyradí. Zvyšok tela zvieraťa sa zafixuje v Davidsonovom fixačnom prostriedku. Objem fixačného prostriedku v nádobe má predstavovať najmenej desaťnásobok približného objemu tkaniva. Na správnu fixáciu tkanív, ktoré sú predmetom záujmu, je potrebné zabezpečiť vhodné miešanie alebo cirkuláciu fixačného prostriedku. Všetky tkanivá zostávajú v Davidsonovom fixačnom prostriedku najmenej 48 hodín, nie však viac ako 96 hodín. Potom sa opláchnu deionizovanou vodou a uskladnia sa v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne (1) (29).

Histológia štítnej žľazy

47. V prípade každej podvzorky jedincov v larválnom štádiu (zafixované tkanivá) sa vykoná histologické posúdenie štítnej žľazy, čo zahŕňa diagnostiku a hodnotenie závažnosti (29) (30).



Obrázok 2: Znaky na meranie dĺžky od pysku po kloaku pri skúške LAGDA pri jedincoch v NF štádiu 62 (a) a juvenilných žabách (b). Určujúce charakteristiky NF štádia 62 (a): hlava má rovnakú šírku ako trup, čuchový nerv je kratší ako priemer čuchového bulbu (dorzálny pohľad) a predné končatiny sú na úrovni srdca (ventrálny pohľad). Obrázky upravené zo zdroja Nieuwkoop a Faber (1994).

Koniec larválnej expozície

48. Vzhľadom na počiatočný počet žubrienok sa očakáva, že medzi nimi pravdepodobne bude malý percentuálny podiel jedincov, ktoré sa nebudú normálne vyvíjať a v primeranom čase sa pri nich nedokončí metamorfóza (NF štádium 66). Larválne obdobie expozície nemá prekročiť 70 dní. Všetky žubrienky, ktoré zostanú na konci tohto obdobia, sa usmrtia (pozri odsek 43), odmeria sa ich vlhká hmotnosť a SVL, priradí sa im štádium podľa Nieuwkoopa a Fabera (1994) a zaznamenajú sa akékoľvek vývojové abnormality.

Selekcia po NF štádiu 66

49. Od NF štádia 66 (úplná resorpcia chvosta) sa pokračuje s desiatimi jedincami na nádrž až do ukončenia expozície. Po tom, ako všetky zvieratá dosiahnu NF štádium 66, alebo po 70 dňoch (podľa toho, čo nastane skôr) sa preto musí uskutočniť selekcia. Náhodne sa vyberú zvieratá po NF štádiu 66, pri ktorých sa nebude pokračovať v expozícii.

50. Zvieratá, ktoré sa nevyberú na účely pokračovania expozície, sa usmrtia (pozri odsek 43). Pri každom zvierati sa uskutočnia merania vývojového štádia, vlhkej hmotnosti a SVL (obrázok 2b), ako aj makroskopická pitva. Fenotypové pohlavie (na základe morfológie gonád) sa zaznamená ako samičie, samčie alebo neurčité.

Odber vzoriek juvenilných jedincov

Prehľad odberu vzoriek juvenilných jedincov

51. Expozícia zvyšných zvierat pokračuje až do dosiahnutia 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole s vodou na riedenie (a/alebo v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla, ak je to relevantné). Na konci obdobia expozície sa zvyšné zvieratá (najviac 10 žiab na replikát) usmrtia a zmerajú/posúdia a zaznamenajú sa rôzne sledované parametre: 1. morfometrika (hmotnosť a dĺžka); 2. fenotypové/genotypové pomery pohlaví; 3. hmotnosť pečene (index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela); 4. histopatológia (gonády, reprodukčné trubice, oblička a pečeň) a voliteľne 5. VTG v plazme.

Humánne usmrcovanie žiab

52. Juvenilné žaby po uskutočnení metamorfózy sa usmrtia intraperitoneálnou injekciou anestetika, napr. 10 % MS-222 vo vhodnom fosfátovom tlmivom roztoku. Vzorky zo žiab sa môžu odobrať po tom, ako žaby prestanú reagovať (zvyčajne približne 2 minúty po injekčnom podaní, ak sa použije 10 % MS-222 s dávkovaním 0,01 ml na gram žaby). Hoci možno juvenilné žaby ponoriť do anestetika s vyššou koncentráciou (MS-222), zo skúseností vyplýva, že dosiahnutie anestézie trvá pomocou tejto metódy dlhšie a jej trvanie nemusí byť dostatočné na to, aby bolo možné odobrať vzorky. Injekčným podaním sa dosahuje účinné a rýchle usmrtenie pred odberom vzoriek. K odberu vzoriek sa pristúpi až vtedy, keď sa na základe absencie reakcií na podnety potvrdí, že žaby sú mŕtve. Ak sa na žabách prejavujú príznaky značného utrpenia (vo veľmi závažnej miere a je možné spoľahlivo predpokladať smrť) a zvieratá sa považujú za moribundné, je potrebné im podať anestetikum a usmrtiť ich a na účely analýzy údajov ich považovať za uhynuté. Ak sa žaba usmrtí v dôsledku morbidity, zaznamená sa to a uvedie v správe. Žaba sa môže uchovať na účely histopatologickej analýzy (fixácia žaby na účely možnej histopatológie) v závislosti od toho, kedy počas štúdie dôjde k jej usmrteniu.

Morfometrika (hmotnosť a dĺžka)

53. Merania vlhkej hmotnosti a SVL (obrázok 2b) sú totožné s meraniami uvedenými pre odber podvzoriek jedincov v larválnom štádiu.

VTG v plazme (voliteľné)

54. VTG je všeobecne akceptovaný biologický marker vyskytujúci sa v dôsledku expozície estrogénovým chemikáliám. Pri skúške LAGDA sa VTG v plazme môže voliteľne merať v prípade vzoriek z juvenilných zvierat (obzvlášť relevantné to môže byť v prípade podozrenia, že testovaná chemikália má estrogénové pôsobenie).

55. Zadné končatiny usmrteného juvenilného jedinca sa narežú a krv sa odoberie pomocou heparinizovanej kapiláry (vhodné však môžu byť aj alternatívne metódy odberu krvi, napríklad punkcia srdca). Krv sa vytlačí do skúmavky mikroodstredivky (napr. s objemom 1,5 ml) a odstreďovaním sa z nej získa plazma. Vzorky plazmy sa skladujú pri teplote −70 °C alebo nižšej až do stanovenia VTG. Koncentráciu VTG v plazme možno merať pomocou metódy enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) (dodatok 6) alebo pomocou alternatívnej metódy, napr. hmotnostnej spektrometrie (31). Kvôli vyššej citlivosti sa uprednostňujú druhovo špecifické protilátky.

Určenie genetického pohlavia

56. Genetické pohlavie každej juvenilnej žaby sa určuje na základe markerov, ktoré vyvinul Yoshimoto a kol. (11). Na účely určenia genetického pohlavia sa odoberie časť jednej zadnej končatiny (alebo celá zadná končatina), ktorá sa odstránila počas pitvy, a vloží sa do skúmavky mikroodstredivky (vzorky tkaniva zo žiab možno získať z akéhokoľvek tkaniva). Tkanivo možno skladovať pri teplote −20 °C alebo nižšej až do izolácie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA). Na izoláciu DNA z tkanív možno použiť komerčne dostupné súpravy a analýza na stanovenie prítomnosti alebo neprítomnosti markera sa uskutočňuje metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) (dodatok 5). Súlad medzi histologicky zisteným pohlavím a genotypom medzi kontrolnými zvieratami v čase odberu vzoriek juvenilných jedincov v kontrolných skupinách je viac ako 95 %.

