



**EUROOPA LIIDU
NÕUKOGU**

**Brüssel, 20. jaanuar 2012 (23.01)
(OR. en)**

**5596/12
ADD 1**

**COMPET 31
ENV 35
CHIMIE 3
MI 37
ENT 15**

SAATEMÄRKUSED

Saatja:	Euroopa Komisjon
Kättesaamise kuupäev:	19. jaanuar 2012
Saaja:	Nõukogu peasekretariaat
Teema:	Eelnõu lisa: KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr .../..., XXX, millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määrust (EÜ) nr 440/2008, millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

Käesolevaga edastatakse delegatsioonidele komisjoni dokumendi D018298/01 lisa.

Lisatud: D018298/01 lisa

LISA

Määruse (EÜ) nr 440/2008 lisa muudetakse järgmiselt.

1. Peatükk B.42 asendatakse järgmisega:

„B.42. Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja nendel põhinevaid ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Varem on vastu võetud originaalkatsemeetod hiire naha sensibiliseerimise määramiseks lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429; käesoleva lisa peatükk B.42) (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Ajakohastatud LLNA põhineb katse- ja teaduslike andmete hindamisel (12). See on teine katsemeetod, mis on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Teise meetodi puhul (OECD katsejuhend 406, käesoleva lisa peatükk B.6) kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13). LLNA on B.6 ja OECD katsejuhendiga 406 (13) võrreldes loomade heaoluga seotud eeliseid. Käesolev LLNA juhend hõlmab tulemuslikkusnõudeid (1. liide), mida võib kasutada selliste uute ja/või modifitseeritud katsemeetodite valideerimisolukorra hindamiseks, mis on tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnased LLNaga, vastavalt OECD katsejuhendi nr 34 (14) põhimõtetele.

2. LLNaga uuritakse naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Tuleb märkida, et pehmed/mõõdukad sensibiliseerijad, mida soovitakse sobivate positiivse kontrolli kemikaalidena merisigade katsemeetodite jaoks (need on B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13), sobivad kasutamiseks ka LLNA puhul (6) (8) (15). Vähendatud LLNAd, mille puhul kasutatakse kuni 40 % vähem loomi, on kirjeldatud ühe võimalusena ka käesolevas katsemeetodis (16) (17) (18). Vähendatud LLNAd võib kasutada, kui on regulatiivne vajadus kinnitada naha sensibiliseerimise võime negatiivset ennustust; seejuures tuleb järgida kõiki muid LLNA katse-eeskirja üksikasju, nagu on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Negatiivse tulemuse ennustus peab põhinema kogu kättesaadaval teabel, nagu on kirjeldatud punktis 4. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui vähendatud LLNaga saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks. Vähendatud LLNAd ei tohiks kasutada ainete naha sensibiliseeriva toime ohu uurimiseks sellisel juhul, kui on vaja teavet annuse-immuunvastuse seose kohta, näiteks alakategooriatesse klassifitseerimiseks vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008 mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist, ning ÜRO ühtsele ülemaailmsele kemikaalide klassifitseerimis- ja märgistamissüsteemile.

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 2. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA on alternatiivne meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (12) asemel LLNAd, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist. Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalisi-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

5. LLNA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Siiski võimaldab see vähendada selleks vajalike loomade arvu. Lisaks võimaldab LLNA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi). LLNA põhineb sellel, et uuritakse kemikaalide immunoloogilist mõju sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal. Erinevalt merisigadega tehtavatest katsetest (s.o B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ei eelda LLNA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioonid. Samuti ei eelda LLNA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (13). Seega vähendab LLNA loomadele valu ja kannatuste tekitamist. Hoolimata LLNA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsetega võrreldes tuleks tunnistada, et on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsete kasutamise (nt LLNA valenegatiivid teatavate metallide puhul, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (19) (20) või probleemid uuritavate ainete lahustuvusega). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (21), olla vaja kasutada meriseakatseid (B.6 või OECD katsejuhend 406) (13). Kuna valideerimise andmebaas oli piiratud (eelkõige uuriti pestitsiidivorme), võib LLNA tõenäolisemalt kui meriseakatsed anda positiivse tulemuse sellist tüüpi uuritava aine puhul (22). Vormide uurimisel tuleks kaaluda seda, et võrdlusainena lisatakse sarnaseid aineid, mille tulemused on teada, et tõendada LLNaga saadavate tulemust õigsust (vt punkt 16). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNaga saadavate tulemuste õigsust.

KATSE PÕHIMÕTE

6. LLNA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis drenivad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 3 selleks, et uuritava aine võiks klassifitseerida võimalikuks naha sensibiliseerijaks. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad radioaktiivse märgise kasutamisel *in vivo*; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu

suurenemist kõrvalesta dreenevates lümfisõlmedes. Kuid vahavate rakkude arvu hindamiseks võib kasutada ka muid väljundeid tingimusel, et need täielikult vastavad tulemuslikkusnõuetele (1. liide).

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. Kasutatakse CBA/Ca või CBA/J liini noori täiskasvanud emahiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (23), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödaalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusväärse kontrolli

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Ka mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise

positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) üle kolme korra, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeks üle 20 on liiga suur). Eelistatavad positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service'i [CASi] nr 101-86-0) atsetooni-oliiviõli segus (4:1, v/v) ja 5 % merkaptobensotiasool (CASi nr 149-30-4) *N,N*-dimetüülformamiidis (vt 1. liide, tabel 1). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNA-d ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskusteaset LLNA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija) ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatсени uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (12).

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4:1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (24). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esilekutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

- struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

- teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;
- varasemad toetavad LLNA andmed;
- toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse sarnaselt katserühma loomadega, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.

18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes (3) ja (5) antud soovitusel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (3) (25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).

19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4:1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüüleetüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (19), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutuda vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ja ei voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 35). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (12). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Mõned reguleerivad asutused peavad vastuvõetavaks katseloomade koondandmeid ja siis võivad meetodi kasutajad valida, kas koguda iga üksiku looma andmeid või koondandmeid

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela uuritava aine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA põhikatses, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humanse surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26) (27). LLNA põhikatses jaoks valitud kõrgeim annus on järgmine madalam annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millele ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäära nahaärritust.

Tabel 1. Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26) (27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30) (32) (33) (34).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35) (36) võivad näidata järgmised kliinilised

tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordineerimise kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, rägina) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiseid või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaanselt surmata (37).

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine:

- 1. päev

Määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kumbagi kõrvaldest välisküljele kantakse 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeeritud või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).

- 2. ja 3. päev

Korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.

- 4. ja 5. päev

Loomi ei töödelda.

- 6. päev

Registreeritakse iga looma mass. Igale katse- ja kontrollrühma hiirele süstitakse sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) triitiumiga märgistatud ^3H -metüülümidiini. Asendusvõimalusena süstitakse kõikidele hiirtele sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jododesoksüridiini ja 10^{-5} M fluorodesoksüridiini. Viis tundi hiljem loomad surmatakse humaanselt. Igal katseloomal lõigatakse välja kumbagi kõrvaldest dreenevad lümfisõlmed ja töödeldakse neid koos fosfaatpuhvriga soolalahuses (üksiku katselooma lähenemisviis); asendusvõimalusena lõigatakse välja iga katseloomade rühma loomade kumbagi kõrvaldest dreenevad lümfisõlmed ja pannakse need kõik koos fosfaatpuhvriga soolalahusesse (iga katserühma ühendatud proovide lähenemisviis). Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (12). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvaldest punetuse hinnang või kõrvaldest paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksuse mõõtmisega või pärast surmamist kõrvaldestast mulgustajaga väljalöödud tüki massi mõõtmisega).

Rakususpensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga üksiku looma mõlemalt poolelt (üksiku katselooma lähenemisviis) või katserühma loomadelt (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis) väljalõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakususpensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 µm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse muud sobivat võtet üksikrakususpensiooni valmistamiseks. Lümfisõlmerakke pestakse kaks korda suure koguse fosfaatpuhvriga soolalahusega ja sadestatakse DNA 5 % trikloroäädikhappega 4 °C juures 18 tunni jooksul (3). Põhja tsentrifuugitud sade kas suspendeeritakse uuesti 1 ml trikloroäädikhappes ja kantakse 10 ml stsintillatsioonivedelikku sisaldavasse stsintillatsioonipudelisse ³H-loendamiseks või pannakse otse gammaloenduri torru ¹²⁵I-loendamiseks.

Rakkude vohamise määramine imendunud radioaktiivsuse järgi

27. ³H-metüültümidini imendumist mõõdetakse β-stsintillatsiooni loendamise teel lagunemiste arvuna minutis (*disintegrations per minute*, DPM). ¹²⁵I-jododesoksüridiini imendumist mõõdetakse ¹²⁵I-loendamise teel ning väljendatakse samuti lagunemiste arvuna minutis. Sõltuvalt kasutatavast lähenemisviisist väljendatakse radioaktiivse märgise imendumist DPM-des katselooma kohta (üksiku katselooma lähenemisviis) või DPM-des katserühma kohta (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis).

Vähendatud LLNA

28. Teatud juhtudel, kui on regulatiivne vajadus kinnitada, et aine ei sensibiliseeri nahka, võib valikuliselt kasutada vähendatud LLNA eeskirja (16) (17) (18), milleks kulub vähem katseloomi; seejuures tuleb järgida kõiki käesolevas katsemeetodis kirjeldatud muid LLNA katse-eeskirja üksikasju. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks.

29. Ainus erinevus LLNA ja vähendatud LLNA katse-eeskirjade vahel on vähendatud annuserühmade arv ja seepärast ei saada vähendatud LLNaga teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Seepärast ei saa vähendatud LLNAd kasutada, kui on vaja teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Nagu paljuannuselise LLNA puhul, nii ka vähendatud LLNA puhul peaks uuritava aine kontsentratsioon olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu selge süsteemne toksilisus hiire jaoks ega ülemäärane paikne nahaärritus (vt punkt 18).

TÄHELEPANEKUD

Kliinilised tähelepanekud

30. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmataks valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitused (37).

Kehamass

31. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

32. Iga katserühma tulemused väljendatakse stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul tuletatakse SI, jagades iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmise DPMi hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise DPM-ga hiire kohta. Keskmise SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral saadakse SI, jagades iga katserühma ühendatud radioaktiivsuse imendumise ühendatud kandeaine-kontrollrühma imendumisega; selle tulemuseks on keskmine SI.

33. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 3. Kuid piiripealse tulemuse positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõalaisust (4) (5) (6).

34. Kui saadud tulemust on vaja selgitada, tuleks arvesse võtta uuritava aine omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites (7).

35. Radioaktiivsusandmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

36. Andmed tuleb koondada tabelisse. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul esitatakse üksikloomade DPMi väärtus, rühma keskmine suhte DPM/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral esitage keskmine/mediaan-DPM ja keskmine SI iga annuserühma jaoks, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katseprotokoll

37. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

Uuritav aine ja kontrollaine:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalise-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad.

Lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus.

Katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne.

Katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi.

Usaldusväärsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli andmed;
- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriprotokoll ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist.

Tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;

- iga katserühma DPMi väärtused ja SI väärtused tabelina iga üksiku hiire kohta (üksiku katselooma lähenemisviis) või keskvärtus/mediaan (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis);
- iga katserühma DPM/hiire keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;
- arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;
- annuse-immuunvastuse sõltuvus;
- vajaduse korral statistilised analüüsid.

Tulemuste arutelu:

- lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Vt [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf]

- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Vt [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Vt [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llharep.pdf]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Vt [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Vt [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]
- (37) 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 Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1. liide

NAHA SENSIBILISEERIMISE MÄÄRAMISEKS PAKUTAVA SARNASE VÕI MUUDETUD LLNA KATSEMEETODI TULEMUSLIKKUSNÕUDED

SISSEJUHATUS

1. Tulemuslikkusnõuete eesmärk on esitada alus, mille põhjal uusi katsemeetodeid, nii kaitstud (autoriõiguse või kaubamärgiga või registreeritud) meetodeid kui ka kaitsmata meetodeid saaks tunnistada konkreetse uuringu jaoks piisava täpsuse ja usaldusväärsusega meetodiks. Selliseid valideeritud ja tunnustatud meetoditel põhinevaid tulemuslikkusnõudeid saab kasutada selleks, et hinnata muude sarnaste, samadele teaduslikele põhimõtetele tuginevate ja samade bioloogiliste või toksiliste mõjude mõõtmiseks või ennustamiseks kasutatavate, nn mina-kah-meetodite usaldusväärsust ja täpsust (14).

2. Enne muudetud meetodi, s.o kinnitatud meetodi võimaliku täiustatud variandi vastuvõtmist peaks toimuma hindamine, et teha kindlaks kavandatud muudatuste mõju katse tulemuslikkusele ja millisel määral sellised muudatused mõjutavad teavet muude valideerimisprotsessi osade kohta. Olenevalt pakutavate muudatuste arvust ja laadist, muudatuste kohta saadud andmetest ja muudatusi toetavatest dokumentidest tuleks nende suhtes kohaldada kas sama valideerimisprotsessi kui uue katsemeetodi puhul või usaldusväärsuse ja asjakohasuse piiratud hindamist kehtestatud tulemuslikkusnõuete alusel (14).

3. Käesoleva katsemeetodi alusel kavandatud ja kasutamiseks esitatud menetlusi tuleks hinnata, et määrata kindlaks nende usaldusväärsus ja täpsus kõikide ainete puhul, mis esindavad kogu LLNA hinneteskaalat. Katseloomade põhjendamatu kasutamise vältimiseks soovitatakse tungivalt, et mudelite väljatöötajad peaksid nõu asjaomaste asutustega, enne kui alustavad käesolevas katsemeetodis esitatud tulemuslikkusnõuete ja suuniste kohaseid valideerimisuuringuid.

4. Tulemuslikkusnõuded põhinevad USA alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (US-ICCVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (EC-ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskuse (JaCVAM) ühtlustatud tulemuslikkusnõuetel (12), mille alusel hinnatakse LLNA sarnaste või muudetud versioonide valideeritust. Tulemuslikkusnõuded koosnevad katsemeetodite olulisematest osadest, soovitatavatest võrdluskemikaalidest ning täpsus- ja usaldatavusnõuetest, millele pakutav meetod peaks vastama või mida ta peaks ületama.

I. Katsemeetodi olulised osad

5. Sarnase või muudetud LLNA-meetodi tööpõhimõttelise ja teostusliku analoogia tagamiseks LLNaga ning sama bioloogilise mõju mõõtmiseks peaksid kaste-eeskirjas olema järgmised osad:

- uuritavat ainet tuleks paikselt kanda hiire mõlemale kõrvalestale;
- tuleks mõõta lümfotsüütide vohamist lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise kohta;
- lümfotsüütide vohamist tuleks mõõta naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal;

- uuritavate ainete puhul peaks valitav annus olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus; Positiivsete võrdluskemikaalide puhul peaks suurim annus olema vähemalt sama suur, kui asjaomase võrdluskemikaali EC3 väärtus LLNA puhul (vt tabel 1), mille puhul ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus;
- igas uuringus peaks olema paralleelne kandeaine-kontrollrühm ja vajaduse korral ka positiivse kontrolli rühm;
- igas annuserühmas tuleks kasutada vähemalt nelja katselooma;
- võib koguda andmeid kas üksiku katselooma kohta või katseloomade ühendatud andmeid.

Kui mõni neist kriteeriumidest ei ole täidetud, ei saa siin esitatud tulemuslikkusnõudeid kasutada sarnase või muudetud meetodi valideerimiseks.

II. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu

6. US-ICCVAMi, EC-ECVAMi ja JaCVAMi ühtlustatud tulemuslikkusnõuetes (12) on esitatud 18 võrdluskemikaali kui miinimumhulk, mida tuleks kasutada, ja neli valikulist võrdluskemikaali (need on ained, mis andsid LLNAga kas valepositiive või -negatiive, kui võrrelda neid inimesel ja meriseal saadud tulemustega (B.6 ehk OECD katsejuhend 406) (13), ning seepärast võimaldavad need näidata LLNAga võrreldavat või paremat tulemuslikkust), mis on võetud LLNA tulemuslikkusnõuetesse. Osutatud kemikaalide välja valimise kriteeriumid olid järgmised:

- võrdluskemikaalide loendis on esindatud aineklassid, mida tavaliselt uuritakse naha sensibiliseerimise suhtes ja mille immuunvastus on vahemikus, mida LLNAga saab mõõta või ennustada;
- kõigi ainete keemiline ehitus on hästi teada;
- iga aine jaoks on olemas meriseal saadud LLNA andmed (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ning (kus võimalik) inimesel saadud andmed; ning
- kõik ained on kaubanduses hästi kättesaadavad.

Soovitatud võrdluskemikaalid on loetletud tabelis 1. Uuringutes, milles soovitatud võrdluskemikaale kasutatakse, tuleks hindamiseks kasutada võrdluskemikaale samades kandeainetes, millega need on loetletud tabelis 1. Kui mõnda loetletud ainet ei ole saada, võib kasutada muid aineid, mis vastavad loetletud valikukriteeriumidele, ja tuleb esitada vajalik põhjendus.

TABEL 1. LLNA TULEMUSLIKKUSNÕUETE JAOKS SOOVITATUD VÕRDLUSKEMIKAALID

Jrk-nr	Kemikaal ¹	CASi nr	Vorm	Veh ²	EC3 % ³	N ⁴	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
1	5-kloro-2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (CMI)/ 2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (MI) ⁵	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenüleendiamiin	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	koobaltkloriid	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenool	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	tsitraal	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenool	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenüülbensoaat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	kaneelalkohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidasolidinüülkarbamiid	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	metüülmetakrülaat	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	klorobenseen	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/*
15	isopropanool	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+
16	piimhape	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/*
17	metüülalitsülaat	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	salitsüülhape	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Jrk-nr	Kemikaal ¹	CASi nr	Vorm	Veh ²	EC3 % ³	N ⁴	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
Valikained, millega saab tõendada LLNaga võrreldes paremat tulemuslikkust										
19	naatriumlaaurüülsulfaat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/-	+/-
20	etüleenglükooldimetakrülaat	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14–56	NC	+/-	+/+
21	ksüleen	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/**	+/-
22	nikkeldikloriid	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Lühendid: AOO = atsetoon: oliiviõli (4:1, v/v); CASi nr = Chemical Abstracts Service'i number; DMF = *N,N*-dimetüülformamiid; DMSO = dimetüülsulfoksiid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenseen; EC3 = hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on 3; GP = merisea katse tulemus (s.o B.6 või OECD katsejuhik 406) (13); HCA = heksüülkaneelaldehüüd; Liq = vedelik; LLNA = hiire paiksete lümfisõlmede katse tulemus (s.o B.42 või OECD katsejuhik 429) (1); MEK = metüüleetüülketoon; NA = ei ole kohaldatav, kuna stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3; NC = ei ole arvutatud, kuna andmed on saadud üheainsa uuringuga; Sol = tahke aine; Veh = kandeaine.

¹ Kemikaalid tuleks valmistada iga päev, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

² Kuna LLNA tulemuslikkust võib mõjutada erinev kandeaine, tuleb kasutada iga võrdluskemikaali jaoks soovitud kandeainet (24) (32).

³ Keskvärtus, kui kättesaadav on rohkem kui üks EC3 väärtus. Negatiivsete ainete (st mille stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3) puhul on esitatud kõrgeim uuritud kontsentratsioon.

⁴ Andmete allikana kasutatud LLNA uuringute arv.

⁵ Kaubanduses kättesaadav nimetuse all Kathon CG (CASi nr 55965-84-9), mis on CMI ja MI segu vahekorras 3:1. Komponentide suhtelised kontsentratsioonid on vahemikus 1,1–1,25 % CMI ja 0,3–0,45 % MI. Inaktiivsed komponendid on magneesiumisoolad (21,5–24 %) ja vasknitraat (0,15–0,17 %), ülejäänud osa on vesi (74–77 %). Kathon CGd saab osta Sigma-Aldrichi ning Rohm and Haas'i (nüüd Dow Chemical Corporation) kaudu.

* = Oletatakse, et inimese puhul ei ole sensibilisaator, kuna inimnaha tükikese katsete kliinilisi tulemusi ei ole leitud, kõnealust ainet ei ole inimnaha tükikese allergenide komplektis ja ei ole teatatud ühestki juhtumist, kus aine oleks sensibiliseerinud inimest.

** = Merisea andmed ei ole kättesaadavad.

III. Kindlaks määratud usaldusväärsus- ja täpsusnõuded

7. Sarnase või muudetud LLNA-meetodi täpsus peaks vastama 18 kohustuslikult kasutatava võrdluskemikaali puhul LLNA tulemuslikkusnõuetele või ületama LLNA täpsust. Uus või muudetud meetod peaks võimaldama õige klassifitseerimise jah- või ei-otsuse alusel. Kuid uus või muudetud meetod ei tarvitse võimaldada õigesti klassifitseerida kõiki kohustuslikku miinimumkogumisse kuuluvaid võrdluskemikaale. Kui näiteks üks nõrkadest sensibiliseerijatest klassifitseeritakse valesti, tuleks samaväärse tulemuslikkuse tõendamiseks kaaluda vale klassifitseerimise põhjenduse ja sobivate lisaandmete esitamist (näiteks katsetulemused, millega saadakse õige klassifikatsioon muude ainete puhul, mille füüsikalised, keemilised ja sensibiliseerivad omadused sarnanevad valesti klassifitseeritud aine omadele). Sellisel juhul hinnatakse uue või muudetud LLNA-meetodi valideerituse staatust konkreetsete juhtude alusel.

Laborisisene reprodutseeritavus

8. Laborisisese reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. Seepärast on LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel aluseks heksüülkaneelaldehüüdi (HCA) korduva mõõtmise tulemuste varieeruvus. Laborisisese usaldusväärsuse hindamiseks tuleb saada HCA hinnangulise lävikontsentratsiooni (ECt) väärtused neljast eraldi katsest, mis tehakse vähemalt nädalase vahega katsete vahel. Laborisisene reprodutseeritavus on vastuvõetav, kui laboris suudetakse iga HCA katse puhul saada ECt väärtused vahemikus 5–20 %, mis vastab 10 % HCA jaoks LLNAga kindlaks tehtud EC3 vahemikule poolest keskvärtusest kuni kahekordse keskvärtuseni (vt tabel 1).

Laboritevaheline reprodutseeritavus

9. Laboritevahelise reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades kahte sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel on aluseks HCA ja 2,4-dinitroklorobenseeni (DNCB) mõõtmise tulemuste varieeruvus eri laborites. ECt väärtused tuleks määrata sõltumatult ühest uuringust, mis tehakse vähemalt kolmes eri laboris. Vastuvõetava laboritevahelise reprodutseeritavuse tõendamiseks peaks iga labor saama HCA puhul ECt väärtused vahemikus 5–20 % ja DNCB puhul vahemikus 0,025–0,1 %, mis vastab kindlakstehtud EC3 vahemikule poolest keskvärtusest kuni kahekordse keskvärtuseni; LLNAga määratud keskvärtus on HCA puhul 10 % ja DNCB puhul 0,05 % (vt tabel 1).

2. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (14).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitavas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

Hinnanguline lävikontsentratsioon (ECt): uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mis põhjustab sellise stimulatsiooniindeksi, mis tõendab positiivse immuunvastuse olemasolu.

Hinnanguline SI 3 kontsentratsioon (EC3): uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on kolm.

Valenegatiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

Valepositiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta.

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (14).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (14).

Mina-kah-meetod: kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on struktuuriliselt ja tööpõhimõttelt sarnane valideeritud ja aktsepteeritud võrdlusmeetodile. Sellist katsemeetodit võib valideerida kiirendatud korras (*catch-up validation*). Kasutatakse vaheldumisi sarnaste katsemeetodite puhul (14).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Tulemuslikkusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnase meetodiga. Arvesse võetakse järgmist: i) katsemeetodi olulised osad; ii) valideeritud

standardmeetodi tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend; ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (14).

Kaitstud katsemeetod: katsemeetod, mille kasutamine ja levitamine on piiratud patentide, autoriõiguse, kaubamärgi vm sellisega.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Võrdluskemikaalid: valideerimisel kasutamiseks välja valitud kemikaalid, mille esilekutsutavad immuunvastused *in vitro* või *in vivo* võrdlussüsteemis või huvipakkuva loomaliigi puhul on juba teada. Sellised kemikaalid peaksid esindama kemikaaliklasse, mille ainete puhul katsemeetodit eeldatavalt kasutatakse, ja samuti selliste ainete põhjustatava immuunvastuse kogu vahemikku, tugevast mõjust nõrga mõjuni ja mõju puudumiseni. Valideerimise eri staadiumide jaoks, samuti eri katsemeetodite ja kasutusala puhul võidakse nõuda võrdluskemikaalide eri kogumite kasutamist (14).

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat efekti, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, millisel määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist efekti. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi õigsuse (sisulise kooskõlalisuse) kaalutlusi (14).

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (14).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontakt sensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (14).”

2. Peatükk B.46 asendatakse järgmisega:

„B.46. *In vitro* nahaärrituskatse: rekonstrueeritud inimepidermise mudeli katsemeetod

SISSEJUHATUS

1. Nahaärrituse all mõistetakse pöörduva nahakahjustuse tekitamist uuritava kemikaali pealekandmisega neljaks tunniks [nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist [edaspidi „CLP-määrus” (*classification, labelling and packaging*)] (1)(3)]. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud *in vitro* meetodit, mida võib kasutada ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse 2. kategooriale vastavate ärritavate ainetega seotud ohtude kindlaksmääramiseks (1) (2) (3). ELis ja muudes piirkondades, milles ei ole vastu võetud vabatahtlikult kohaldatavat ÜRO GHSi 3. kategooriat (nõrgad ärritajad), võib käesolevat katsemeetodit kasutada ka selleks, et kindlaks teha klassifitseerimata, st ÜRO GHSi ja ELi CLP-määruse kohase kategooriaga kemikaale (1)(3). Käesolevat katsemeetodit võib kasutada kemikaalide nahaärritust tekitava toime määramiseks kui iseseisvat meetodit, millega saab asendada *in vivo* nahaärrituse mõõtmise astmelise katsetamise strateegias (4 ja käesoleva lisa peatükk B.4).

2. Nahka ärritava toime hindamisel on tavaliselt kasutatud laboriloomi [OECD katsejuhend 404; käesoleva lisa peatükk B.4] (4). Loomade heaolu tagamise vajadust arvestades vaadati meetod B.4 2004. aastal läbi ja lubati nahka söövitavat või ärritavat toimet määrata astmelise katsetamise strateegiaga, milles kasutatakse valideeritud *in vitro* ja *ex vivo* meetodeid, et vältida loomadele valu ja kannatuste põhjustamist. Kolm valideeritud *in vitro* katsemeetodit on kinnitatud kui OECD katsejuhendid 430, 431 ja 435 (5) (6) (7) ning kaks neist kui käesoleva lisa peatükid B.40 ja B.40 a, et neid kasutataks astmelise katsetamise strateegia B.4 või OECD katsejuhendi 404 (4) kasutamisel söövitust põhjustava toime määramiseks.

3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervise sellist aspekti nagu nahaärritus. Meetodis on kasutatud rekonstrueeritud inimepidermist (RhE), mis oma üldise ülesehituse poolest (rakkude allikana on nendes kasutatud inimepidermisest saadud transformeerimata keratinotsüüte, mudelil on epidermisesarnane kude ja rakuarhitektuur) jäljendab nii oma biokeemiliste kui ka füsioloogiliste omaduste poolest inimnaha ülemisi kihte, st epidermist. Käesolev katsemeetod hõlmab tulemuslikkusnõudeid (2. liide), mille on välja töötanud alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (EC-ECVAM) (8) vastavalt OECD suunisdokumendile nr 34 (9) ja mille alusel hinnatakse sarnaseid või muudetud RhE-põhiseid meetodeid.

4. Käesolev katsemeetod hõlmab kolme valideeritud meetodit. Eelvalideerimine, optimeerimine ja valideerimine on lõpetatud *in vitro* meetodi jaoks (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), milles kasutatakse RhE-mudelit, mida müüakse EpiSkin™ nimetuse all ja millele viidatakse kui valideeritud võrdlusmeetodile. Valideeritud võrdlusmeetodiga sarnaseid tulemusi on tulemuslikkusnõuetel põhineva hindamise (21) kohaselt saadud veel kahe müügil oleva nahaärrituse *in vitro* määramise RhE-põhise meetodiga ning need on RHE-meetodid EpiDerm™ SIT (EPI-200) ja SkinEthic™ (22).

5. Enne kui muud sarnast või muudetud *in vitro* RhE-meetodit peale valideeritud võrdlusmeetodi ja RHE-meetodite EpiDerm™ SIT (EPI-200) või SkinEthic™ võib kasutada

regulatiivsel eesmärgil, tuleks määrata selle usaldusväärsus, asjakohasus (õigsus) ja kavandatud kasutamise piirangud, et olla kindel, et seda võib pidada valideeritud võrdlusmeetodile sarnaseks meetodiks vastavalt käesolevas katsemeetodis (2. liide) esitatud tulemuslikkusnõuetele. Lisaks soovitakse enne sarnase või muudetud *in vitro* RhE-meetodi väljatöötamist, valideerimist ja regulatiivseks kinnitamiseks pakkumist tutvuda *in vitro* nahaärrituse määramist käsitleva OECD selgitava taustdokumendiga (23).

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. Valideerimisuuring (16) näitas, et üks katsemeetodi piiranguid on see, et sellega ei saa klassifitseerida kemikaale vabatahtlikult kohaldatavasse ÜRO GHSi kategooriasse 3 (nõrgad ärritajad) (1). Osaliselt asendava katsemeetodina kasutamisel võib vaja minna järgnevat *in vivo* katset, et täielikult iseloomustada kemikaali nahaärritust tekitavat toimet (4 ja käesoleva lisa peatükk B.4). Inimese naha kasutamine toimub muidugi vastavalt iga riigi ja rahvusvahelistele eetilistele tõekspidamistele ja tingimustele.

8. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse B.4 (OECD katsejuhend 404) nahasöövituse/nahaärrituse astmelise katsetamise strateegia (4) *in vitro* nahaärritust tekitavat komponenti. Kuigi see katsemeetod ei anna adekvaatset teavet nahasöövituse kohta, tuleb märkida, et nahasöövituse määramise meetod B.40 a (OECD katsejuhend 431) põhineb samal RhE katsesüsteemil, kuigi seal kasutatakse teistsugust eeskirja (peatükk B.40 a). Meetod põhineb RhE-mudelitel, milles kasutatakse inimese keratinotsüüte, mis sellega *in vitro* esindavad meid huvitava liigi sihtorganit. Lisaks hõlmab meetod otseselt kemikaali toimel tekkiva põletiku kaskaadmehhanismi algstaadiumi (raku- ja koekahjustus, millest tekib piiratud ulatusega trauma), mis esineb nahaärrituse tekkimisel *in vivo*. Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks on katsetatud paljusid erinevaid kemikaale; valideerimisuuringute empiirilises andmebaasis on kokku 58 kemikaali (16)(18)(23). Meetodit saab kasutada tahkete ainete, vedelike, püdelate ainete ja vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Tahked ained tuleks enne pealekandmist võimaluse korral peenestada peeneks pulbriks; uuritava aine muud eeltötlust ei ole vaja. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuuringuga veel hinnatud (24). Kuigi on mõeldav, et neidki saab uurida RhE-meetodiga, ei võimalda praegune katse-eeskiri gaaside ega aerosoolide uurimist. Tuleb märkida ka, et tugeva värvusega kemikaalid võivad segada rakkude eluvõimelisuse mõõtmist ja siis on vaja kasutada sobivaid kontrollproove paranduste tegemiseks (vt punktid 24–26).

9. Üksainus katse kudede kolme paralleelprooviga peaks olema piisav uuritava kemikaali klassifitseerimiseks, kui tulemus on ühene. Piiripealse tulemuse puhul, nagu lahkuminevad tulemused paralleelide mõõtmisel ja/või keskmine eluvõimelisuse protsent $50 \pm 5\%$, võib vaja minna teist katset, samuti ka kolmandat katset, kui kaks esimest katset annavad vastuolulise tulemuse.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav kemikaal kantakse kolmemõõtmelisele RhE mudelile, mis koosneb inimepidermisest saadud transformeerimata keratinotsüütidest, mida on kasvatatud nii, et need moodustavad inimepidermise mitmekihilise tugevalt diferentseerunud mudeli. See koosneb

korrrastatud basaalkihist, ogakihist ja sõmerkihist ning mitmekihilisest sarvkihist (*stratum corneum*), mis sisaldab rakkudevahelisi õhiklipiidkihte, mille paigutus sarnaneb paigutusele *in vivo*.

11. Kemikaalide tekitatud nahaärritus, mis avaldub punetuse ja tursena, tekib sündmuste kaskaadi tulemusena; kaskaadi alguses tungib kemikaal läbi sarvkihi ja kahjustab selle all asuvaid keratinotsüüdkihite. Surevad keratinotsüüdid vabastavad mediaatoreid, mis päästavad valla põletikureaktsioonide kaskaadi, mis mõjutab pärisnaha (*dermis*) rakke, eelkõige strooma ja endoteeliumi rakke. Endoteeliumirakkude paisumine ja läbilaskvuse suurenemine põhjustab nähtava punetuse ja turse (24). RhE-põhiste meetoditega mõõdetakse kaskaadi vallapäästvaid sündmusi.

12. RhE-mudelil mõõdetakse rakkude eluvõimelisust vitaalvärvaine MTT [3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine; CASi number 298-93-1] ensümaatilise muundamise järgi siniseks formasaansoolaks, mis pärast koest ekstraheerimist määratakse kvantitatiivselt (25). Ärritavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust allapoole kindlaksmääratud läviväärtusi (see tähendab $\leq 50\%$ ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohaste 2. kategooria ärritavate ainete puhul). Kemikaalid, millega rakkude eluvõimelisus jääb kõrgemale kindlaksmääratud läviväärtusest (st üle 50%), võidakse olenevalt regulatiivsest raamistikust, milles katsemeetodi tulemusi kasutatakse, tunnistada mitte ärritavaks (kategooriata kemikaal).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

13. Enne käesoleval katsemeetodil põhinevast kolmest valideeritud meetodist mõne meetodi igapäevast kasutuselevõttu peaksid laborid tõendama oma tehnilist pädevust, kasutades tabelis 1 soovitatud 10 kemikaali. Käesoleva katsemeetodi kolme valideeritud meetodi alusel väljatöötatavate sarnaste või muudetud katsemeetodite puhul tuleks tõendada käesoleva katsemeetodi 2. liites kirjeldatud tulemuslikkusnõuete täitmist, enne kui meetod võetakse kasutusele õigusnormides ettenähtud meetodina.

14. Pädevuse tõendamise osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saamist kontrollida nende kaitsekihiomaduste vastavust RhE-mudeli tootja kirjeldusele. See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist transporti või transporti suure vahemaa taha. Kui meetod on edukalt omandatud ja oskus seda kasutada on tõendatud, ei ole selle tavapärane kontrollimine vajalik. Kuid tavapärase kasutamise puhul soovitatakse jätkata kaitsekihiomaduste kontrollimist korrapäraste ajavahemike järel.

Tabel 1. Võrdluskemikaalid¹

Kemikaal	CASi nr	<i>In vivo</i> hinne ²	Füüsikaline olek	ÜRO GHSi ja ELi CLP-määruse kohane kategooria
naftüüläädikhape	86-87-3	0	tahke	kat-ta
isopropanool	67-63-0	0,3	vedelik	kat-ta
metüülstearaat	112-61-8	1	tahke	kat-ta
heptüülbutüraat	5870-93-9	1,7	vedelik	kat-ta (vabatahtlikult kohald. kat. 3) ^{3,4}
heksüülsaltsülaat	6259-76-3	2	vedelik	kat-ta (vabatahtlikult kohald. kat. 3) ^{3,4}
3- <i>p</i> -kumenüül-2-metüülpropioonaldehüüd	103-95-7	2,3	vedelik	2. kat.
1-bromoheksaan	111-25-1	2,7	vedelik	2. kat.
kaaliumhüdrokksiid (5 % vesilahus)	1310-58-3	3	vedelik	2. kat.
1-metüül-3-fenüül-1-piperasiin	5271-27-2	3,3	tahke	2. kat.
heptanaal	111-71-7	3,4	vedelik	2. kat.

¹ Tabelis esitatud võrdluskemikaalid on osa valideerimisuurinus kasutatud võrdluskemikaalidest.

² Hinne *in vivo*, vastavalt B.4-le ja OECD katsejuhendile 404 (4).

³ Käesoleva katsemeetodi kohaselt käsitatakse ÜRO GHS-süsteemi 3. valikkategooriat (nõrgad ärritajad) (1) kategooria puudumisenä (kategooriata).

⁴ ÜRO GHS-süsteemi 3. valikkategooria ei ole ELi CLP-määruse järgi kohaldatav.

KATSE KÄIK

15. Järgnevas osas kirjeldatakse nahaärrituse hindamiseks kasutatava RhE-meetodi katse osi ja teostust. Tuleb valmistada RhE-mudel; selle võib teha kas ise või osta. Avaldatud on standardtööeeskirjad kolme mudeli jaoks: EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) ja SkinEthic™ RHE (26)(27)(28). Katse tuleks läbi viia järgmiselt.

RHE katsemeetodi osad

Üldtingimused

16. Epiteelkoe ehitamiseks tuleb kasutada inimese transformeerimata keratinotsüüte. Talitleva sarvkihi all peab olema mitu kihti (basaalkiht, ogakiht ja sõmerkiht) eluvõimelisi epiteelrakke. Sarvkiht peaks olema mitmekihiline ja vajaliku lipiidse koostisega, et tekiks sellise tugevusega funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste markerkemikaalide, nagu naatriumdodetsüülsulfaat (SDS) või Triton X-100, kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada kas sellise kontsentratsiooni määramisega, mille juures markerkemikaal vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra (IC₅₀)

pärast kindlaksmääratud kokkupuuteaega, või sellise kokkupuuteaja määramisega, mille juures markerkemikaal teatava kindla kontsentratsiooni juures vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra (ET₅₀). RhE mudel peab olema selline, et aine ei saaks tungida eluskudedesse sarvkihist mööda minnes, vastasel korral ei oleks tegemist naha ja keemilise aine kokkupuute õige mudeliga. RhE mudel ei tohi olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

Funktsionaalsed tingimused

Eluvõimelisus

17. Eluvõimelisuse määramiseks kasutatakse värvaine MTT katset (25). RhE-mudeli kasutajad peaksid tagama, et iga kasutatav RhE partii vastab kindlaksmääratud negatiivse kontrolli kriteeriumidele. Puhta ekstraheerimislahusti optiline tihedus peab olema piisavalt madal, väiksem kui 0,1. Negatiivse kontrolli optilise tiheduse lubatav vahemik (ülem- ja alampiir) (nahaärrituse katsemeetodi tingimustes) määratakse RhE-mudeli valmistaja või tarnija poolt; kolme valideeritud meetodi lubatavad vahemikud on esitatud tabelis 2. Peaks olema tõendatud, et negatiivse võrdlusainega töödeldud kude on kultuuris stabiilne (võimaldab saada sarnaseid eluvõimelisuse mõõtmistulemusi) katses kasutatava kokkupuuteaja jooksul.

Tabel 2. Negatiivse kontrolli optilise tiheduse lubatav vahemik

	Lubatav alampiir	Lubatav ülempiir
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Toimimine kaitsekihina

18. Sarvkiht ja selle lipiidne koostis peavad olema piisavad, et takistada tsütotoksiliste markerkemikaalide, nagu SDS või Triton X-100, kiiret läbitungimist; seda hinnatakse IC₅₀ või ET₅₀ abil (tabel 3).

Morfoloogia

19. RhE-mudelit tuleb histoloogiliselt uurida ja tõendada, et sel on inimese epidermisele sarnane struktuur (sealhulgas mitmekihiline sarvkiht).

Reprodutseeritavus

20. Katsemeetodi positiivse kontrolli kemikaalide ja negatiivse kontrolli tulemused peavad olema ajas reprodutseeritavad.

Kvaliteedikontroll

21. RhE-mudeli valmistaja või tarnija peaks tagama ja tõendama, et kasutatud RhE-mudelite iga partii vastab toote kvaliteedikriteeriumidele, mille hulgas kõige olulisemad on

eluvõimelisuse (punkt 17), kaitsekihiomaduste (punkt 18) ja morfoloogiaga (punkt 19) seotud kriteeriumid. Sellised andmed tuleks anda meetodi kasutajate käsutusse, et nad saaksid esitada selle teabe oma katse protokollis. RhE-mudeli valmistaja/tarnija (või katse läbiviija, kui ta kasutab omatehtud mudelit) peaks kindlaks määrama IC₅₀ või ET₅₀ lubatava vahemiku (ülem- ja alampiiri). Nahaärrituse klassifikatsiooni usaldusväärseks ennustamiseks saab kasutada ainult sobivate omadustega kudedega saadud tulemusi. Tabelis 3 on näitena esitatud kolme valideeritud standardmeetodi puhul lubatavad vahemikud.

Tabel 3. Partii kvaliteedi kontrollimise kriteeriumide näited

	Lubatav alampiir	Lubatav ülempiir
EpiSkin™ (SM) (18-tunnine töötlus SDS-ga) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 tundi	ET ₅₀ = 8,7 tundi
SkinEthiC™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 tundi	ET ₅₀ = 9,0 tundi

Uuritavate ja kontrollkemikaalide pealekandmine

22. Iga uuritava kemikaaliga ja kontrollidega tuleks teha vähemalt kolm paralleelkatset. Vedela ja tahke aine korral tuleb kasutada piisavat uuritava kemikaali kogust, nii et see kataks ühtlaselt naha pinna, kuid vältida tuleb lõpmatut annust, see tähendab, et ainet tuleb peale kanda vähemalt 25 µl/cm² või 25 mg/cm². Tahke aine puhul tuleks epidermist niisutada enne kemikaali pealekandmist deioniseeritud või destilleeritud veega, et parandada uuritava kemikaali kontakti nahaga. Võimaluse korral tuleks tahket ainet alati katsetada peene pulbri kujul. Kokkupuuteaja lõpus tuleks uuritav kemikaal epidermise pinnalt hoolikalt maha pesta vesipuhverlahusega või 0,9 % NaCl lahusega. Olenevalt sellest, millist kolmest valideeritud RhE meetodist kasutatakse, võib kokkupuuteaeg olla 15–60 minutit ja inkubatsioonitemperatuur 20–37 °C. Kõnealuseid kokkupuuteaegu ja -temperatuure optimeeritakse iga RhE-meetodi jaoks ja need peegeldavad iga meetodi eriomadusi; täpsustused on iga meetodi standardtööeeskirjades (26)(27)(28).

23. Iga uuringu puhul tuleb teha paralleelkatsed negatiivse kontrolli võrdlusaine ja positiivse kontrolli võrdlusainega, millega tõendatakse, et kudede eluvõimelisus (negatiivse kontrolli võrdlusaine), kaitsekihi toime ja sellega määratud kudede tundlikkus (positiivse kontrolli võrdlusaine) on varem kindlaksmääratud lubatud piirides. Soovitav positiivse kontrolli võrdlusaine on SDSi 5 % vesilahus. Soovitavad negatiivse kontrolli kemikaalid on vesi või fosfaatpuhverit sisaldav keedusoolalahus.

Raku eluvõimelisuse mõõtmine

24. Kõige olulisem katse läbiviimisel on see, et eluvõimelisuse mõõtmisi ei tehtaks vahetult pärast kokkupuudet uuritava kemikaaliga, vaid pärast töötlemisele järgnevat puhtaks loputatud kudede piisavalt pikka inkubeerimist värskes keskkonnas. Inkubeerimine võimaldab toibuda nõrgalt tsütotoksilistest mõjudest ja ilmned selgel tsütotoksilisel mõjul. Katse

optimeerimisetapis tõendati (11) (12) (13) (14) (15), et 42 tundi töötlemisjärgset inkubeerimist oli optimaalne.

25. MTT-katse on valideeritud kvantitatiivne meetod, mida tuleks käesoleva katsemeetodi puhul kasutada rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks. Meetodit saab kasutada kolmemõõtmelises koekonstruksioonis. Koeproov asetatakse kolmeks tunniks sobiva kontsentratsiooniga (nt 0,3–1 mg/ml) MTT lahusesse. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahustiga (näiteks isopropanool, hapestatud isopropanool) ja formasaani kontsentratsioon määratakse optilise tiheduse mõõtmisega lainepikkusel 570 nm, kasutades spektririba laiust kuni ± 30 nm.

26. Uuritava kemikaali enda optilised omadused või selle keemiline mõju MTT-le võib segada määramist, põhjustades eluvõimelisuse hindamisel vea (kuna uuritav kemikaal võib segada värvuse ilmumist, nõrgendada värvust või põhjustada seda). See võib juhtuda, kui uuritavat kemikaali ei ole koelt täielikult maha loputatud või kui kemikaal on tunginud epidermisse. Kui uuritav kemikaal reageerib otse MTTga (MTT-taandaja), on ise värviline või muutub värviliseks koega kokkupuutumisel, on vaja täiendavaid kontrollkatseid, et teha kindlaks, kuivõrd segab uuritav kemikaal eluvõimelisuse määramist, ning teha vajalik parandus. Üksikasjalik kirjeldus, kuidas teha parandust MTT otsese taandamise arvestamiseks ning värviliste ainete mõju arvessevõtmiseks, on esitatud kolme valideeritud meetodi standardeeskirjades (26)(27)(28).

Katse kehtivuse kriteeriumid

27. Iga meetodi puhul, milles kasutatakse kõlblikku RhE-mudeli partiid (vt punkt 21), peaks negatiivse kontrolli võrdlusainega töödeldud kudede korral leitama optilise tiheduse väärtused, mis näitavad, et koed on pärast transpordi ja vastuvõtmise etappe ning kõiki katseeskirjaga ettenähtud töötusi säilitanud oma kvaliteedi. Kontrollkatsete optilise tiheduse väärtused ei peaks olema allpool varem määratud alampiire. Ka positiivse kontrolli võrdlusainega, st 5 % SDSi lahusega töödeldud kudel peaks olema säilinud võime reageerida ärritavale ainele katsemeetodi tingimustes (26) (27) (28). Tuleb määratleda koeproovide varieeruvusega seotud sobivad näitajad (kui kasutatakse näiteks standardhälbeid, peaksid need olema varasematest andmetest arvatud ühepoolse 95 % tolerantsivahemikus; valideeritud võrdlusmeetodi standardhälve on alla 18 %).