Odber a fixácia tkaniva na účely histopatológie

57. Počas konečného odberu vzoriek sa odoberú gonády, reprodukčné trubice, obličky a pečene na účely histologickej analýzy. Otvorí sa brušná dutina a pečeň sa oddelí rezom a odváži. Z dolnej časti brucha sa ďalej opatrne odstránia orgány tráviacej sústavy (napr. žalúdok, črevá), aby sa získal prístup ku gonádam, k obličkám a reprodukčným trubiciam. Zaznamenajú sa zreteľné morfologické abnormality v gonádach. Nakoniec sa odstránia zadné končatiny, ak sa už neodstránili skôr pri odbere krvi. Odobraté pečene a telo s gonádami ponechanými *in situ* sa okamžite vložia do Davidsonovho fixačného prostriedku. Objem fixačného prostriedku v nádobe má predstavovať najmenej desaťnásobok približného objemu tkaniva. Všetky tkanivá zostávajú v Davidsonovom fixačnom prostriedku najmenej 48 hodín, nie však viac ako 96 hodín. Potom sa opláchnu deionizovanou vodou a uskladnia sa v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne (1) (29).

Histopatológia

58. Každá juvenilná vzorka sa histologicky posudzuje z hľadiska výskytu patologických javov v gonádach, reprodukčných trubiciach, obličkách a tkanive pečene, čo zahŕňa diagnostiku a hodnotenie závažnosti (32). Od tohto posúdenia sa odvodzuje aj gonádový fenotyp (napr. vaječníky, semenníky, intersexuálny jedinec) a spolu s jednotlivými meraniami genetického pohlavia možno na základe týchto pozorovaní vypočítať fenotypové/genotypové pomery pohlaví.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Štatistická analýza

59. V rámci skúšky LAGDA sa vytvárajú tri druhy údajov, ktoré sa majú štatisticky analyzovať: 1. kvantitatívne spojité údaje (hmotnosť, SVL, LSI, VTG); 2. údaje vyjadrujúce čas do udalosti z hľadiska tempa vývoja (t. j. počet dní do NF štádia 62 od začiatku skúšky) a 3. poradové údaje v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií z histopatologických hodnotení.

60. Odporúča sa, aby koncepcia testu a výber štatistických testov poskytovali dostatočnú váhu na detekciu zmien biologického významu v sledovaných parametroch, pri ktorých sa má uvádzať hodnota NOEC alebo ECx. Pri štatistických analýzach údajov (vo všeobecnosti na základe priemeru replikátov) by sa podľa možnosti malo vychádzať z postupov uvedených v dokumente Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: usmernenie k uplatňovaniu (33). V dodatku 7 k tejto testovacej metóde je k dispozícii odporúčaná schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy a usmernenie s cieľom pomôcť pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu, ktorý sa použije pri skúške LAGDA.

61. Údaje z odberu vzoriek juvenilných jedincov (napr. rast, LSI) sa analyzujú samostatne pre každé genotypové pohlavie, keďže genotypové pohlavie sa určuje pri všetkých žabách.

Úvahy v súvislosti s analýzou údajov

Používanie narušených replikátov a testovaných skupín

62. K narušeniu replikátov a testovaných skupín môže dôjsť v dôsledku abnormálnej mortality spôsobenej zjavnou toxicitou, ochorením alebo technickou chybou. Ak dôjde k narušeniu testovanej skupiny v dôsledku choroby alebo technickej chyby, na analýzu majú byť k dispozícii tri nenarušené testované skupiny s tromi nenarušenými replikátmi. Ak sa zjavná toxicita vyskytuje pri testovaných skupinách s vysokou dávkou, uprednostňuje sa, aby boli na účely analýzy k dispozícii aspoň tri úrovne koncentrácie chemikálie s tromi nenarušenými replikátmi [v súlade s prístupom na základe maximálnej tolerovanej koncentrácie pri usmerneniach OECD na vykonávanie testov (34)]. Okrem úhynu môžu medzi známky zjavnej toxicity patriť účinky na správanie (napr. plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu), morfologické lézie (napr. hemoragické lézie, opuch brucha) alebo inhibícia normálnych reakcií na kŕmenie pri kvalitatívnom porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Kontrola s rozpúšťadlom

63. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálnych vplyvov rozpúšťadla (ak sa použilo). To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolnej skupiny s vodou na riedenie. Medzi najrelevantnejšie sledované parametre na posúdenie v rámci tejto analýzy patria faktory rastu (hmotnosť a dĺžka), keďže na ne môžu mať vplyv celkové toxicity. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s vodou na riedenie a kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, je potrebné na základe najlepšieho odborného úsudku určiť, či nedošlo k narušeniu platnosti testu. Ak sa tieto dve kontroly líšia, testované skupiny vystavené chemikálii sa majú porovnať s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla, pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie s kontrolou s vodou na riedenie. Ak neexistuje štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvomi kontrolnými skupinami, odporúča sa, aby sa testované skupiny vystavené testovanej chemikálii porovnali so zoskupenými kontrolami (kontrolné skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a s vodou na riedenie), pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie buď len s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie, alebo len s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla.

Správa o teste

64. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— Jednozložkové látky:

fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organického uhlíka, ak to je vhodné).

— Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovaný druh:

— vedecký názov, kmeň, ak je dostupný, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.

— Výskyt skoliózy v historických kontrolách pri použitej zásobnej kultúre.

Podmienky testu:

— fotoperiódy,

— koncepcia testu (napr. veľkosť a materiál komory a objem vody, počet testovacích komôr a replikátov, počet testovaných organizmov na replikát),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),

— metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),

— miera výťažnosti metódy a nominálne testované koncentrácie, kvantifikačný limit, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úrovne zvyškového chlóru (ak boli merané), celkový obsah jódu, celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), nerozpustené pevné látky (ak boli merané), salinita v testovacom médiu (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,

— nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky,

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, teplota (meraná denne) a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky:

— dôkaz, že kontroly splnili kritériá validity,

— tieto údaje pre kontrolu (plus kontrolu s aplikáciou rozpúšťa, ak sa použila) a testované skupiny: pozorovaná mortalita a abnormality, čas do NF štádia 62, posúdenie histológie štítnej žľazy (len vzorka v larválnom štádiu), rast (hmotnosť a dĺžka), LSI (len juvenilná vzorka), pomery genetických/fenotypových pohlaví (len juvenilná vzorka), výsledky histopatologického posúdenia gonád, reprodukčných trubíc, obličky a pečene (len juvenilná vzorka) a VTG v plazme (len juvenilná vzorka, ak sa skúmalo),

— prístup uplatnený pri štatistickej analýze a spracovaní údajov (použitý štatistický test alebo model),

— koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) pre každú posudzovanú reakciu,

— najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) (pri $\alpha = 0,05$) pre každú posudzovanú reakciu; v prípade potreby hodnota ECx pre každú posudzovanú reakciu vrátane intervalov spoľahlivosti (napr. 95 %) a grafu zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky závislosti veličiny od koncentrácie, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby,

— akákoľvek odchýlka od testovacej metódy a odchýlky od kritérií prijateľnosti a úvahy o možných dôsledkoch v súvislosti s výsledkom testu.