Tulemuste tõlgendamine ja ennustusmudel

28. Iga uuritava kemikaaliga saadud optilise tiheduse väärtusi saab kasutada selleks, et arvutada rakkude eluvõimelisuse protsent võrreldes normaliseeritud negatiivse kontrollprooviga, mille eluvõimelisuseks määratakse 100 %. Rakkude eluvõimelisuse protsendimäära piirväärtus, mis eraldab ärritavaid kemikaale klassifitseerimata uuritavatest kemikaalidest, ning statistiline meetod (statistilised meetodid), mida kasutatakse tulemuste hindamiseks ja ärritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, peavad olema selgelt määratletud ja dokumenteeritud ning nende sobivus peab olema tõendatud. Piirväärtused, mida kasutatakse ärritava toime kindlakstegemiseks, on järgmised.

Uuritavat kemikaali peetakse ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohaseks 2. kategooria nahka ärritavaks kemikaaliks, kui koe eluvõime pärast kokkupuudet ja töötlemisjärgset inkubeerimist on väiksem kui 50 % või sellega võrdne.

Olenevalt katsemeetodi tulemuste kasutamise regulatiivsest raamistikust võidakse uuritavat kemikaali pidada nahka mitte ärritavaks ja vastavaks ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohasele kategooriata kemikaalile, kui koe eluvõime pärast kokkupuudet ja töötlemisjärgset inkubeerimist on suurem kui 50 %.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

29. Iga katse kohta tuleks tabelina esitada üksikute paralleelproovikudedega saadud tulemused (näiteks optilise tiheduse väärtused ja rakkude eluvõimelisuse arvutatud protsendimäära andmed iga uuritud kemikaali kohta, kaasa arvatud klassifikatsioon); samuti tuleb vajaduse korral esitada kordusmääramiste andmed. Lisaks keskvaertusele esitatakse iga katse jaoks ka $\pm$ standardhälbe väärtused. Iga uuritava kemikaali puhul registreeritakse tähelepanekud selle mõjude kohta MTT-reagendile, samuti märgitakse ära värvilised uuritavad kemikaalid.

Katseprotokoll

30. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

Uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

- keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu CASi nimetus ja number, EÜ nimetus ja number, kui on teada;
- kemikaali puhtus või koostis (massiprotsentides);
- määramise läbiviimise seisukohast olulised füüsikalised-keemilised omadused (näiteks füüsikaline olek, stabiilsus, lenduvus, pH, lahustuvus vees, kui on teada);
- uuritava/kontrollkemikaali töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);
- säilitamistingimused.

Kasutatud RhE-mudeli ja katse tegemise käigu põhjendus

Katsetingimused:

- kasutatud rakusüsteem;
- kogu täiendav teave kasutatud konkreetse RhE-mudeli ja selle tulemuslikkuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmist:
 - i) eluvõimelisus;
 - ii) toimimine kaitsekihina;
 - iii) morfoloogia;
 - iv) reprodutseeritavus ja ennustamisväärtus;
 - v) mudeli kvaliteedi kontroll;
- katsetoodika üksikasjad;
- määramisel kasutatud annused, kokkupuute kestus ja kokkupuutele järgnenud inkubatsiooniaeg;

- kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmist:
 - i) kvaliteedikontrolli andmete kehtivus, arvestades varasemaid partii andmeid;
 - ii) positiivse ja negatiivse kontrolli väärtuste kehtivus, arvestades positiivse ja negatiivse kontrolli keskvaartusi ja vahemikke;
- kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus, sealhulgas ennustamismudelil kasutamiseks valitud piirväärtus(t)e valiku põhjendus;
- viide varasematele kontrolli andmetele.

Tulemused:

- iga üksiku uuritava kemikaaliga igas katses ja igal paralleelmõõtmisel saadud andmete tabel;
- otseste MTT-taandajate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollid;
- muude täheldatud toimete kirjeldus.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

KIRJANDUS

(1)UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Vt: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2)EC-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 (ESAC30), 9 April 2009. Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]

(3)Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006. ELT L 353, 31.12.2008, lk 1.

(4)OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(5)OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(6)OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(7)OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(8)EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]

(9)OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(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 Rubinstein, 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., mailto: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., mailto: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 . Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (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-Tessonnaud, 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, AATEX, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-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. Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Vt: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

- (24) 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.
- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Vt: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstusta, 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.
- (30) Komisjoni 6. augusti 2001. aasta direktiiv 2001/59/EÜ, millega kahekümne kaheksandat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1-4.
- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *ALTEX*, 14, 359-365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (9).

Rakkude eluvõimelisus: rakupopulatsiooni üldist aktiivust, näiteks raku mitokondrite dehüdrogenaaside võimet taandada vitaalvärvainet MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine), väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast lõpp-punktist ja katseplaanist korreleerub elusrakkude koguarvu ja/või elujõulisusega.

Vastavus: katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategooriline tulemus, on üks asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse „täpsuse” asendusterminina ja määratletakse õigesti positiivseks või negatiivseks klassifitseeritud kemikaalide ja kõikide uuritud kemikaalide suhtarvuna. (9).

ET₅₀: hinnatakse sel viisil, et määratakse kokkupuuteaeg, pärast mida markerkemikaali teatava kindla kontsentratsiooni rakendamisel rakkude eluvõimelisus väheneb 50 %; vt ka IC₅₀.

ELi CLP-määrus (Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist): selle määrusega rakendatakse Euroopa Liidus (ELis) kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimise ja märgistamise ÜRO GHS-süsteem (3).

GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals by the United Nations*) ehk ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem: süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähisteid, nagu piktogrammide, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

IC₅₀: hinnatakse sel viisil, et määratakse kontsentratsioon, mille puhul markerkemikaal vähendab pärast kindlaksmääratud kokkupuuteaega kudede eluvõimelisust 50 %; vt ka ET₅₀.

Lõpmatu annus: epidermisele kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem epidermise pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalikust kogusest.

Mina-kah-meetod: kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on struktuuriliselt ja tööpõhimõttelt sarnane valideeritud ja aktsepteeritud võrdlusmeetodile. Sellist katsemeetodit võib valideerida kiirendatud korras (*catch-up validation*). Kasutatakse vaheldumisi sarnaste katsemeetodite puhul (9).

Tulemuslikkusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt sarnase meetodiga. Arvesse võetakse järgmist: i) katsemeetodi olulised osad, ii) valideeritud

standardmeetodi tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend; ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (9).

Võrdluskemikaalid: valideerimisel kasutamiseks välja valitud kemikaalid, mille esilekutsutavad immuunvastused *in vitro* või *in vivo* võrdlussüsteemis või huvipakkuva loomaliigi puhul on juba teada. Sellised kemikaalid peaksid esindama kemikaaliklasse, mille ainete puhul katsemeetodit eeldatavalt kasutatakse, ja samuti selliste ainete põhjustatava immuunvastuse kogu vahemikku, tugevast mõjust nõrga mõjuni ja mõju puudumiseni. Valideerimise eri staadiumide jaoks, samuti eri katsemeetodite ja kasutusala puhul võidakse nõuda võrdluskemikaalide eri kogumite kasutamist (9).

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat efekti, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, millisel määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist efekti. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi õigsuse (sisulise kooskõlalise) kaalutlusi (9).

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (9).

Asendav meetod: katsemeetod, mis on kavandatud tavakasutuses oleva kinnitatud meetodi asendamiseks ohtude kindlakstegemise ja/või riskide hindamise meetodina ning on määratud tagama kas inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärse või parema kaitse kui kinnitatud katsemeetod kõikide võimalike määramisolekordade ja uuritavate ainete puhul (9).

Tundlikkus: kõikide positiivsete / ärritava toimega kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Nahaärritus: pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaaliga kuni neljatunnise kokkupuute tagajärjel. Nahaärritus on kohalik mitteimmunogeenne reaktsioon, mis tekib lühikese aja jooksul pärast kokkupuudet (29). Selle põhitunnus on põletikureaktsiooni ja põletikuga seotud ärrituse enamiku iseloomulike kliiniliste tunnuste (punetus, turse, sügelus ja valu) pöördumus.

Spetsiifilisus: kõikide negatiivsete / ärritava toimeta kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Astmelise katsetamise strateegia: katsetamine, milles katsemeetodit kasutatakse järjestatud viisil ja igal järgmisel tasandil valitakse katsemeetodid eelmisel katsetamistasandil saadud tulemuste alusel (9).

Uuritav kemikaal (ka „uuritav aine“): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

2. liide

NAHAÄRRITUSE MÄÄRAMISEKS PAKUTAVA REKONSTRUEERITUD INIMEPIDERMISE MUDELIL (R_{HE}) PÕHINEVA SARNASE VÕI MUUDETUD *IN VITRO* KATSEMEETODI TULEMUSLIKKUSNÕUDED

SISSEJUHATUS

1. Tulemuslikkusnõuete eesmärk on esitada alus, mille põhjal uusi meetodeid, nii kaitsitud (autoriõiguse või kaubamärgiga või registreeritud) meetodeid kui ka kaitsmata meetodeid saaks tunnistada konkreetse uuringu jaoks piisava täpsuse ja usaldusväärsusega meetodiks. Selliseid valideeritud ja tunnustatud meetoditel põhinevaid tulemuslikkusnõudeid saab kasutada selleks, et hinnata muude analoogsete, sarnastele teaduslikele põhimõtetele tuginevate ja samade bioloogiliste või toksiliste mõjude mõõtmiseks või ennustamiseks kasutatavate, nn mina-kah-meetodite usaldusväärsust ja täpsust (9).

2. Enne muudetud meetodi, s.o kinnitatud meetodi võimaliku täiustatud variandi vastuvõtmist peaks toimuma hindamine, et teha kindlaks kavandatud muudatuste mõju katse tulemuslikkusele ja millisel määral sellised muudatused mõjutavad teavet muude valideerimisprotsessi osade kohta. Olenevalt pakutavate muudatuste arvust ja laadist, muudatuste kohta saadud andmetest ja muudatusi toetavatest dokumentidest tuleks nende suhtes kohaldada kas sama valideerimisprotsessi kui uue katsemeetodi puhul või usaldusväärsuse ja asjakohasuse piiratud hindamist kehtestatud tulemuslikkusnõuete alusel (9).

3. Mõnele kolmest valideeritud meetodist [EpiSkin™ (*Validated Reference Method*) (valideeritud võrdlusmeetod), VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) ja SkinEthic™ RHE] sarnanevat (mina-kah-) meetodit või muudetud meetodit, mis esitatakse kasutamiseks käesoleva katsemeetodi alusel, tuleks hinnata, et määrata kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus ja täpsus kõikide kemikaalide puhul, mis esindavad kogu Draize ärritavusskaalat. Kavandatud sarnasel või muudetud katsemeetodil peaksid kõigi 20 tulemuslikkusnõuete täitmise kontrollimiseks soovitud võrdluskemikaaliga (tabel 1) hindamisel olema usaldusväärsuse ja täpsuse näitajad, mis oleksid võrreldavad valideeritud standardmeetodi näitajatega (tabel 2) või nendest paremad (2) (16). Usaldusväärsuse ja täpsuse väärtused, mis tuleks saavutada, on esitatud käesoleva liite punktides 8–12. Loetelu hõlmab klassifitseerimata (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kategooriata kemikaal) ja klassifitseeritud (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse 2. kategooria kemikaal) kemikaale, mis esindavad eri kemikaaliklasse, et kavandatud katsemeetodi usaldusväärsust ja tulemuslikkuse näitajaid (tundlikkus, spetsiifilisus, üldine täpsus) saaks võrrelda valideeritud katsemeetodi asjaomaste väärtustega. Meetodi usaldusväärsust ja võimet õigesti kindlaks teha ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse 2. kategooria ärritavaid kemikaale ning regulatiivsest raamistikust olenevalt ka ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kategooriata kemikaale tuleks kontrollida enne seda, kui meetodit kasutatakse uute uuritavate kemikaalide katsetamiseks.

4. Need tulemuslikkusnõuded põhinevad alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (EC-ECVAM) tulemuslikkusnõuetel (8), mis on ajakohastatud vastavalt ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse klassifitseerimis- ja märgistamissüsteemidele (1) (3). Tulemuslikkusnõuded määrati esialgsel kujul kindlaks pärast valideerimisuuringu (21) lõpuleviimist ja need põhinesid ELi klassifitseerimissüsteemil, mis on esitatud komisjoni 6. augusti 2001. aasta direktiivis 2001/59/EÜ, millega kahekümne kaheksandat korda

kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta¹. Seoses ÜRO klassifitseerimis- ja märgistamissüsteemi GHS kasutuselevõtuga ELis (ELi CLP-määrus) (3), mis toimus enne valideerimisuuringu lõpuleviimist ja käesoleva katsemeetodi valmimist, on tulemuslikkusnõudeid ajakohastatud (8). Ajakohastamine hõlmab peamiselt i) muudatusi tulemuslikkusnõuete võrdluskemikaalide kogumis ja ii) kindlaksmääratud usaldusväärsus- ja täpsusnõudeid (2) (23).

¹ EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.

NAHAÄRRITUSE R_{hE} ABIL *IN VITRO* MÕÕTMISE KATSEMEETODITE TULEMUSLIKKUSNÄITAJAD

5. Tulemuslikkusnäitajad hõlmavad järgmist kolme aspekti (9):
- I. Katsemeetodi olulised koostisosad
 - II. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu
 - III. Usaldusväärsuse ja täpsuse kindlaksmääratud väärtused

I. Katsemeetodi olulised koostisosad

6. Need hõlmavad valideeritud meetodi olulisi struktuurilisi, põhimõttelisi ja teostuslikke osi, mis peaksid olema ka kavandatud, teostuslikult ja põhimõtteliselt sarnase või muudetud meetodi katse-eeskirjas. Sellised osad hõlmavad meetodi eriomadusi, üliolulisi teostuslikke üksikasju ja kvaliteedikontrolli meetmeid. Katsemeetodi oluliste osade säilitamine aitab tõendada, et kavandatud sarnane või muudetud meetod toetub samadele aluspõhimõtetele kui vastav valideeritud võrdlusmeetod (9). Katsemeetodi olulised osad on üksikasjalikult kirjeldatud punktides katsemeetodi 16–21 ja katsetamine peaks toimuma järgmises korras:

Üldtingimused (punkt 16)

Funktsionaalsed tingimused, mis hõlmavad järgmist:

- eluvõimelisus (punkt 17);
- toimimine kaitsekihina (punkt 18);
- morfoloogia (punkt 19);
- reprodutseeritavus (punkt 20); ning
- kvaliteedikontroll (punkt 21)

II. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu

7. Võrdluskemikaale kasutatakse selleks, et teha kindlaks, kas uus või muudetud meetod, mis nii ülesehituse kui ka põhimõtte poolest on tõendatult piisavalt sarnane valideeritud võrdlusmeetodiga või on kolmest valideeritud meetodist ühe väike modifikatsioon, annab usaldusväärsuse ja täpsuse poolest valideeritud võrdlusmeetodi tulemustega võrreldavaid või paremaid tulemusi (2) (8) (16) (23). Tabelis 1 soovitatud 20 võrdluskemikaali hõlmavad eri kemikaaliklassidesse (st funktsionaalrühmale vastavatesse kemikaalikategooriatesse) kuuluvaid kemikaale ja esindavad kogu Draize ärritavusskaalat (mitteärritavatest ainetest kuni tugevat ärritust põhjustavate aineteni). Loetelu ainetest kümme kuuluvad ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse 2. kategooria kemikaalide hulka ja kümme on kategooriata kemikaalid, millest kolm on ÜRO GHS-süsteemi 3. valikkategooria kemikaalid. Käesoleva katsemeetodi kohaselt käsitatakse 3. valikkategooriat kategooria puudumisena. Tabelis 1 loetletud kemikaalid on valitud eelvalideerimisele järgnenud optimeerimisetalpil ja võrdlusmeetodi valideerimisel kasutatud kemikaalide hulgast, arvestades keemilisi funktsionaalrühmi ja füüsikalist olekut (14) (18). Võrdluskemikaalid on vähimalt nõutav arv kemikaale, mida tuleks kasutada selleks, et hinnata esitatud sarnase või muudetud meetodi täpsust ja usaldusväärsust, kuid neid ei tuleks kasutada uute meetodite väljatöötamiseks. Kui mõnda loetletud ainet ei ole saada, võib kasutada muid kemikaale, mille kohta *in vivo* katsega on määratud piisavad võrdlusandmed, eelkõige kemikaale eelvalideerimisele järgnenud optimeerimisetalpil või võrdlusmeetodi valideerimisel kasutatud kemikaalide hulgast. Soovi

korral võib võrdluskemikaalidele miinimumloendisse lisada kavandatud katsemeetodi täpsuse hindamiseks muid kemikaale, mis esindavad muid kemikaaliklasse ja mille kohta on *in vivo* katsega määratud piisavad võrdlusandmed.

Tabel 1. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu nahaärrituse määramise RhE-põhise sarnase või muudetud katsemeetodi täpsuse ja usaldusväärsuse määramiseks¹

Kemikaal	CASi number	Füüsikaline olek	Hinne <i>in vivo</i>	Valideeritud võrdlusmeetodiga <i>in vitro</i> määratud kategooria	ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> kategooria
1-bromo-4-klorobutaan	6940-78-9	vedelik	0	2. kat.	kat-ta
dietüülftalaat	84-66-2	vedelik	0	kat-ta	kat-ta
naftüüläädikhape	86-87-3	tahke	0	kat-ta	kat-ta
allüülfenoksüatsetaat	7493-74-5	vedelik	0.3	kat-ta	kat-ta
isopropanool	67-63-0	vedelik	0.3	kat-ta	kat-ta
4-metüül-iobensaldehüüd	3446-89-7	vedelik	1	2. kat.	kat-ta
metüülstearaat	112-61-8	tahke	1	kat-ta	kat-ta
heptüülbutüraat	5870-93-9	vedelik	1.7	kat-ta	kat-ta
heksüülsaltsülaad	6259-76-3	vedelik	2	kat-ta	kat-ta
kaneelaldehüüd	104-55-2	vedelik	2	2. kat.	kat-ta (vabatahtlikult kohald. kat. 3) ³
<i>1-dekanool</i> ²	<i>112-30-1</i>	<i>vedelik</i>	<i>2.3</i>	<i>2. kat.</i>	<i>2. kat.</i>
3-p-kumenüül-2-metüülpropioonaldehüüd	103-95-7	vedelik	2.3	2. kat.	2. kat.
1-bromoheksaan	111-25-1	vedelik	2.7	2. kat.	2. kat.
2-klorometüül-3,5-dimetüül-4-metoksüpüridiini vesinikkloriid	86604-75-3	tahke	2.7	2. kat.	2. kat.
<i>di-n-propüüldisulfiid</i>	<i>629-19-6</i>	<i>vedelik</i>	<i>3</i>	<i>kat-ta</i>	<i>2. kat.</i>
kaaliumhüdrosiid (5 % vesilahus)	1310-58-3	vedelik	3	2. kat.	2. kat.
5-(1,1-dimetüületüül)-2-metüülbenseentool	7340-90-1	vedelik	3.3	2. kat.	2. kat.
1-metüül-3-fenüül-1-piperasiin	5271-27-2	tahke	3.3	2. kat.	2. kat.
heptanaal	111-71-7	vedelik	3.4	2. kat.	2. kat.
tetrakloroetüleen	127-18-4	vedelik	4	2. kat.	2. kat.

¹ Kemikaalid on valitud järgmiste kriteeriumide põhjal: i) kemikaalid on müügil; ii) kemikaalid esindavad kogu Draize ärritavusskaalat (mitteärritavatest ainetest kuni tugevat ärritust põhjustavate aineteni); iii) nende kõigi keemiline ehitus on hästi teada; iv) nad esindavad samade funktsionaalrühmadega kemikaaliklasse, mida kasutati valideerimisel; ning v) nad ei ole äärmiselt mürgised (näiteks kantserogeensed või viljakust kahjustavad) ja nende kõrvaldamine ei ole seotud ülemääraste kuludega.

² Kemikaalid, mis on ärritavad küüliku jaoks, kuid mille kohta on usaldusväärsed tõendid, et nad ei ole ärritavad inimese jaoks (31) (32) (33).

³ ÜRO GHS-süsteemi, kuid mitte ELi CLP-määruse kohaselt.

III. Usaldusväärsuse ja täpsuse kindlaks määratud väärtused

8. Kui kavandatud sarnane või muudetud meetod antakse üle muudele laboritele, tuleb selle usaldusväärsuse ja asjakohasuse tõendamiseks määrata kõik tabelis 1 loetletud 20 kemikaali vähemalt kolmes laboris. Kuid kui kavandatud meetodit hakatakse kasutama üksnes ühes laboris, siis valideerimiseks ei nõuta selle kontrollimist paljudes laborites. Oluline on siiski, et selliseid valideerimisuuringuid hindaksid sõltumatult vastavalt rahvusvahelistele suunistele (9) rahvusvaheliselt tunnustatud valideerimisasutused. Igas laboris tuleks kõiki 20 võrdluskemikaali uurida kolme sõltumatu katsega, mis tehakse eri koepartiidega ja piisavalt pikkade ajavahemike järel. Iga katse peaks koosnema vähemalt kolmest paralleelselt tehtavast paralleelproovist iga uuritava kemikaaliga, negatiivsest kontrollist ja positiivsest kontrollist.

9. Kavandatud meetodi usaldusväärsuse ja täpsuse väärtuste arvutused tuleks teha, arvestades korraga kõiki järgmisi kriteeriume ja tagades, et usaldusväärsuse ja asjakohasuse väärtused arvutatakse varem kindlaks määratud ja kooskõlalisel viisil:

1. Laborisisese ja laboritevahelise varieeruvuse ning ennustamisvõime (täpsuse) arvutamiseks kõlbavad üksnes andmed, mis on saadud täielikest katseseeriast.
2. Iga võrdluskemikaali lõplik klassifitseerimine igas osalevas laboris peaks põhinema erinevates täielikes katseseeriates määratud eluvõimelisuse keskväärtusel.
3. Laboritevahelise varieeruvuse arvutamiseks kõlbavad üksnes sellised katseandmed, mis on kemikaali kohta saadud kõikides laborites täielikes katseseeriates.
4. Täpsuse väärtuste arvutus tuleks teha üksikute laborite ennustuste põhjal, mis on saadud kõigi 20 võrdluskemikaali jaoks kõigis osalevates laborites.

Katseseeria all mõistetakse siin ühes laboris ühe uuritava kemikaaliga tehtud kolme sõltumatut katset. **Täielik katseseeria** on ühes laboris ühe uuritava kemikaaliga tehtud katseseeria, mille kõik kolm katset on kehtivad. See tähendab, et üksainus vigaseks tunnistatud katse muudab kehtetuks terve kolmest katsest koosneva katseseeria.

Laborisisene reprodutseeritavus

10. Laborisisese korratavuse hinnang peaks näitama, et klassifitseerimistulemused (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kohane 2. kategooria või ilma kategooriata kemikaal), mis on saadud eraldi sõltumatutel määramistel 20 võrdluskemikaaliga ühes laboris, on omavahel kooskõlas vähemalt ($\geq$) 90 % juhtudest.

Laboritevaheline reprodutseeritavus

11. Laboritevahelise reprodutseeritavuse hindamine ei ole oluline, kui kavandatud

meetodit kavatakse kasutada ühesainsas laboris. Kui meetodit tahetakse edasi anda teistesse laboritesse, peaks laboritevahelise varieeruvuse hinnang näitama, et klassifitseerimistulemused (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kohane 2. kategooria või ilma kategooriata kemikaal), mis on saadud eraldi sõltumatutel määramistel 20 võrdluskemikaaliga eelistatavalt vähemalt kolmes laboris, on omavahel kooskõlas vähemalt ($\geq$) 80 % juhtudest.

Ennustusvõime (täpsus)

12. Kavandatud sarnase või muudetud meetodi täpsus (tundlikkus, spetsiifilisus ja üldine täpsus) peaks olema võrreldav valideeritud võrdlusmeetodi omaga või sellest parem, arvestades lisateavet asjakohasuse kohta huvipakkuva liigi puhul (tabel 2). Tundlikkus peaks olema vähemalt 80 % (2) (8) (23). Kavandatud *in vitro* meetodi puhul kohaldatakse ka veel konkreetset lisapiirangut: nimelt on ainult kahte *in vivo* katse järgi 2. kategooria kemikaali, *1-dekanooli* ja *di-n-propüüldisulfiidi* lubatud ekslikult klassifitseerida kategooriata kemikaaliks rohkem kui ühel osaleval laboril. Spetsiifilisus peaks olema vähemalt 70 % (2) (8) (23). Kavandatud *in vitro* meetodi spetsiifilisusega seotud piiranguid rohkem ei ole, st iga osalev labor võib valesti klassifitseerida mis tahes kemikaali, mis *in vivo* katse järgi on kategooriata, kui katsemeetodi lõplik spetsiifilisus on nõutavas vahemikus. Üldine täpsus peaks olema vähemalt 75 % (2) (8) (23). Kuigi valideeritud võrdlusmeetodi tundlikkus tabelis 1 esitatud 20 võrdluskemikaaliga on 90 %, nõutakse sarnaselt või muudetud meetodilt valideerituks pidamiseks minimaalset tundlikkust 80 %, kuna nii *1-dekanool* (piiripealne kemikaal) kui ka *di-n-propüüldisulfiid* (valideeritud võrdlusmeetodi puhul valenegatiiv) ei ole inimese jaoks ärritavad kemikaalid (31) (32) (33), kuigi küülikuga leitakse neil ärritav toime. Kuna RhE-mudelid põhinevad inimpäritoluga rakkudel, võidakse nende mudelitega saada tulemus, et need ei ärrita (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse järgi kategooriata).

Tabel 2. Sarnase või muudetud meetodi valideerituks tunnistamiseks nõutavad tundlikkuse, spetsiifilisuse ja üldise täpsuse ennustusväärtused

Tundlikkus	Spetsiifilisus	Üldine täpsus
$\geq 80 \%$	$\geq 70 \%$	$\geq 75 \%$

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

13. On võimalik, et üks või mitu katset ühe või mitme võrdluskemikaaliga ei vasta katse ja kontrollkemikaalide nõuetekohasuse tingimustele või ei vasta nõuetele muul põhjusel. Puuduvate andmete täiendamiseks on iga uuritava kemikaaliga lubatud teha kuni kaks lisakatset („ülemõõtmine”). Täpsemalt, kuna ülemõõtmise puhul tuleb paralleelselt teha ka positiivse ja negatiivse kontrolli katsed, lubatakse iga uuritava kemikaaliga teha kuni kaks lisakatset.

14. On mõeldav, et isegi pärast ülemõõtmist ei saada igas osalevas laboris iga võrdluskemikaali kohta kokku nõutavat kolme kehtivat katset; nii saadakse ebatäielik andmete tabel. Sellisel juhul peavad olema täidetud kõik järgmised kolm kriteeriumi, et andmekogumeid võiks siiski pidada nõuetele vastavaks:

1. Iga võrdluskemikaali kohta 20st peab olema vähemalt üks täielik katseseeria.

2. Igas laboris vähemalt kolmest osalevast laborist peavad vähemalt 85 % katseseeriast olemas täielikud katseseeriad (20 kemikaaliga; st ühes laboris on lubatud kuni 3 nõutele mittevastavat katseseeriat).
3. Vähemalt 90 % kõigist võimalikest katseseeriast vähemalt kolmes osalevas laboris peavad olemas täielikud (20 kemikaaliga kolmes laboris; st kokku on lubatud kuni 6 nõutele mittevastavat katseseeriat).”

3. Lisatakse järgmised peatükid:

„B.49 *In vitro* imetajarakkude mikrotuumade katse

SISSEJUHATUS

1. *In vitro* mikrotuumade katse (*mikronucleus*, MNvit) on genotoksilisuskatse, milles uuritakse mikrotuumade (MN) esinemist interfaasis olevate rakkude tsütoplasmas. Mikrotuum võib tekkida atsentrilisest kromosoomifragmendist (st milles ei ole tsentromeeri) või terveist kromosoomist, mis ei suuda migreeruda pooluseni raku jagunemise anafaasietapil. Katsega määratakse klastogeensete ja aneugeensete kemikaalide (ainete ja segude) aktiivsus (1) (2) rakkudes, mis on uuritava ainega kokkupuute ajal või pärast seda jagunenud. Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada nii aktiini polümerisatsiooni inhibiitori tsütohalasiin B (tsütöB) kasutamisel põhinevaid katse-eeskirju kui ka selliseid, milles tsütöB-d ei kasutata. TsütöB lisamine enne valitud mitoosi võimaldab kindlaks teha ja selektiivselt analüüsida mikrotuumade esinemissagedust rakkudes, mis on lõpetanud ühe mitoosi, kuna sellised rakud on kahetuumsed (3) (4). Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada ka tsütokineesibloki katse-eeskirju, kui on tõendatud, et uuritud rakupopulatsioon on läbinud mitoosi.

2. Lisaks MNvit-katse kasutamisele mikrotuumi tekitavate kemikaalide (ainete või segude) kindlakstegemiseks võib teavet kromosoomikahjustuste ja mikrotuumade tekkimise kohta saada veel tsütokineesibloki, kinetokooride immunokeemilise märgistamisega või tsentromeeri-/telomeerisondidega hübridiseerimisega (fluorestents *in situ* hübridisatsiooniga (FISH)) kasutamise (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Märgistamist ja hübridiseerimist võib kasutada, kui on tekkinud rohkelt mikrotuumi ja uurija tahab kindlaks teha, kas nende tekkimise põhjuseks on klastogeenne ja/või aneugeenne protsess.

3. Mikrotuumad kujutavad endast kahjustust, mis on edasi antud tütarrakkudele, samas kui metafaasis olevates rakkudes kogunenud kromosoomihälbeid edasi ei anta. Kuna interfaasis olevate rakkude mikrotuumi võib küllalt objektiivselt hinnata, peab katse tegija üksnes määrama, kas rakud on läbinud jagunemise või ei ole ning kui paljudes rakkudes on mikrotuum. Selle tulemusel saab preparaate hinnata suhteliselt kiiresti ja analüüsi saab automatiseerida. Seepärast tasub iga töötlemisega seoses hinnata tuhandeid rakke, mitte sadu; see suurendab katse tõhusust. Lõpuks, kuna mikrotuumad võivad tekkida mahajäänud kromosoomidest, avaneb võimalus kindlaks teha aneuploidisust tekitavaid mõjureid, mida on raske uurida tavaliste kromosoomihälbekatsetega, näiteks OECD katsejuhendiga 473 (käsitleva lisa peatükk B.10) (17). Kuid MNvit-katse ei võimalda eristada polüploidisust tekitavaid kemikaale klastogeensetest kemikaalidest, kui ei kasutata erimeetodeid nagu punktis 2 kirjeldatud FISH.

4. MNvit-katse on *in vitro* meetod, milles tavaliselt kasutatakse inimese või näriliste kultuuris kasvatatud rakke. Meetod võimaldab kromosoomikahjustuste tekitamise võimet igakülgset *in vitro* uurida, kuna sellega saab määrata nii aneugeene kui ka klastogene.

5. MNvit-katse on töökindel ja tõhus paljude rakutüüpide puhul ja nii tsütöB juuresolekul kui ka puudumisel. MNvit-katse kehtivus on tõendatud paljude andmetega, mis on saadud näriliste mitme rakuliiniga (CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) ja inimese lümfotsüütidega (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Need hõlmavad eelkõige rahvusvahelisi valideerimisuuringuid, mida koordineeris Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), ja rahvusvahelise genotoksilisuse

määramise rahvusvahelise seminari ettekandeid (4) (16). Euroopa Komisjoni alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (ECVAM) on tõendite kaalukusel põhineva tagasihaarava valideerimisuringuga olemasolevaid andmeid ka uuesti hinnanud ning katsemeetodi teaduslikku õigsust on toetanud ECVAMi teadusnõustajate komitee (ESAC) (32) (33) (34). On kirjeldatud inimese TK6-lümfoblastoidrakuliini (35), HepG2-rakkude (36) (37) ja primaarsete Süüria hamstri looterakkude (38) kasutamist, kuid valideerimisuringutes neid ei kasutatud.