65. V prípade výsledkov merania sledovaných parametrov sa uvádzajú priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky (na základe replikátov aj koncentrácií, ak je to možné).

66. Vypočíta sa medián času do NF štádia 62 v kontrolách, ktorý sa uvádza ako stredná hodnota mediánov replikátov a ich štandardnej odchýlky. Podobne sa v prípade testovaných skupín vypočíta medián testovanej skupiny, ktorý sa uvádza ako stredná hodnota mediánov replikátov a ich štandardnej odchýlky.

LITERATÚRA

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16 – 27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Kapitola C.4 tejto prílohy, Test ľahkej biodegradovateľnosti.

(18) Kapitola C.29 tejto prílohy, Ľahká biodegradovateľnosť – CO_2 v hermeticky uzavretých nádobách (test v uzavretom priestore nad kvapalinou).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., s. 84

(25) Kapitola C.38 tejto prílohy, Skúška metamorfózy obojživelníkov.

(26) Kapitola C.48 tejto prílohy, Krátkodobý reprodukčný test na rybách.

(27) Kapitola C.41 tejto prílohy, Test pohlavného vývinu rýb.

(28) Kapitola C.49 tejto prílohy, Test akútnej toxicity na rybích embryách (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Koncový sledovaný parameter: účinok pôsobiaci na úrovni populácie.

Chemikália: látka alebo zmes.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie

ECx: (účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného obdobia expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC50 je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzeného obdobia expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

dpf: dni po oplodnení

Prietokový test: test s neustálym prietokom testovaných roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Os HPG: os hypotalamus – hypofýza – gonády

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC). Usmernenie sa uvádza v dodatku 7.

Stredná letálna koncentrácia (LC50): predstavuje koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovaných organizmov počas trvania testu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC): je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného obdobia expozície.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

VTG: vitelogenín. Je to fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

Dodatok 2

NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

Látka	Koncentračný limit
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

Dodatok 3

PODMIENKY TESTU PRI SKÚŠKE LAGDA

1. Testovaný druh	*Xenopus laevis*
2. Typ testu	s nepretržitým prietokom
3. Teplota vody	Nominálna teplota je 21 °C. Priemerná teplota vody počas trvania testu je 21 ±1 °C (rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 1,0 °C).
4. Kvalita osvetlenia	Fluorescenčné svietidlá (so širokým spektrom) 600 – 2 000 luxov (lúmenov/m^2) na hladine vody
5. Fotoperióda	12 hodín svetla a 12 hodín tmy
6. Objem testovaného roztoku a testovacia nádoba (nádrž)	4 – 10 l (hĺbka vody najmenej 10 – 15 cm) nádrž zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele
7. Výmeny objemu testovacích roztokov	neustále, s cieľom zachovať biologické podmienky a expozíciu chemikáliám (napr. 5 obnovení objemu za deň)
8. Vek testovaných organizmov na začiatku	Nieuwkoopovo a Faberovo (NF) štádium 8 – 10
9. Počet organizmov na replikát	20 zvierat (embryí)/nádrž (replikát) na začiatku expozície a 10 zvierat (juvenilných jedincov)/nádrž (replikát) po NF štádiu 66 do skončenia expozície
10. Počet testovaných skupín	najmenej 4 skupiny s aplikovanou testovanou chemikáliou plus príslušné kontroly
11. Počet replikátov na testovanú skupinu	4 replikáty na skupinu s testovanou chemikáliou a 8 replikátov pre kontroly
12. Počet organizmov na testovanú koncentráciu	najmenej 80 zvierat na skupinu s testovanou chemikáliou a najmenej 160 zvierat pre kontroly
13. Voda na riedenie	akákoľvek voda, ktorá umožňuje normálny rast a vývoj druhu *X. laevis* (napr. pramenitá voda alebo voda z vodovodu filtrovaná cez aktívne uhlie)
14. Prevzdušňovanie	Nevyžaduje sa. Prevzdušňovanie nádrží však môže byť potrebné, ak úrovne koncentrácie rozpusteného kyslíka klesnú pod odporúčané limity, pričom sa zvyšuje pri maximalizovaní prietoku testovacieho roztoku.
15. Koncentrácia rozpusteného kyslíka v testovanom roztoku	Koncentrácia rozpusteného kyslíka: ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka alebo ≥ 3,5 mg/l

16. pH testovaného roztoku	6,5 – 8,5 (rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5)
17. Tvrdosť a alkalita testovaného roztoku	10 – 250 mg $CaCO_3$/l
18. Kŕmny režim	(pozri dodatok 4)
19. Obdobie expozície	od NF štádia 8 – 10 do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrolnej skupine s vodou a/alebo s aplikáciou rozpúšťadla (najviac 17 týždňov)
20. Biologické sledované parametre	mortalita (a vzhľadové abnormality), čas do NF štádia 62 (vzorka v larválnom štádiu), posúdenie histológie štítnej žľazy (vzorka v larválnom štádiu), rast (hmotnosť a dĺžka), index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (juvenilná vzorka), genetické/fenotypové pomery pohlaví (juvenilná vzorka), histopatológia gonád, reprodukčných trubíc, obličky a pečene (juvenilná vzorka) a vitelogenín v plazme (juvenilná vzorka, voliteľné)
21. Kritériá platnosti testu	Koncentrácia rozpusteného kyslíka má byť ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka; priemerná teplota vody má byť 21 ±1 °C a rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by mali byť < 1,0 °C; pH testovacieho roztoku má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5; mortalita v kontrolách má byť ≤ 20 % pri každom replikáte a priemerný čas do NF štádia 62 v kontrole má byť ≤ 45 dní; priemerná hmotnosť testovaných organizmov v NF štádiu 62 a pri ukončení skúšky v kontrolách a kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (ak sa používajú) má dosiahnuť1,0 ±0,2, resp. 11,5 ±3 g; malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % stredných nameraných hodnôt.

Dodatok 4

KŔMNY REŽIM

Je potrebné poznamenať, že hoci sa odporúča tento kŕmny režim, možné sú aj alternatívy za predpokladu, že testované organizmy vhodným tempom rastú a vyvíjajú sa.

Kŕmenie lariev

Príprava potravy pre larvy

A) štartovacie krmivo pre pstruhy a riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo) v objemovom pomere 1:1;

1. štartovacie krmivo pre pstruhy: mixujte 50 g štartovacieho krmiva pre pstruhy (jemné granule alebo prášok) a 300 ml vhodnej filtrovanej vody 20 sekúnd pri vysokých otáčkach mixéra;

2. zmes rias/krmiva TetraFin® (alebo ekvivalentného krmiva): mixujte 12 g diskov z rias spirulina a 500 ml filtrovanej vody 40 sekúnd pri vysokých otáčkach mixéra, zmixujte 12 g krmiva Tetrafin® (alebo ekvivalentného krmiva) s 500 ml filtrovanej vody a potom zmiešajte tieto zmesi, aby ste získali 1 liter zmesi s obsahom 12 g/l rias spirulina a 12 g/l krmiva Tetrafin® (alebo ekvivalentného krmiva),

3. zmiešajte rovnaké objemy zmixovaného štartovacieho krmiva pre pstruhy a zmesi rias/krmiva TetraFin® (alebo ekvivalentného krmiva);

B) Žiabronôžka soľná:

15 ml vajíčok žiabronôžky soľnej sa nechá vyliahnuť v 1 litri slanej vody (pripravenej pridaním 20 ml NaCl do 1 litra deionizovanej vody). Po prevzdušňovaní v trvaní 24 hodín pri izbovej teplote a stálom svetle sa zozbierajú jedince žiabronôžky soľnej. Jedince žiabronôžky soľnej sa nechajú usadiť počas 30 minút tým, že sa zastaví prevzdušňovanie. Cysty, ktoré plávajú navrchu nádoby, sa zlejú a vyradia a jedince žiabronôžky soľnej sa prelejú cez vhodné filtre a zmiešajú sa s filtrovanou vodou, aby sa dosiahol objem 30 ml.