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

ALGSED KAALUTLUSED

7. *In vitro* tehtavad katsed nõuavad üldjuhul välist metaboolse aktiveerimise allikat, kui rakud ei ole uuritavate kemikaalide suhtes metaboolselt kompetentsed. Väliste metaboolse aktiveerimise süsteem ei ole täielikult sarnane *in vivo* tingimustele. Tuleb hoolitseda, et vältitaks valepositiivseid tulemusi põhjustavaid tingimusi, mis ei peegelda looduslikku mutageensust ja võivad tuleneda pH või osmolaalsuse suurtest muutustest või tsütotoksilisuse kõrgeast tasemest (39) (40) (41). Kui uuritav kemikaal tekitab lisamisel keskkonna pH muutuse, tuleb pH õigeks seada, eelistatult varulahusesse puhvri lisamisega, nii et kõik ruumalad kõikides katsetingimustes ja kõikide kontrollproovidega jääksid samaks.

8. Mikrotuumade tekkimise induktsiooni analüüsimiseks on väga tähtis, et mitoos oleks toimunud nii uuritava kemikaaliga töödeldud kultuurides kui ka töötlemata kultuurides. Kõige informatiivsem mikrotuumade tekke hindamise seisukohast on olukord, kus rakud on lõpetanud ühe mitoosi uuritava kemikaaliga töötlemise ajal või pärast seda.

KATSE PÕHIMÕTE

9. Inimpäritoluga või imetajast saadud rakukultuurid viiakse kokkupuutesse uuritava ainega nii metaboolse aktivatsiooni väliste allika juuresolekul kui ka puudumisel, kui ei kasutata vajaliku metaboliseerimisvõimega rakke. Igas katses tehakse paralleelsed katsed ka lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ja positiivse kontrolli kemikaalidega.

10. Uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või pärast seda kasvatatakse rakke piisavalt kaua, et kromosoomi- või väärnakahjustus võiks viia mikrotuumade tekkimiseni interfaasis olevates rakkudes. Aneuploidse tekitamiseks peaks uuritav aine tavaliselt olema mitoosi ajal juures. Kogutud ja värvitud interfaasirakke uuritakse mikrotuumade olemasolu kindlakstegemiseks. Ideaaljuhul tuleks mikrotuumad arvesse võtta üksnes sellistes rakkudes, mis on lõpetanud mitoosi kas uuritava ainega kokkupuute ajal või kokkupuutejärgse aja jooksul, kui seda kasutatakse. Tsütokineesiblokkeriga töödeldud kultuurides saavutatakse see ainult kahetuumsete rakkude arvessevõtmisega. Tsütokineesiblokkeri puudumise korral on oluline tõendada, et uuritud rakud tõenäoliselt läbisid raku jagunemise uuritava ainega kokkupuute ajal või pärast seda. Kõigi katse-eeskirjade puhul on oluline tõendada, et rakkude paljunemine on toimunud nii kontrollkultuurides kui ka uuritava ainega töödeldud kultuurides, ning vaja on hinnata ainest tingitud tsütotoksilisust või tsütostaasi kultuurides (või paralleelkultuurides), mida uuritakse mikrotuumade esinemise suhtes.

KATSE KIRJELDUS

Ettevalmistused

11. Võib kasutada primaarsete inimese perifeerse vere lümfotsüütide rakukultuuri (5) (19) (42) (43) ja mitmeid näriliste rakuliine nagu CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Muude rakuliinide ja -tüüpide kasutamist tuleb põhjendada, nagu on kirjeldatud katse kehtivuse kriteeriumide punktis, tõendades, et katse annab nendega usaldusväärseid tulemusi. Kuna mikrotuumade esinemise taustsagedus mõjutab katse tundlikkust, soovitatakse kasutada rakutüüpe, millel mikrotuumade moodustumise taustsagedus on madal ja stabiilne.

12. Inimese perifeerse vere lümfotsüüdid tuleb saada noorelt (ligikaudu 18- kuni 35-aastaselt), tervelt mittesuitsetavalt isikult, kes teadaolevalt ei ole hiljuti genotoksiliste kemikaalide ega radiatsiooniga kokku puutunud. Kui eri doonoritelt kogutud rakud kasutamiseks ühendatakse, tuleb esitada doonorite arv. Mikrotuumade esinemissagedus suureneb vanusega; see tendents on märgatavam naiste kui meeste puhul (44) ning seda tuleks ühendatavate doonorirakkude valimisel arvesse võtta.

Kasvukeskkonnad ja kultiveerimistingimused

13. Rakukultuuride säilitamiseks tuleks kasutada sobivat kasvukeskkonda ja inkubeerimistingimusi (kasvunõud, CO₂ kontsentratsioon, temperatuur ja niiskus). Püsivaid rakuliine ja -tüvesid tuleb korrapäraselt kontrollida modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ning mükoplasmaga saastumise puudumise suhtes; ei tohiks kasutada rakuliine või -tüvesid, mis on saastunud või mille modaalne kromosoomide arv on muutunud. Kasutatavate rakkude normaalse rakutsükli kestus katselabori kasvutingimustes peaks olema teada. Kui kasutatakse blokeeritud tsütokineesi meetodit, tuleb tsütokineesi inhibiitori kontsentratsioon konkreetse rakutüübi jaoks optimeerida ja näidata, et see annab hindamiseks vajalike kahetuumsete rakkude hea saagise.

Kultuuride ettevalmistamine

14. Püsivad rakuliinid ja -tüved: rakud paljundatakse tüvikultuuridest, mis on külvatud kasvukeskkonda sellise tihedusega, et rakukultuur ei jõua monokihi puhul söödett täielikult katta enne kogumisaega ning suspensioonkultuuri puhul ei muutu liiga tihedaks, ja inkubeeritakse 37 °C juures.

15. Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (näiteks hepariiniga) töödeldud täisverd või eraldatud lümfotsüüte kasvatatakse enne uuritava aine ja tsütob-ga kokkupuudet mitogeeni, näiteks fütohemaglutiniini juuresolekul.

Metaboolne aktivatsioon

16. Kui kasutatakse puuduliku endogeense metabolismivõimega rakke, tuleks kasutada välist metaboliseerivat süsteemi. Enimkasutatav süsteem on näriliste ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254-ga (45) (46) või fenobarbitooni ja β -naftoflavooniga (46) (47) (48) (49) töödeldud maksa postmitokondriaalne fraktsioon (S9), mida on täiendatud koefaktoritega. Fenobarbitooni ja β -naftoflavooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (50) ega määrusega (EÜ) nr 850/2004 (püsivate orgaaniliste saasteainete kohta) (66) ning on tõendatud, et see on segafunktsiooniga

oksüdaaside indutseerimisel sama tõhus kui Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). Postmitokondriaalset fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonis 1–10 mahuprotsenti lõplikus katsekeskkonnas. Metaboolse aktivatsiooni süsteemi tingimuste valik võib sõltuda uuritava aine keemilisest aineklassist ja mõnel juhul võib olla sobiv kasutada rohkem kui ühte S9 kontsentratsiooni.

17. Katse tegemiseks võib kasutada geneetiliselt muundatud rakuliine, milles töötavad konkreetsed inimese või närilise aktiveerivad ensüümid; sel juhul ei ole välist metaboolse aktivatsiooni süsteemi vaja. Sel juhul peab rakuliini valik olema teaduslikult põhjendatud, näiteks sellega, et segafunktsiooniga oksüdaasid on seotud uuritava aine metabolismiga (51) ja on tundlikud teadaolevate klastogeenide ja aneugeenide toime suhtes (vt katse kehtivuse kriteeriume käsitlev punkt). Tuleb endale aru anda, et rakus töötav(ad) segafunktsiooniga oksüdaas(id) ei tarvitse uuritavat ainet metaboliseerida; sellisel juhul katse negatiivne tulemus ei tõenda, et uuritav aine ei suuda tekitada mikrotuumi.

Uuritav aine ettevalmistamine

18. Tahke uuritav aine tuleb lahustada sobivas lahustis või kandaines ja vajaduse korral lahjendada enne rakkude töötlemist. Vedelat kemikaali võib lisada otse katsesüsteemi ja/või lahjendada enne töötlemist. Gaasi või lenduva kemikaali uurimiseks tuleks tavalist katseeeskirja sobivalt muuta, näiteks töödelda suletud anumad (52) (53). Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Katse tingimused

Lahusti/kandaine

19. Lahusti/kandaine ei tohiks uuritava ainega reageerida ega kasutatavas kontsentratsioonis oluliselt kahjustada rakkude eluvõimet või S9 aktiivsust. Kui kasutatakse muid aineid peale tunnustatud lahustite/kandainete (vesi, rakukultuuri kasvukeskkond, dimetüülsulfoksiid), tuleb esitada tõendavad andmed, et aine sobib uuritava ainega kasutamiseks ja ei ole genotoksiline. Soovitav on võimaluse korral alati kõigepealt kaaluda vee kui lahusti/kandaine kasutamist.

TsütöB kui tsütokineesi blokeerija kasutamine

20. Üks olulisemaid asju MNvit-katse tegemisel on tagada, et loendatud rakud oleksid uuritava ainega töötlemise või töötlemisjärgse inkubeerimise ajal (kui rakke pärast töötlemist inkubeeritakse) lõpetanud mitoosi. Tsütokineesi blokeerimiseks on kõige rohkem kasutatud tsütöB-d, kuna see inhibeerib aktiini polümerisatsiooni, hoiab sellega ära tütarakkude eraldumise pärast mitoosi, mille tagajärjel tekivad kahetuumsed rakud (5) (54) (55). Mikrotuumade loendamise saab seepärast piirata üksnes selliste rakkudega, mis on töötlemise ajal või pärast seda läbinud mitoosi. Samal ajal võib mõõta uuritava aine mõju raku paljunemise kineetikale. Kui kasutatakse inimese lümfotsüüte, tuleks tsütokineesi blokeerimiseks kasutada tsütöB-d, kuna tsükli aeg sõltub kultuurist ja doonorist ning kuna fütohemaglutiniin ei toimi kõikidele lümfotsüütidele. Rakuliinide katsetamisel on kasutatud ka muid meetodeid, et teha kindlaks, kas loendatavad rakud on jagunenud; neid meetodeid on käsitletud punktis 26.

21. Labor peaks iga rakutüübi jaoks määrama tsütob sobiva kontsentratsiooni, et saavutada lahusti/kandaine kontrollkultuuris kahetuumsete rakkude optimaalne sagedus. Tsütob sobiv kontsentratsioon on tavaliselt vahemikus 3–6 µg/ml.

Rakkude paljunemise ja tsütotoksilisuse mõõtmine ning kokkupuutekontsentratsiooni valimine

22. Katsetes kasutatava uuritava aine kõrgeima kontsentratsiooni kindlaksmääramisel tuleks vältida kontsentratsioone, mis võivad tekitada kunstlikult positiivseid tulemusi, näiteks kontsentratsioone, mis on liiga tsütotoksilised, põhjustavad sadenemist kasvukeskkonnas ja pH või osmolaalsuse olulist muutust (39) (40) (41).

23. Rakkude paljunemise mõõtmisega tõendatakse, et töödeldud rakud on katse ajal läbinud mitoosi ja et töötusi tehakse lubatava tsütotoksilisustaseme juures (vt punkt 29). Metaboolset aktivatsiooni vajavate rakkude puhul tuleks tsütotoksilisus määrata metaboolse aktivatsiooniga ja ilma aktivatsioonita, kasutades rakkude arvukuse suhtelist suurenemist (*relative increase in cell counts*, RICC) või suhtelist rakupopulatsiooni kahekordistumist (*relative population doubling*, RPD) (vt võrrandid, 2. liide), kui ei kasutata tsütob-d. Tsütob kasutamise korral võib tsütotoksilisuse määrata replikatsiooniindeksi (*replication index*, RI) abil (vt võrrand, 2. liide).

24. Rakukultuuride töötlemine tsütob-ga ning ühe-, kahe- ja paljutuumsete rakkude suhtelise esinemissageduse määramine kultuuris on täpne meetod, millega saab mõõta rakkude töötlemise mõju rakkude paljunemisele, samuti töötlemise tsütotoksilist või tsütostaatilist mõju (5) ja tagada, et loendatakse ainult töötlemise ajal või pärast seda jagunenud rakke.

25. Tsütob-ga tehtavates katsetes saab tsütostaasi/tsütotoksilisust mõõta tsütokineesi blokiga paljunemise indeksi (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) järgi (5) (26) (56) või tuletada selle näitaja kultuuri vähemalt 500 raku replikatsiooniindeksist (RI) (vt võrrand, 2. liide). Kui rakkude paljunemise hindamiseks kasutatakse tsütob-d, tuleks CBPI või RI määrata vähemalt 500 rakust kultuuri kohta. Selliseid mõõtmisi võib töödeldud ja kontrollkultuuri võrdlemise abil muuhulgas kasutada tsütotoksilisuse hindamiseks. Muude tsütotoksilisuse näitajate (näiteks pinna katmine, rakkude arvu, apoptoosi, nekroosi ja metafaasi loendamine) hindamine võib anda kasulikku teavet.

26. Ilma tsütob-ta tehtavates katsetes on vaja tõendada, et kultuuris loendatavad rakud on läbinud raku jagunemise uuritava ainega kokkupuute ajal või pärast seda, muidu võidakse saada valenegatiivne tulemus. Üksnes jagunenud rakkude loendamise tagamiseks on kasutatud selliseid meetodeid nagu bromodesoksüüridiini (BrdU) viimine rakkudesse ja järgnev määramine, et kindlaks teha replitseerunud rakud (57), kloonide moodustamine, kui püsivate rakuliinide rakke töödeldakse ja loendatakse kohapeal mikroskoobipreparaadis (paljunemisindeks, PI) (25) (26) (27) (28), rakupopulatsiooni suhtelise kahekordistumise (RPD) või rakkude arvukuse suhtelise suurenemise (RICC) mõõtmine või muud usaldusväärsed meetodid (16) (56) (58) (59) (vt võrrandid, 2. liide). Muude tsütotoksilisuse või tsütostaasi näitajate (näiteks pinna katmine, rakkude arvu, apoptoosi, nekroosi ja metafaasi loendamine) hindamine võib anda kasulikku teavet.

27. Tuleks hinnata vähemalt kolme analüüsivat kontsentratsiooni. Selle saavutamiseks võib olla tarvis teha katseid suure arvu lähedaste kontsentratsioonidega ja määrata mikrotuumade moodustumine sellistel kontsentratsioonidel, mille tsütotoksilisus on lubatavas

vahemikus. Teine võimalus on teha eelnev tsütotoksilisuse katse, et piirata otsustava katse kontsentratsioonivahemikku.

28. Kõrgeima kontsentratsiooni tsütotoksilisus peaks olema $55 \pm 5\%$. Kõrgemal kontsentratsioonil võivad kromosoomikahjustused tekkida tsütotoksilisuse kõrvalnähtuna (60). Tsütotoksilisuse esinemise korral peaksid katse tegemiseks valitud kontsentratsioonid katma vahemiku $55 \pm 5\%$ tsütotoksilisuse tekitamisest kuni vähese või puuduva tsütotoksilisuseni.