Protokol kŕmenia

V tabuľke 1 sa uvádzajú referenčné informácie týkajúce sa typu a množstva krmiva použitého počas larválnych štádií expozície. Zvieratá sa kŕmia trikrát denne od pondelka do piatka a raz denne počas víkendov.

Tabuľka 1

Kŕmny režim lariev druhu *X. laevis* v prietokových podmienkach

Čas (*) (po oplodnení)	Štartovacie krmivo pre pstruhy: riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo)		Žiabronôžka soľná	
	Pracovný deň (trikrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)	Pracovný deň (dvakrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)
4. – 14. deň (v 0. – 1. týždni)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dňa) 1 ml (od 16. dňa)	0,5 ml (od 8. do 15. dňa) 1 ml (od 16. dňa)
2. týždeň	0,67 ml	2,4 ml		
3. týždeň	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. týždeň	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Čas (*) (po oplodnení)	Štartovacie krmivo pre pstruhy: riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo)		Žiabronôžka soľná	
	Pracovný deň (trikrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)	Pracovný deň (dvakrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)
5. týždeň	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. týždeň	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. týždeň	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8. – 10. týždeň	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) 0. deň sa vymedzuje ako deň injekčného podania hCG.

Prechod od stravy pre larvy k strave pre juvenilné jedince

Keď sa pri larvách dokončí metamorfóza, prechádzajú na zloženie potravy pre juvenilné jedince vysvetlené ďalej. V priebehu tohto prechodu sa obmedzuje potrava pre larvy a zvyšuje sa objem krmiva pre juvenilné jedince. Možno to dosiahnuť pomerným znižovaním potravy pre larvy a súčasným pomerným zvyšovaním potravy pre juvenilné jedince, keď každá skupina piatich žubrienok prekročí NF štádium 62 a priblíži sa dokončeniu metamorfózy v NF štádiu 66.

Kŕmenie juvenilných jedincov

Potrava pre juvenilné jedince

Po dokončení metamorfózy (štádium 66) dôjde k zmene kŕmneho režimu, aby obsahoval len prémiové vodné krmivo pre žaby s veľkosťou 3/32 palca (Xenopus Express™, FL, USA) alebo ekvivalentné krmivo.

Príprava drvených peliet na prechod z larválneho do juvenilného štádia

Pelety vodného krmiva pre žaby sa krátko pomelú v mlynčeku na kávu, mixéri alebo sa rozdrvia pomocou trecej misky a paličky, aby sa zmenšila ich veľkosť približne o tretinu. Pri príliš dlhom spracúvaní sa krmivo zmení na prášok, čo sa neodporúča.

Protokol kŕmenia

V tabuľke 2 sa uvádzajú referenčné informácie týkajúce sa typu a množstva krmiva použitého počas vývojových štádií juvenilných a dospelých jedincov. Zvieratá sa kŕmia raz denne. Je potrebné poznamenať, že počas toho, ako pri zvieratách prebieha metamorfóza, aj naďalej čiastočne prijímajú žiabronôžku soľnú v potrave, až kým sa pri > 95 % zvierat neukončí metamorfóza.

V deň ukončenia testu sa zvieratá nemajú kŕmiť, aby nedošlo k zneprehľadneniu meraní hmotnosti v dôsledku prijatej potravy.

Tabuľka 2

Kŕmny režim juvenilných jedincov druhu *X. laevis* v prietokových podmienkach. Je potrebné poznamenať, že zvieratá, pri ktorých neprebehla metamorfóza, vrátane tých, pri ktorých sa metamorfóza oneskorila v dôsledku aplikovania chemikálie, nemôžu konzumovať nerozdrvené pelety

Čas (*) (týždne po mediáne dátumu metamorfózy)	Rozdrvené pelety (mg na malú žabu)	Celé pelety (mg na malú žabu)
Pri dokončení metamorfózy pri zvieratách	25	0
0. – 1. týždeň	25	28
2. – 3. týždeň	0	110
4. – 5. týždeň	0	165
6. – 9. týždeň	0	220

(*) Prvý deň 0. týždňa predstavuje medián dátumu metamorfózy pri kontrolných zvieratách.

Dodatok 5

URČENIE GENETICKÉHO POHLAVIA (GENETICKÉ ROZLIŠOVANIE POHLAVIA)

Metóda genetického rozlišovania pohlavia druhu *Xenopus laevis* vychádza z práce Yoshimota a kol., 2008. Podrobné postupy týkajúce sa genotypizácie možno v prípade potreby získať z tejto publikácie. Možno použiť aj alternatívne metódy (napr. vysokovýkonnú metódu qPCR), ak sa považujú za vhodné.

Primery druhu X. laevis

Marker DM-W

Priamy: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverzný: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitívna kontrola

Priamy: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverzný: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Čistenie DNA

Vykonajte čistenie DNA zo svalového alebo z kožného tkaniva napr. pomocou súpravy Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kat. č. 69 506) alebo podobného produktu podľa pokynov dodaných so súpravou. DNA možno eluovať z centrifugačných kolón pomocou menšieho objemu tlmivého roztoku, aby sa získali koncentrovanejšie vzorky, ak sa to považuje za potrebné na účely polymerázovej reťazovej reakcie. DNA je pomerne stabilná, preto je potrebné dbať na to, aby sa predišlo krížovej kontaminácii, ktorá by mohla viesť k nesprávnej charakterizácii samcov ako samíc a naopak.

Polymerázová reťazová reakcia

Vzorový protokol s využitím súpravy JumpStart™ *Taq* od spoločnosti Sigma sa uvádza v **tabuľke 1**.

Tabuľka 1

Vzorový protokol s využitím súpravy JumpStart™ *Taq* od spoločnosti Sigma

Hlavná zmes (Master Mix)	1x (µl)	[konečná]
NFW (*)	11	—
Tlmivý roztok 10X	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (každý 10 mM)	0,4	200 µM
Marker pre primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker pre rev. primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pre primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pre rev. primer (8 µM)	0,8	0,3 µM

Hlavná zmes (Master Mix)	1x (µl)	[konečná]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednotky/µl
Matrica DNA	1,0	~200 pg/µl

(*) Voda bez nukleázy.
Poznámka: Pri príprave hlavných zmesí (Master Mix) pripravte určité množstvo naviac, aby bolo možné nahradiť prípadné straty pri pipetovaní (príklad: 25 dávok sa použije na 24 reakcií).

Reakcia:

Hlavná zmes (Master Mix)	19,0 µl
Matrica	1,0 µl
Spolu	20,0 µl

Profil termocykléra

Krok 1.	94 °C	1 min
Krok 2.	94 °C	30 s
Krok 3.	60 °C	30 s
Krok 4.	72 °C	1 min
Krok 5.	Prechod na krok 2.	35 cyklov
Krok 6.	72 °C	1 min
Krok 7.	4 °C	udržiavať

Produkty PCR možno použiť okamžite v géli alebo ich uskladniť pri teplote 4 °C.

Elektroforéza na agarózovom géli (3 %) (vzorový protokol)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ľadová kyselina octová	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Doplňte vodu do 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agaróza 3:1

3 diely agarózy NuSieve™ GTG™

1 diel agarózy Fisher s nízkou elektroendoosmózou (EEO)

Metóda

1. Pripravte 3 % gél pridaním 1,2 g zmesi agarózy k 43 ml 1X TAE. Krúživým pohybom premiešajte, aby sa rozpadli veľké zhluky.

2. Zahrievajte zmes agarózy, až kým sa úplne nerozpustí (zabráňte tomu, aby zovrela). Nechajte mierne vychladnúť.

3. Pridajte 1,0 µL etídiumbromidu (10 mg/ml). Krúživým pohybom premiešajte obsah banky. Etídiumbromid je mutagénny, preto sa majú v tomto kroku používať alternatívne chemikálie, pokiaľ je to technicky možné, aby sa minimalizovali riziká pre zdravie pracovníkov ([1]).

4. Nalejte gél do foriem s hrebeňom. Nechajte úplne vychladnúť.

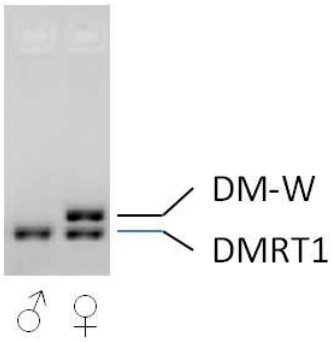
5. Pridajte gél do prístroja. Pokryte gél pomocou 1X TAE.

6. Pridajte 1 µl 6x nanášacieho farbiva na každých 10 µl produktu PCR.

7. Pomocou pipety rozdeľte vzorky do jamiek.

8. Spracúvajte pri konštantnom napätí 160 voltov približne 20 minút.

Na **obrázku 1** je zobrazený agarózový gél s pruhovými vzormi, ktoré označujú samčie a samičie jedince.



Obrázok 1: Obrázok agarózového gélu s pruhovým vzorom, ktorý označuje samčieho (♂) jedinca (jeden pruh ~203 bp: DMRT1) a samičieho (♀) jedinca (dva pruhy ~259 bp: DM-W a 203 bp: DMRT1).

LITERATÚRA

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]) V súlade s článkom 4.1 smernice Európskeho parlamentu a Rady 2004/37/ES z 29. apríla 2004 o ochrane pracovníkov pred rizikami z vystavenia účinkom karcinogénov alebo mutagénov pri práci (šiesta samostatná smernica v zmysle článku 16 ods. 1 smernice Rady 89/391/EHS) (Ú. v. EÚ L 158, 30.4.2004, s. 50).

Dodatok 6

MERANIE VITELOGENÍNU

Na meranie vitelogenínu (VTG) sa používa enzýmové imunosorbentové stanovenie (ELISA), ktoré bolo pôvodne vyvinuté na účely stanovenia VTG v prípade čereble potočnej (Parks a kol., 1999). V súčasnosti neexistujú komerčne dostupné protilátky pre druh *X. laevis*. Vzhľadom na dostatok informácií o tomto proteíne a dostupnosť nákladovo efektívnych komerčných služieb na produkciu protilátok však možno primerane predpokladať, že v laboratóriách možno jednoducho použiť metódu ELISA na uskutočnenie tohto merania (Olmstead a kol., 2009). V zdroji Olmstead a kol. (2009) sa opisuje aj úprava tejto skúšky na meranie VTG pri druhu *X. tropicalis*, ktorá sa uvádza ďalej. V tejto metóde sa používa protilátka vytvorená proti VTG druhu *X. tropicalis*, je však známe, že účinkuje aj proti VTG druhu *X. laevis*. Je potrebné poznamenať, že možno používať aj nekompetitívne metódy ELISA a že tieto metódy môžu mať nižší detekčný limit než metóda opísaná ďalej.

Materiály a činidlá

— vopred adsorbované sérum s prvou protilátkou (Ab),

— Zmiešajte 1 diel séra s prvou protilátkou proti VTG druhu *X. tropicalis* s 2 dielmi kontrolnej samčej plazmy a nechajte približne 75 minút pri izbovej teplote, položte na ľad na 30 minút, odstreďujte 1 hodinu pri > 20 000 g pri teplote 4 °C, odstráňte supernatant, rozdeľte na alikvoty a uskladnite pri teplote −20 °C.

— druhá protilátka,

— kozí anti-králičí IgG-HRP konjugát (napr. Bio-Rad 172-1019),

— štandard VTG,

— čistený VTG druhu *X. laevis* s koncentráciou 3,3 mg/ml,

— TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidín) (napr. KPL 50-76-00 alebo Sigma T0440),

— normálne kozie sérum (NGS)(napr. Chemicon® S26 – 100 ml),

— 96-jamkové polystyrénové mikrotitračné platničky EIA (napr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— hybridizačná pec s teplotou 37 °C (alebo inkubátor s rýchlym dosahovaním rovnováhy vzduchu) pre mikrotitračné platničky, vodný kúpeľ pre skúmavky,

— ďalšie bežné laboratórne vybavenie, chemikálie a spotrebný materiál.

Postupy

Krycí tlmivý roztok (50 mM uhličitanový tlmivý roztok, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfát, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

Premývací tlmivý roztok (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Upravte pH na 7,3 pomocou 1 M HCl, potom pridajte 0,5 ml Tween-20

Tlmivý skúšobný roztok:

normálne kozie sérum (NGS)	3,75 ml
premývací tlmivý roztok	146,25 ml

Odber vzoriek

Krv sa odoberie pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapiláry a umiestni sa na ľad. Po centrifugácii v trvaní 3 minúty sa kapilára posúdi, rozlomením sa otvorí a plazma sa premiestni do skúmaviek mikroodstredivky s objemom 0,6 ml, ktoré obsahujú 0,13 jednotky lyofilizovaného aprotinínu. (Tieto skúmavky sa pripravia vopred pridaním vhodného objemu aprotinínu, zmrazením a lyofilizovaním v zariadení speed-vac s nízkou úrovňou tepla až do vysušenia.) Plazmu uskladnite pri teplote −80 °C až do analyzovania.

Postup pre jednu mikrotitračnú platničku

Vytvorenie krycej vrstvy na mikrotitračnej platničke

Zmiešajte 20 µl čisteného VTG s 22 ml uhličitanového tlmivého roztoku (konečná koncentrácia 3 µg/ml). Pridajte 200 µl do jednotlivých jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. Zakryte mikrotitračnú platničku pomocou priľnavej tesniacej fólie a nechajte ju inkubovať dve hodiny pri teplote 37 °C (alebo cez noc pri teplote 4 °C).