29. Kui tsütotoksilisust ega sadenemist ei esine, peaks kõrgeim katses kasutatav kontsentratsioon olema 0,01 M, 5 mg/ml või 5 µl/ml, olenevalt sellest, mis on kõige madalam. Analüüsiks valitud kontsentratsioonid ei tohiks üldiselt olla suuremate vahedega kui 10 korda. Järsu kontsentratsiooni-mõju sõltuvusega uuritava aine puhul võib olla vajalik kasutada väiksemat uuritava aine kontsentratsioonide vahet, et loendada kultuure ka mõõduka või madala toksilisuse vahemikus.

30. Kui piiravaks teguriks on lahustuvus, peaks kõrgeim uuritav kontsentratsioon olema selline, mille juures kultuuris on näha väga nõrka sadet, kui see ei takista loendamist ja kui piiravaks ei muutu tsütotoksilisus. Sadenemist tuleks hinnata selliste meetoditega nagu valgusmikroskoopia, märkides ära püsima jääva või rakkude kasvatamise ajal (töötlemise lõpuks) tekkiva sademe.

Kontrollkatsed

31. Igas uuringus kasutatakse paralleelseid positiivseid ja lahusti/kandeaine kontrollkatseid metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta.

32. Positiivne kontroll on vajalik tõendamiseks, et kasutatavad rakud ja katse-eeskiri võimaldavad teha kindlaks klastogeene ja aneugeene ning kinnitada S9 valmistise metabolismivõimet. Positiivse kontrolli katses tuleks kasutada teadaolevaid mikrotooma moodustumist põhjustavaid aineid sellisel kontsentratsioonil, mis põhjustab taustaga võrreldes väikese, kuid korratava mikrotooma esinemissageduse suurenemise ja tõendab katsesüsteemi tundlikkust. Positiivse kontrolli kemikaali kontsentratsioon valitakse nii, et mõju oleks selge, kuid et loendaja kohe ei taipaks, millised kodeeritud mikroskoobipreparaatidest on positiivse kontrolli katsed.

33. Tuleks kasutada metaboolset aktivatsiooni vajavat klastogeeni (näiteks tsüklofosfamiid, benzo[a]püreen), kuna nii on võimalik tõendada katsesüsteemi metaboolset kompetentsust ja suutlikkust teha kindlaks klastogeene. Kasutada võib ka muid positiivse kontrolli kemikaale, kui see on õigustatud. Kuna mõni metaboolset aktivatsiooni vajav positiivse kontrolli kemikaal võib teatud töötlemistingimustes või teatava rakuliini puhul olla aktiivne ilma välise metaboolse aktivatsioonita, on valitud rakuliini ja kontsentratsiooni puhul vaja kontrollida metaboolse aktivatsiooni vajalikkust ja S9 valmistise aktiivsust.

34. Praegu ei teata ühtegi aneugeeni, mille genotoksilisuse avaldumiseks oleks vaja metaboolset aktivatsiooni (16). Praegu on aneugeense aktiivsuse positiivse kontrolli kemikaalideks tunnustatud näiteks kolhitsiin ja vinblastiin. Võib kasutada muid kemikaale, kui need tekitavad mikrotoomi kas üksnes või peamiselt aneugeense toime kaudu. Kahe positiivse kontrolli (klastogeensuse ja aneugeensuse kontroll) vajaduse vältimiseks ilma metaboolse aktivatsioonita võib aneugeensuse kontrolli kasutada positiivse kontrollina ilma S9-ta ja klastogeensuse kontrolli võib kasutada selleks, et kontrollida kasutatud metaboolse aktivatsiooni süsteemi adekvaatsust. S9 juuresolekut mittevajavate rakkude puhul tuleb

kasutada nii klastogeensuse kui ka aneugeensuse positiivset kontrolli. Soovitavad positiivse kontrolli kemikaalid on 3. liites.

35. Võib kaaluda samasse keemiliste ainete klassi kuuluva positiivse kontrolli kemikaali kasutamist, kui sobiv aine on kättesaadav. Kõik kasutatud positiivse kontrolli kemikaalid peaksid sobima rakutüübile ja aktivatsioonitingimustele.

36. Lahusti/kandeaine kontrollkatsed tuleb teha kultuuri iga kogumisaja jaoks. Lisaks tuleb kasutada ka töötlemata negatiivset kontrolli (ei sisalda lahustit/kandeainet), kui avaldatud andmete või labori varasemate kontrollikatsetega ei ole tõendatud, et valitud lahustil ei ole kasutatava kontsentratsiooni juures kahjulikku ega genotoksilist mõju.

KATSE KÄIK

Töötlemiskava

37. Selleks et suurendada konkreetset rakutsükli etapil toimiva aneugeeni või klastogeeni kindlakstegemise tõenäosust, on väga oluline, et uuritava ainega töödeldaks piisavalt palju rakke nende rakutsükli igal etapil. Rakuliinide ja primaarsete rakkude kultuuride töötlemise kava võib seepärast mõnevõrra erineda kavast, mida kasutatakse lümfotsüütide puhul, mille rakutsükli alustamiseks on vaja mitogeenset stimulatsiooni, vt lähemalt punktid 41–43 (16).

38. Teoreetilistest kaalutlustest ja avaldatud andmetest (18) tuleneb, et enamiku aneugeeni ja klastogeeni võib kindlaks teha lühiajalise töötlemisega (3–6 tundi) S9 juuresolekul ja puudumisel, millele järgneb uuritava aine eemaldamine ja rakkude kasvatamine 1,5 kuni 2,0 rakutsükli jooksul (6). Rakud kogutakse kas siis, kui töötlemise algusest on möödunud ajavahemik, mis vastab umbes 1,5–2,0 rakutsüklile normaalsete (see tähendab töötlemata) rakkude puhul, või töötlemise lõpus (vt tabel 1). Proovide võtmise või kogumise aega võib pikendada, kui on teada või võib oletada, et uuritav aine mõjutab rakutsükli pikkust (näiteks nukleosiidianaalooide puhul).

39. Kuna S9 valmistis võib kultuuris kasvatatava imetajaraku jaoks olla toksiline, kasutatakse pikendatud kokkupuuteajaga (1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestust) töötlemist üksnes S9 puudumisel. Pikendatud töötlemisaja puhul võib valida, kas töödelda rakke uuritava kemikaaliga tsütoB puudumisel või juuresolekul. Need valikvariandid on ette nähtud olukorra jaoks, kus võib karta, et uuritav aine ja tsütoB mõjutavad teineteist.

40. Pakutavad rakkude töötlemiskavad on esitatud tabelis 1. Esitatud üldisi töötlemiskavu võib muuta, et võtta arvesse uuritava aine stabiilsust või reaktsioonivõimet või kasutatavate rakkude konkreetseid kasvunäitajaid. Töötlemine peab alati algama ja lõppema rakkude eksponentsiaalse kasvu ajal. Töötlemiskavu on täpsemalt kirjeldatud punktides 41–47.

Tabel 1. Rakkude töötlemis- ja kogumisajad MNvit-katse puhul

Lümfotsüüdid, primaarsed rakud ja rakuliinid, mida töödeldakse tsütoB	+ S9	Töödeldakse 3–6 tundi S9 juuresolekul; eemaldatakse S9 ja töötlemiskeskond; lisatakse uus kasvukeskkond ja tsütoB;
---	------	--

<u>lisamisega</u>		rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.
	– S9 Lühiajaline kokkupuude	Töödeldakse 3–6 tundi; eemaldatakse töötlemiskeskond; lisatakse uus kasvukeskkond ja tsütoB; rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.
	– S9 Pikendatud kokkupuude	<u>Variant A:</u> töödeldakse tsütoB juuresolekul 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul; rakud kogutakse kokkupuuteaja lõpus. <u>Variant B:</u> töödeldakse 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul; eemaldatakse uuritava aine; lisatakse uus kasvukeskkond ja tsütoB; rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.
Rakuliinid, mida töödeldakse <u>ilma tsütoB lisamiseta</u> (Kõik toimub eespool esitatud kavade kohaselt, ainult tsütoB-d ei lisata.)		

Lümfotsüüdid, primaarsed rakud ja rakuliinid, mida töödeldakse tsütoB lisamisega

41. Kõige tõhusam lähenemisviis lümfotsüütide puhul on alustada uuritava ainega kokkupuudet pärast 44–48 tunni möödumist fütohemaglutiniiniga stimuleerimisest, kui tsükli sünkronisatsioon on kadunud (5). Esialgses katses töödeldakse rakke 3–6 tundi uuritava ainega S9 puudumisel ja juuresolekul. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värske kasvukeskkonnaga, mis sisaldab tsütoB-d, ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

42. Kui mõlemad esialgsed lühiajalise töötlemise (3–6 tundi) katsed annavad negatiivse või ebaselge tulemuse, kasutatakse järgnevat pikendatud töötlemis- või kokkupuuteaega ilma S9-ta. Kasutada võib kahte töötlemise varianti, mis on võrdselt lubatavad. Stimuleeritud lümfotsüütide puhul on siiski vahest sobivam kasutada varianti A, kuna eksponentsiaalne kasv võib 96 tundi pärast stimuleerimist olla juba vähenemas. Variandi B puhul ei tohiks rakukultuurid lõpliku kogumise ajaks jõuda pinna kinnikatmiseni.

- Variant A: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul ja kogutakse töötlemisaja lõpus.
- Variant B: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värske kasvukeskkonnaga ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

43. Primaarseid rakke ja rakuliine tuleks töödelda samuti kui lümfotsüüte, kuid esimesi ei ole vaja stimuleerida 44–48 tundi fütohemaglutiniiniga. Muid rakke kui lümfotsüüte tuleks töödelda uuritava ainega nii, et katse lõpetamise ajal on rakud ikka veel logaritmilises kasvufaasis.

Rakuliinid, mida töödeldakse ilma tsütob lisamiseta

44. Rakke tuleks töödelda 3–6 tunni jooksul S9 juuresolekul ja puudumisel. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värske kasvukeskkonnaga ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

45. Kui mõlemad esialgsed lühiajalise töötlemise (3–6 tundi) katsed annavad negatiivse või ebaselge tulemuse, kasutatakse järgnevat pikendatud töötlemis- või kokkupuuteaega (ilma S9-ta). Kasutada võib kahte töötlemise varianti, mis on võrdselt lubatavad:

- Variant A: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul ja kogutakse töötlemisaja lõpus.
- Variant B: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värske kasvukeskkonnaga ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

46. Monokihtides võib pärast 3–6-tunnise töötlemise lõppu olla mitoosifaasi rakke (mida võib ära tunda selle järgi, et need on ümmargused ja tulevad pinna küljest lahti). Kuna mitoosifaasis rakud tulevad kergesti lahti, võivad need uuritavat ainet sisaldava keskkonna eemaldamisel minna kaotsi. Need tuleb kultuuri pesemisel kokku koguda ja kultuuri tagasi panna, et vältida mitoosifaasi jõudnud ja võimalikke mikrotoumi sisaldavate rakkude kaotamine kogumise ajal.

Rakukultuuride arv

47. Uuritava aine iga kontsentratsiooni juures, samuti lahusti/kandaine kontrolli ja negatiivse kontrolli puhul tuleks alati kasutada kaht paralleelkultuuri. Kui labori varasemad andmed näitavad, et paralleelkultuuride erinevus on väike, võib olla vastuvõetav ühe kultuuri kasutamine. Üksikkultuuride kasutamisel tuleks kasutada suuremat arvu kontsentratsioone.

Rakkude kogumine ja mikroskoobipreparaadi ettevalmistamine

48. Iga rakukultuur kogutakse ja töödeldakse eraldi. Rakkude ettevalmistamine võib hõlmata hüpotoonilist töötlust, kuid see etapp ei ole vajalik, kui vajalik rakkude laotus saadakse muul viisil. Mikroskoobipreparaadi ettevalmistamiseks võib kasutada mitmesuguseid meetodeid, kui on saadud kvaliteetsed, loendamiseks sobivad rakkude valmistised. Säilitada tuleks rakkude tsütoplasma, et oleks võimalik määrata mikrotoumi ja (blokeeritud tsütokineesi meetodi puhul) usaldusväärselt kindlaks teha kahetuumseid rakke.

49. Mikroskoobipreparaate võib värvida mitme meetodiga, nagu näiteks Giemsa meetodiga või fluorestseerivate DNA-spetsiifiliste värvainetega (59). DNA-spetsiifilise värvaine kasutamine (nt akridiinoranž (61) või Hoechst 33258 + püroniin-Y (62)) võib kõrvaldada mõned muude kui DNA-spetsiifiliste värvainete kasutamisega seotud artefaktid. Kui soovitakse saada teavet mikrotoomade moodustumise mehhanismi kohta, võib mikrotoomade sisalduse (kromosoom/kromosoomifragment) kindlakstegemiseks kasutada kinetokoorivastaseid antikehi, fluoretsenti *in situ* hübridisatsiooniga (FISH)

pantsentromeersete DNA-sondidega või praimitud *in situ* märgistamist pantsentromeerispetsiifilise praimeriga koos DNA sobiva vastandvärvimisega. Klastogeenide ja aneugeenide eristamiseks võib kasutada muid meetodeid, mille kohta on tõendatud, et need on tõhusad.

Analüüs

50. Kõik mikroskoobipreparaadid, sh lahusti/kandeaine ning positiivse ja negatiivse kontrolli omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kodeeritud proovide analüüsimiseks võib kasutada ka valideeritud automaatseid voolutsütomeetria või kujutise analüüsi süsteeme.

51. TsütoB-ga töödeldud kultuuride puhul tuleks mikrotoomade sagedust analüüsida vähemalt 2000 kahetuumset rakus iga kontsentratsiooni kohta (vähemalt 1000 kahetuumset rakus iga kultuuri kohta; kaks kultuuri igal kontsentratsioonil). Üheainsa kultuuri kasutamisel tuleks kõnealuse kultuuri kohta loendada vähemalt 2000 kahetuumset rakku igal kontsentratsioonil. Kui igal kontsentratsioonil on loendamiseks kättesaadavad oluliselt vähem kui 1000 kahetuumset rakku või üheainsa kultuuri kasutamisel 2000 rakku ja kui olulist mikrotoomade esinemissageduse suurenemist ei täheldata, tuleb katset korrata suurema rakkude arvuga või vähem mürgise kontsentratsiooniga, olenevalt sellest, kumb on sobivam. Tuleks jälgida, et ei loendataks ebakorrapärase kujuga kahetuumseid rakke või rakke, mille kaks tuuma on oluliselt erineva suurusega; samuti ei tohiks kahetuumseid rakke segi ajada halvasti eraldunud paljutuumsete rakkudega. Rakke, mis sisaldavad rohkem kui kahte peamist tuuma, ei tuleks mikrotoomade loendamisel arvesse võtta, kuna sellistes rakkudes võib mikrotoomade esinemise taustsagedus olla kõrgem (63) (64). Ühetuumsete rakkude loendamine võib olla lubatav, kui on näidatud, et uuritav aine segab tsütoB toimet.

52. TsütoB-ga töötlemata kultuuride puhul tuleks mikrotoomade sagedust analüüsida vähemalt 2000 rakus iga kontsentratsiooni kohta (vähemalt 1000 rakus iga kultuuri kohta; kaks kultuuri igal kontsentratsioonil). Kui kasutatakse ühtainukest kultuuri igal kontsentratsioonil, tuleks kõnealusest kultuurist loendada vähemalt 2000 rakku.

53. Kui kasutatakse tsütoB-d, tuleks määrata tsütokineesi blokiga paljunemise indeks (CBPI) või replikatsiooniindeks (RI) (vt 2. liide), kasutades vähemalt 500 rakku kultuuri kohta. Kui töötlemine toimub ilma tsütoB juuresolekuta, on oluline tõendada, et loendatud rakud on paljunenud (vt punktid 24–27).