Blokovanie mikrotitračnej platničky

Blokujúci roztok sa pripraví pridaním 2 ml normálneho kozieho séra (NGS) do 38 ml uhličitanového tlmivého roztoku. Odstráňte krycí roztok a osušte pretrepávaním. Do každej jamky pridajte 350 µl blokujúceho roztoku. Zakryte pomocou priľnavej tesniacej fólie a inkubujte dve hodiny pri teplote 37 °C (alebo cez noc pri teplote 4 °C).

Príprava štandardov

5,8 µl čisteného VTG štandardu sa zmieša s 1,5 ml tlmivého skúšobného roztoku v jednorazovej borosilikátovej sklenenej skúmavke s rozmermi 12 ×75 mm. Dosiahne sa tak koncentrácia 12 760 ng/ml. Potom sa uskutoční sériové riedenie pridaním 750 µl predchádzajúceho riedenia k 750 µl tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahli konečné koncentrácie 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 a 50 ng/ml.

Príprava vzoriek

Začnite riedením plazmy do tlmivého skúšobného roztoku v pomere 1:300 (napr. zmiešaním 1 µl plazmy s 299 µl tlmivého skúšobného roztoku) alebo v pomere 1:30. Ak sa očakáva veľké množstvo VTG, môžu byť potrebné ďalšie alebo väčšie riedenia. Usilujte sa udržiavať hodnotu B/B_o v rozsahu štandardov. V prípade vzoriek bez značného obsahu VTG, napr. v prípade kontrolných samcov a samíc (ktoré sú všetky nezrelé), použite riedenie v pomere 1:30. Pri vzorkách s menším než uvedeným riedením sa môžu prejavovať nežiaduce matricové efekty.

Navyše sa odporúča na každej mikrotitračnej platničke testovať aj pozitívnu kontrolnú vzorku. Táto vzorka pochádza zo zásoby plazmy, ktorá obsahuje vysoké indukované úrovne VTG. Táto zásoba sa najskôr zriedi v NGS, rozdelí sa na alikvoty a uskladní sa pri teplote −80 °C. Pre každú mikrotitračnú platničku sa alikvot rozmrazí, ďalej sa zriedi v tlmivom skúšobnom roztoku a testuje sa podobne ako testovacia vzorka.

Inkubácia s prvou protilátkou

Prvá protilátka sa pripraví zriedením vopred adsorbovaného séra s prvou protilátkou v tlmivom skúšobnom roztoku v pomere 1:2000 (napr. 8 µl na 16 ml tlmivého skúšobného roztoku). V sklenenej skúmavke zmiešajte 300 µl roztoku prvej protilátky s 300 µl vzorky/štandardu. Podobne sa pripraví skúmavka B_o, ktorá obsahuje 300 µl tlmivého skúšobného roztoku a 300 µl protilátky. Pripraví sa aj skúmavka NSB, ktorá obsahuje len 600 µl tlmivého skúšobného roztoku, t. j. žiadne protilátky. Uzatvorte skúmavky a opatrne ich zmiešajte pretrepaním. Inkubujte 1 hodinu vo vodnom kúpeli s teplotou 37 °C.

Premytie mikrotitračnej platničky

Bezprostredne pred dokončením inkubácie prvej protilátky vykonajte premytie mikrotitračnej platničky. Dosiahnete to pretrepaním obsahu a vysušením dotykom savého papiera. Potom naplňte jamky 350 µl premývacieho roztoku, zlejte ho a platničku osušte. Pri tomto postupe je užitočná viackanálová opakovacia pipeta alebo premývač mikrotitračnej platničky. Krok premytia sa zopakuje ešte dvakrát, aby sa spolu uskutočnili tri premytia.

Naplnenie mikrotitračnej platničky

Po premytí mikrotitračnej platničky vyberte skúmavky z vodného kúpeľa a zľahka ich pretrepte. Do zdvojených jamiek na mikrotitračnej platničke pridajte 200 µl z každej skúmavky vzorky, štandardu, B_o a NSB. Zakryte mikrotitračnú platničku pomocou priľnavej tesniacej fólie a nechajte ju inkubovať 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Inkubácia s druhou protilátkou

Na konci inkubácie v predchádzajúcom kroku je potrebné mikrotitračnú platničku znovu trikrát premyť, ako bolo opísané vyššie. Zriedená druhá protilátka sa pripraví zmiešaním 2,5 µl druhej protilátky s 50 ml tlmivého skúšobného roztoku. Pridajte 200 µl zriedenej druhej protilátky do každej jamky, uzatvorte podľa predchádzajúceho opisu a inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Pridanie substrátu

Po dokončení inkubácie s druhou protilátkou trikrát premyte mikrotitračnú platničku podľa predchádzajúceho opisu. Potom do každej jamky pridajte 100 µl substrátu TMB. Nechajte reakciu prebiehať 10 minút, podľa možnosti mimo ostrého svetla. Zastavte reakciu pridaním 100 µl 1 M kyseliny fosforečnej. Spôsobí to zmenu farby z modrej na intenzívnu žltú. Pomocou snímača mikrotitračných platničiek zmerajte absorbanciu pri 450 nm.

Výpočet B/Bo

Od všetkých meraní odpočítajte priemernú hodnotu NSB. B/B_o pre každú vzorku a štandard sa vypočíta ako podiel hodnoty absorbancie (B) a priemernej absorbancie vzorky B_o.

Získanie krivky štandardov a určenie neznámych množstiev

Vytvorte krivku štandardov pomocou počítačového softvéru na tvorbu grafov (napr. Slidewrite™ alebo Sigma Plot®), ktorým sa extrapoluje množstvo z hodnoty B/B_o vzorky na základe hodnoty B/B_o štandardov. Toto množstvo sa zvyčajne znázorní v logaritmickej mierke a krivka bude mať sigmoidálny tvar. Pri použití úzkeho rozsahu štandardov však môže vyzerať lineárna. Vykonajte korekciu množstiev vzorky na základe faktora riedenia a uveďte ich v mg VTG/ml plazmy.

Stanovenie minimálnych detekčných limitov (MDL)

Najmä pri normálnych samcoch často nebude zrejmé, akým spôsobom prezentovať výsledky pri nízkych hodnotách. V takých prípadoch je potrebné pomocou 95 % hraníc spoľahlivosti potrebné určiť, či sa má hodnota uviesť ako nula alebo ako iné číslo. Ak sa výsledok vzorky nachádza v rámci intervalu spoľahlivosti nulového štandardu (B_o), výsledok sa uvádza ako nula. Minimálna úroveň detekcie bude predstavovať najnižší štandard, ktorý sa stabilne odlišuje od nulového štandardu, čo znamená, že sa tieto dva intervaly spoľahlivosti neprekrývajú. Pri každom výsledku vzorky, ktorý je v rámci hranice spoľahlivosti minimálnej úrovne detekcie alebo nad ňou, sa uvádza vypočítaná hodnota. Ak vzorka spadá medzi intervaly spoľahlivosti nulového štandardu a minimálnej úrovne detekcie, jedna polovica minimálnej úrovne detekcie sa má uvádzať ako hodnota tejto vzorky.

LITERATÚRA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117 – 123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113 – 125.

Dodatok 7

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

V rámci skúšky LAGDA sa vytvárajú tri druhy údajov, ktoré sa majú štatisticky analyzovať: 1. kvantitatívne spojité údaje; 2. údaje vyjadrujúce čas do udalosti pri tempe vývoja (čas do NF štádia 62) a 3. poradové údaje v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií z histopatologických hodnotení. Odporúčaná schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy pre skúšku LAGDA sa uvádza na obrázku 1. Ďalej sú uvedené aj niektoré poznámky, ktoré môže byť potrebné zohľadniť pri vykonávaní štatistickej analýzy meraní zo skúšky LAGDA. Podľa schémy rozhodovania z hľadiska analýzy sa výsledky meraní mortality, rastu (hmotnosť a dĺžka) a indexu pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI) analyzujú na základe vetvy „Iné sledované parametre“.

Spojité údaje

V prípade údajov pre spojité sledované parametre je potrebné najskôr overiť ich monotónnosť pomocou transformácie údajov podľa poradia, dosadením do modelu ANOVA a porovnaním lineárnych a kvadratických kontrastov. Ak sú údaje monotónne, uskutoční sa Jonckheerov-Terpstrov test trendu na mediánoch replikátov a nepoužijú sa žiadne ďalšie analýzy. Alternatívu pre údaje s normálnym rozdelením a homogénnymi rozptylmi predstavuje step-down Williamsov test. Ak údaje nie sú monotónne (kvadratický kontrast je významný a lineárny kontrast nie je významný), majú sa analyzovať pomocou modelu ANOVA so zmiešanými účinkami. Ďalej sa pri údajoch posudzuje normalita (podľa možnosti pomocou Shapirovho-Wilkovho alebo Andersonovho-Darlingovho testu) a homogenita rozptylu (podľa možnosti pomocou Levenovho testu). Oba testy sa uskutočňujú na rezíduách modelu ANOVA so zmiešanými účinkami. Namiesto týchto formálnych testov normality a homogenity rozptylu možno použiť odborný posudok, ale uprednostňujú sa formálne testy. Ak majú údaje normálne rozdelenie s homogénnymi rozptylmi, sú splnené predpoklady analýzy ANOVA so zmiešanými účinkami a významný účinok testovanej chemikálie sa stanoví na základe Dunnettovho testu. Ak sa zistí nenormalita alebo heterogenita rozptylu, predpoklady Dunnettovho testu nie sú splnené a je potrebné vykonať normalizačnú transformáciu na stabilizáciu rozptylu. Ak sa takáto transformácia nenájde, významný účinok testovanej chemikálie sa stanoví na základe Dunnovho testu. Ak je to možné, má sa použiť jednostranný test namiesto dvojstranného testu. Pri stanovení toho, ktorý test je vhodný pre daný sledovaný parameter, sa však vyžaduje odborné posúdenie.

Mortalita

Údaje o mortalite sa analyzujú za časové obdobie zahŕňajúce celý test a vyjadrujú sa ako podiel uhynutých jedincov v príslušnej nádrži. Žubrienky, pri ktorých sa v danom časovom rámci nedokončila metamorfóza, žubrienky, ktoré sú v kohorte podvzorky jedincov v larválnom štádiu, juvenilné žaby vyradené v rámci selekcie a všetky zvieratá, ktoré uhynú v dôsledku chyby pri pokuse, sa považujú za cenzurované údaje a nie sú zahrnuté v menovateli pri výpočte percentuálnej hodnoty. Pred štatistickými analýzami sa má pri podieloch mortality uskutočniť arkussínusová transformácia druhej odmocniny. Alternatívne možno použiť step-down Cochranov-Armitageov test, prípadne s Raovou-Scottovou úpravou pri výskyte nadmerného rozptylu.

Hmotnosť a dĺžka (údaje o raste)

Samce a samice nie sú počas metamorfózy pohlavne dimorfné, preto sa údaje o raste podvzorky jedincov v larválnom štádiu majú analyzovať nezávisle od pohlavia. Údaje o raste juvenilných jedincov sa však analyzujú samostatne na základe genetického pohlavia. V prípade týchto sledovaných parametrov môže byť potrebná logaritmická transformácia, keďže logaritmická normalita údajov o veľkosti nie je nezvyčajná.

Index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI)

Hmotnosti pečene sa normalizujú ako podiel celkovej hmotnosti tela (t. j. LSI) a analyzujú sa oddelene na základe genetického pohlavia.

Čas do NF štádia 62

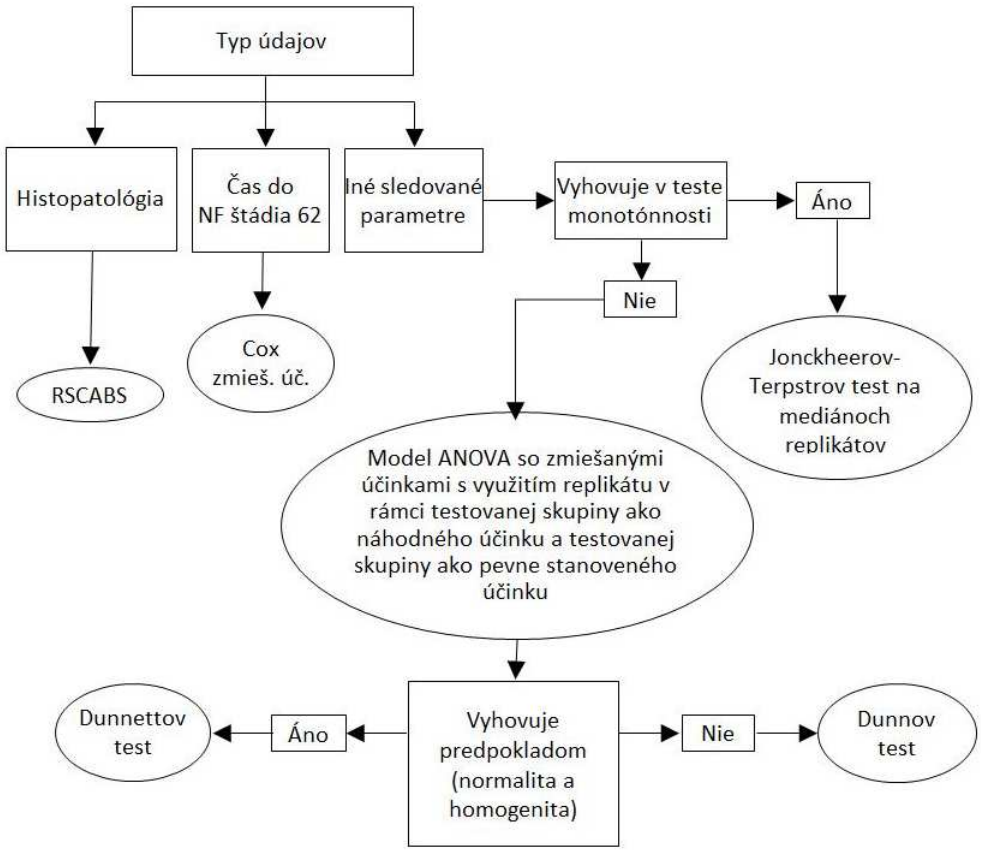
Údaje o čase do metamorfózy sa spracúvajú ako údaje o čase do udalosti, pričom úhyny alebo jedince, ktoré nedosiahli NF štádium 62 do 70 dní, sa považujú za cenzurované údaje po časovom limite (t. j. skutočná hodnota je väčšia ako 70 dní, ale štúdia sa končí pred tým, ako zvieratá dosiahnu NF štádium 62 do 70 dní). Na stanovenie času ukončenia testu sa má použiť medián času do dokončenia metamorfózy v NF štádiu 62 v kontrolách s vodou na riedenie. Medián času do dokončenia metamorfózy možno stanoviť pomocou Kaplanových-Meierových odhadov limitu súčinu. Tento sledovaný parameter sa analyzuje pomocou Coxovho modelu proporcionálnych rizík so zmiešanými účinkami, v ktorom sa zohľadňuje štruktúra štúdie s využitím replikátov.

Údaje týkajúce sa histopatológie (skóre závažnosti a vývojové štádiá)

Údaje týkajúce sa histopatológie sú v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií. V teste s označením RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) sa využíva step-down Cochranov-Armitageov test trendu s Raovou-Scottovou úpravou na jednotlivých úrovniach závažnosti histopatologickej reakcie (Green a kol., 2014). Pomocou Raovej-Scottovej úpravy sa do testu začleňuje koncepcia pokusu s využitím nádob s replikátmi. V postupe označenom ako „by Slices" je začlenené biologické očakávanie, že závažnosť účinku má tendenciu zvyšovať sa so zvyšujúcimi sa dávkami alebo koncentráciami, pričom sa zachovávajú skóre jednotlivých jedincov a preukazuje sa závažnosť každého zisteného účinku. Postupom RSCABS sa určuje nielen to, ktoré testované skupiny sa štatisticky odlišujú od kontrol (t. j. sú v nich závažnejšie patologické javy než pri kontrolách), ale aj to, pri akom skóre závažnosti k danému rozdielu dochádza, čím sa získava veľmi potrebný kontext pre analýzu. V prípade určovania vývojového štádia gonád a reprodukčných trubíc sa má pri údajoch použiť dodatočná manipulácia vzhľadom na predpoklad metódy RSCABS, že závažnosť účinku sa zvyšuje s dávkou. Pozorovaný účinok môže predstavovať oneskorenie alebo zrýchlenie vývoja. Údaje o určení vývojového štádia sa preto analyzujú tak, ako sú uvádzané, na zistenie zrýchlenia vývoja a potom sa manuálne invertujú pred druhou analýzou s cieľom zistiť oneskorenie vývoja.

Obrázok 1

Schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy pre údaje skúšky LAGDA



LITERATÚRA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108 – 1 116.

Dodatok 8

ÚVAHY TÝKAJÚCE SA SLEDOVANIA A MINIMALIZOVANIA VÝSKYTU SKOLIÓZY

Idiopatická skolióza, ktorej zvyčajným prejavom pri žubrienkach druhu *Xenopus laevis* je ohnutý chvost, môže komplikovať pozorovania morfológie a správania v testovaných populáciách. Je potrebné vyvinúť úsilie, aby sa minimalizoval alebo eliminoval výskyt skoliózy v chovnej populácii aj v testovacích podmienkach. V konečnom teste sa odporúča, aby bola prevalencia miernej a závažnej skoliózy nižšia ako 10 %, čím sa zlepší spoľahlivosť testu pri detekcii vývojových účinkov súvisiacich s testovanou chemikáliou v prípade inak zdravých lariev obojživelníkov.

Pri denných pozorovaniach počas konečného testu sa zaznamenáva výskyt (počet jednotlivých prípadov) a závažnosť skoliózy v prípade jej výskytu. Povahu abnormality je potrebné opísať vzhľadom na miesto (napr. pred alebo za kloakou) a smer zakrivenia (napríklad laterálne alebo dorzoventrálne). Závažnosť možno hodnotiť týmito stupňami:

(NR) Nepozorovaná: zakrivenie nie je prítomné

1. Minimálna: mierne laterálne zakrivenie za kloakou, viditeľné len v pokoji

2. Mierna: laterálne zakrivenie za kloakou, viditeľné neustále, ktoré však nebráni v pohybe

3. Závažná: laterálne zakrivenie pred kloakou ALEBO akékoľvek zakrivenie, ktoré bráni v pohybe, ALEBO akékoľvek dorzoventrálne zakrivenie

Vedecká poradná skupina Agentúry Spojených štátov na ochranu životného prostredia (FIFRA SAP 2013) preskúmala súhrnné údaje o skolióze v 15 skúškach metamorfózy obojživelníkov v prípade druhu *X. laevis* (NF štádium 51 až 60 a viac) a poskytla všeobecné odporúčania na zníženie prevalencie tejto abnormality v testovacích populáciách. Tieto odporúčania sú relevantné pre test LAGDA, hoci zahŕňa dlhší časový rámec vývoja.

Historická výkonnosť pri rozmnožovaní

Ako chovné páry sa majú vo všeobecnosti používať kvalitné a zdravé dospelé jedince. Eliminovaním chovných párov, ktorých potomstvo malo skoliózu, sa môže v priebehu času minimalizovať jej výskyt. Prospešné môže byť obzvlášť minimalizovanie využívania chovných populácií získaných vo voľnej prírode. Obdobie expozície v skúške LAGDA sa začína s embryami v NF štádiu 8 až 10 a na začiatku testu nie je možné určiť, či sa pri daných jedincoch vyskytne skolióza. Okrem sledovania výskytu skoliózy pri zvieratách zaradených do testu je potrebné zdokumentovať aj historickú výkonnosť násady (vrátane prevalencie skoliózy pri larvách, ktorým sa umožní, aby sa vyvíjali). Môže byť užitočné ďalej monitorovať tú časť násady, ktorá sa v danej štúdii nepoužije, a uviesť tieto pozorovania (FIFRA SAP 2013).

Kvalita vody

Je dôležité zabezpečiť primeranú kvalitu vody v laboratórnej chovnej populácii aj počas testu. Okrem kritérií kvality vody, ktoré sa bežne hodnotia v testoch vodnej toxicity, môže byť užitočné monitorovať a korigovať nedostatok živín (napr. nedostatok vitamínu C, vápnika, fosforu) alebo nadmerné úrovne selénu a medi, ktoré sa uvádzajú ako príčina vzniku rôznych stupňov skoliózy pri laboratórne chovaných zvieratách rodu *Rana* a *Xenopus* (Marshall a kol. 1980; Leibovitz a kol. 1992; Martinez a kol. 1992; ako uvádza FIFRA SAP 2013). Použitím vhodného režimu kŕmenia (pozri dodatok 4) a pravidelným čistením nádrží sa vo všeobecnosti zlepší kvalita vody a zdravie jedincov, ktoré predstavujú testovacie vzorky.

Potrava

V dodatku 4 sú podrobne opísané konkrétne odporúčania pre režim kŕmenia, ktorý sa osvedčil v skúške LAGDA. Odporúča sa, aby sa overovalo, či zdroje krmiva neobsahujú biologické toxíny, herbicídy a iné pesticídy, o ktorých je známe, že spôsobujú skoliózu pri druhu *X. laevis* alebo pri iných vodných živočíchoch (Schlenk a Jenkins 2013). Napríklad, expozícia určitým inhibítorom butyrylcholínesterázy sa spája so skoliózou pri rybách (Schultz a kol. 1985) a pri žabách (Bacchetta a kol. 2008).

LITERATÚRA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185 – 198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322 – 328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445 – 453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314 – 320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013 – 03. May 21-23, 2013. Washington, DC.“