Katse kehtivuse kriteeriumid

54. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud MNvit-katse kasutamist kavandav labor peaks tõendama, et suudab usaldusväärselt ja õigesti määrata teadaoleva aneugeense või klastogeense mõjuga kemikaale koos metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta, samuti teadaolevalt ilma sellise toimeta kemikaale, kasutades 3. liites esitatud võrdluskemikaale. Tõendina oma suutlikkusest käesolevat katsemeetodit korralikult rakendada peaks labor esitama tõendid, et mikrotoomade moodustumise seisukohast loendatavad rakud on läbinud ühe rakujaunemise, kui katse viiakse läbi ilma tsütoB kasutamisetä.

55. Võrdluskemikaalidena soovitatakse kasutada 3. liites esitatud kemikaale. Võib kasutada ka asendavaid või täiendavaid kemikaale, kui nende toime on teada ja need tekitavad mikrotoomi sama toimemehhanismi kaudu ning on näidatud, et need on asjakohased MNvit-eeskirja järgi uuritavate kemikaalide puhul. Põhjendus võiks hõlmata paljude erinevate

ainetega tehtud valideerimisuuringut või valideerimisuuringut, mis on suunatud kitsamale aineteringile, mis on seotud uuritava aine kemikaaliklassiga või uuritava kahjustusmehhanismiga.

56. Lahusti/kandeaine kontrollid ja töötlemata kultuurid peaksid andma reprodutseeritavalt madalad ja kooskõlalised mikrotuumade tekke sagedused (punktis 11 nimetatud rakutüüpide puhul tavaliselt 5–25 mikrotuumat 1000 raku kohta). Muul rakutüübil võib olla teistsugune tulemustevahemik, mis tuleks kindlaks teha, kui rakutüüpi valideeritakse MNvit-katses kasutamiseks. Negatiivse kontrolli, lahusti ja positiivse kontrolli andmeid tuleks kasutada varasematel andmetel põhinevate kontrollvahemike kindlakstegemiseks. Osutatud väärtusi tuleks kasutada selleks, et otsustada, kas katse paralleelsed negatiivse ja positiivse kontrolli tulemused on adekvaatsed.

57. Kui katse-eeskirjas tehakse väike muudatus (näiteks kasutatakse automaatset loendamist käsitsi loendamise meetodite asemel, kasutatakse uut rakutüüpi), tuleks enne muudetud katse-eeskirja lubatavaks lugemist tõendada, et ka muudetud katse on tõhus. Tõhususe tõendamiseks tuleb muuhulgas tõendada, et on võimalik kindlaks teha peamisi kromosoomide katkemise, lisandumise või kaotamineku mehhanisme ja et on võimalik saada sobivad positiivse ja negatiivse kontrolli tulemused üksiku uuritava aine kemikaaliklassi või paljude uuritavate ainete puhul.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste käsitlemine

58. Kui kasutatakse tsütokineesibloki meetodit, võetakse mikrotuumade hindamisel arvesse ainult kahetuumsetes rakkudes leitud mikrotuumade esinemissagedust (sõltumatult mikrotuumade arvust ühe raku kohta). Ühe või kahe mikrotuumaga või suurema mikrotuumade arvuga rakkude arvu loendamine võib anda kasulikku teavet, kuid ei ole kohustuslik.

59. Paralleelselt tuleks mõõta kõikide töödeldud kultuuride ja lahusti/kandeaine kontrollikultuuride juures avaldunud tsütotoksiline ja/või tsütostaatiline mõju (58). Kui kasutatakse tsütokineesi bloki meetodit, tuleks rakutsükli hilineamise mõõtmise järgi arvutada kõikide töödeldud ja kontrollikultuuride puhul tsütokineesi blokiga paljunemise indeks (CBPI) ja replikatsiooniindeks (RI). Tsütoblastide puudumise korral tuleks kasutada kas RPDd, RICCi või PId (vt 2. liide).

60. Tulemused esitatakse iga üksiku kultuuri kohta. Lisaks esitatakse kokkuvõtte kõikidest tulemustest tabeli kujul.

61. Mikrotuumade tekkimist MNvit-katses võivad kemikaalid põhjustada sellega, et nende tõttu kromosoomid katkevad, lähevad kaotsi või esinevad mõlemad variandid korraga. Võib kasutada kinetokoorivastaseid antikehi, tsentromeerispetsiifilisi *in situ* sonde või muid meetodeid, et määrata kindlaks, kas mikrotuumade tekkemehhanism on seotud klastogeense ja/või aneugeense toimega.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

62. Selget positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja täiendava katsega kontrollida. Ebamäärase tulemust võib selgitada veel 1000 raku vaatlemisega kõikidest kultuuridest, et vältida kultuuride kodeerimise mõttetuks muutumist. Kui see lähenemisviis ei võimalda

tulemust selgitada, tuleks teha edasisi katseid. Järelkatsete tegemisel tuleks kaaluda katse parameetrite muutmist laiendatud või kitsamaks muudetud katsetingimuste vahemikus. Katse parameetrid, mida võidakse muuta, hõlmavad kasutatavate kontsentratsioonide jaotust, töötlemise ja rakkude kogumise ajastust ja/või metaboolse aktiveerimise tingimusi.

63. Positiivse tulemuse määramiseks on mitmeid kriteeriume, näiteks mikrotoumi sisaldavate rakkude arvu kontsentratsioonist sõltuv suurenemine või statistiliselt oluline suurenemine. Esmalt tuleks arvesse võtta tulemuste bioloogilist tähtsust. Vastuse bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas leitud väärtused on varasemate kontrollkatsete vahemikus või väljaspool seda vahemikku. Katsetulemuste hindamisel võib abivahendina kasutada sobivaid statistilisi meetodeid (65). Kuid statistiliste katsete tulemusi tuleks hinnata, võttes arvesse saadava tulemuse sõltuvust annusest. Samuti tuleks arvesse võtta reprodutseeritavust ja varasemaid andmeid.

64. Kuigi enamik katseid annab selge positiivse või negatiivse tulemuse, ei ole mõnel harval juhul võimalik andmete alusel teha kindlat otsust uuritava aine mõju kohta. Tulemused võivad jääda ebaselgeks või küsitavaks, olenemata sellest, kui palju katset korraldatakse.

65. MNvit-katse positiivne tulemus näitab, et uuritav aine tekitab imetajarakkude kultuuris kromosoomide katkemist või kadu. Negatiivne tulemus näitab, et konkreetsetes katsetingimustes ei põhjusta uuritav aine imetajarakkude kultuuris kromosoomide katkemist ega/või lisandumist või kadu.

Katseprotokoll

66. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

Uuritav kemikaal:

- identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr ja EÜ nr;
- füüsikaline olek ja puhtus;
- uuringu läbiviimisel olulised füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritava aine võime reageerida lahusti/kandeainega või rakukultuuri keskkonnaga.

Lahusti/kandeaine:

- lahusti/kandeaine valiku põhjendus;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines.

Rakud:

- kasutatud rakkude tüüp ja päritolu;
- kasutatud rakutüübi sobivus;

- mükoplasma puudumine, vajaduse korral;
- teave rakutsükli pikkuse kohta, pooldumisaeg või paljunemisindeks;
- lümfotsüütide kasutamise korral veredoonorite arv, sugu ja vanus, vajaduse korral;
- lümfotsüütide kasutamise korral näidatakse, kas uuritava ainega viidi kokkupuutesse kogu veri või eraldatud lümfotsüüdid;
- ümberkülvide arv, vajaduse korral;
- rakukultuuri säilitamise meetodid, vajaduse korral;
- kromosoomide modaalarv;
- normaalse (negatiivse kontrolli) rakutsükli kestus.

Katsetingimused:

- tsütokineesi blokeeriv aine (nt tsütöB), kui seda kasutatakse, selle kontsentratsioon ja rakkude selle ainega kokkupuute kestus;
- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sh nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud, kui need on olemas;
- kasvukeskkonna koostis, CO₂ kontsentratsioon, vajaduse korral;
- uuritava aine kontsentratsioonid;
- lisatud kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioon ja kogus (ja/või ruumala);
- inkubatsiooni temperatuur ja kestus;
- uuritava ainega töötlemise kestus;
- ajavahemik töötlemisest kuni rakkude kogumiseni;
- rakkude tihedus külvamisel, vajaduse korral;
- metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle heakskiitmise kriteeriumid;
- positiivse kontrolli kemikaalid ja negatiivsed kontrollid;
- mikroskoobipreparaatide valmistamise meetodid ja kasutatud värvimismeetodid;
- mikrotuuma kindlakstegemise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv;
- tsütotoksilisuse mõõtmise meetodid;

- igasugune täiendav teave tsütotoksilisuse kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uuringutulemus klassifitseeritakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;
- kasutatud statistilise analüüsi meetod(id);
- vajaduse korral meetodid, millega uuriti, kas mikrotoom sisaldab terveid kromosoome või nende fragmente, näiteks kinetokoori antikeha.

Tulemused:

- tsütotoksilisuse määramise meetod, mida kasutati tsütokineesi bloki meetodi kasutamise puhul, näiteks CBPI või RI; RICC, RPD või PI, kui tsütokineesi bloki meetodeid ei kasutatud; vajaduse korral muud tähelepanekud, näiteks pinna katmine, apoptoosi, nekroos, metafaaside loendamine, kahetuumsete rakkude esinemissagedus;
- sadenemise tunnused;
- teave kasvukeskkonna pH ja osmolaalsuse kohta, kui see on määratud;
- analüüsi jaoks kõlblike rakkude määratlus;
- ühe-, kahe- ja paljutuumsete rakkude jaotus, kui kasutatakse tsütokineesi bloki meetodit;
- mikrotoomadega rakkude arv eraldi igas töödeldud ja kontrollkultuuris; vajaduse korral peab olema näidatud, kas on määratud kahetuumsetest või ühetuumsetest rakkudest;
- kontsentratsiooni ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;
- paralleelse negatiivse (lahusti/kandaine) ja positiivse kontrolli kemikaalide andmed (kontsentratsioonid ja lahustid);
- varasemate negatiivsete (lahusti/kandaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemik, keskväärtused ja standardhälbed ning 95 % usaldusvahemik;
- statistiline analüüs; p-väärtused vajaduse korral.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.
- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene

metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

- (25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.
- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.
- (29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.
- (31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.
- (32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006. Vt: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Vt: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.
- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328. .
- (38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- (44) Bonassi, S., **Fenech, M.**, Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* **37**, 31-45.
- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (46) 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.
- (47) 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. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (49) 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.
- (50) UNEP (2001), püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon, ÜRO keskkonnaprogramm (UNEP). Vt: [<http://www.pops.int/>]
- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooley, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) 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. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
- (59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.
- (66) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 850/2004, 29. aprill 2004, püsivate orgaaniliste saasteainete kohta ning millega muudetakse direktiivi 79/117/EMÜ, ELT L 229, 30.4.2004, lk 5.

1. liide

MÕISTED

Aneugeen: iga aine või protsess, mis raku mitootilise või meiootilise jagunemise tsükli komponentidega interakteerudes tekitab rakkudes või organismides aneuploidsust.

Aneuploidsus: iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidia).

Apoptoos: programmeeritud rakusurm, mida iseloomustab rida astmeid, mis viivad raku lagunemiseni membraaniga seotud osakesteks, mis kõrvaldatakse fagotsütoosi või väljutamisega.

Rakkude paljunemine: rakkude arvu suurenemine mitootilise rakujagunemise tagajärjel.

Tsentromeer: kromosoomi DNA-piirkond, kus mõlemad kromatiide hoitakse koos ja mille külge teineteise kõrvale kinnituvad mõlemad kinetokoorid.

Klastogeen: iga aine või protsess, mis tekitab rakkude või organismide populatsioonides struktuurseid kromosoomihälbeid.

Tsütokinees: mitoosile vahetult järgnev rakujagunemise protsess, mille tulemusel tekivad kaks tütarrakku, millest kummaski on üksainus tuum.

Tsütokineesi blokiga paljunemise indeks (*cytokinesis-block proliferation index, CBPI*): teise rakujagunemise rakkude osakaal töödeldud rakupopulatsioonis, võrreldes töötlemata kontrolliga (vt võrrand, 2. liide).

Tsütostaas: rakkude kasvu inhibeerimine (vt võrrand, 2. liide).

Tsütotoksilisus: kahjulik mõju raku struktuurile või funktsioonidele, mis lõpuks põhjustab raku surma.

Genotoksiline: üldine termin, mis hõlmab DNA või kromosoomide igasugust kahjustust, sealhulgas katkemisi, aduktidega seotud ümberkorraldumist, mutatsioone, kromosoomihälbeid ja aneuploidsust. Mitte kõik genotoksilised efektid ei anna tulemuseks mutatsioone või püsivat kromosoomikahjustust.

Interfaasirakud: rakud, mis ei ole mitoosifaasis.

Kinetokoor: valke sisaldav struktuur, mis koondub kromosoomi tsentromeeri juures, millele raku jagunemise ajal kinnituvad kääviniidid, võimaldades tütarchromosoomidel korrastatult liikuda tütarakkude poolustele.

Mikrotuum: väike tuum, mis on raku põhituumast eraldi ja lisandunud põhituumale, see on moodustunud mitoosi või meioosi telofaasi ajal mahajäänud kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest.

Mitoos: rakutuuma jagunemine, mida tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, ana faasiks ja telo faasiks.

Mitootiline indeks: metafaasis olevate rakkude arv jagatakse rakupopulatsioonis vaadeldud rakkude koguarvuga; näitab rakkude paljunemise astet kõnealus populatsioonis.

Mutageenne: tekitab päriliku muutuse geenide DNA alusepaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomihälve).

Mitteeraldumine: paardunud kromatiidid ei eraldu teineteisest ega liigu kujunevatesse tütarakkudesse nii, nagu see peaks normaalselt toimuma; tulemuseks on ebanormaalse kromosoomide arvuga tütararakud.

Polüploidus: rakkude või organismi numbriline kromosoomihälve, mis hõlmab terveid kromosoomikomplekte; vastandub aneuploidsusele, mille puhul kromosoomihälve hõlmab üht või mitut kromosoomi.

Paljunemisindeks (*Proliferation Index, PI*): tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui tsütoB-d ei kasutata (vt võrrand, 2. liide).

Rakkude arvukuse suhteline suurenemine (*Relative Increase in Cell Count, RICC*): tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui tsütoB-d ei kasutata (vt võrrand, 2. liide).

Rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*Relative Population Doubling, RPD*): tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui tsütoB-d ei kasutata (vt võrrand, 2. liide).

Replikatsiooniindeks (*Replication Index, RI*): lõpuni kulgenud raku jagunemistsükli osakaal töödeldud rakukultuuris, võrreldes töötlemata kontrolliga, rakkude töötlemise ja toibumise ajal (vt võrrand, 2. liide).

Uuritav kemikaal (ka „uuritav aine“): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

2. liide

TSÜTOTOKSILISUSE HINDAMISE VÕRRANDID

1. Kui kasutatakse tsütoB-d, peaks tsütotoksilisus põhinema **tsütokineesi blokiga paljunemise indeksil (cytokinesis-block proliferation index, CBPI)** või **replikatsiooniindeksil (RI)** (16) (58). CBPI näitab rakutsüklite keskmist arvu raku kohta tsütoB-ga kokkupuutumise aja jooksul ja seda võib kasutada raku paljunemise arvutamiseks. Replikatsiooniindeks RI näitab tuumade suhtelist arvu töödeldud kultuurides, võrrelduna kontrollkultuuridega ja seda võib kasutada tsütostaasi protsendi arvutamiseks:

$$\text{tsütostaasi \%} = 100 - 100 \{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

ning

T = uuritava kemikaaliga töödeldud kultuur

C = kandeaine kontrolli kultuur

siis:

$$\text{CBPI} = \frac{((1\text{-tuums. rakkude arv}) + (2 \times 2\text{-tuums. rakkude arv}) + (3 \times \text{paljutuums. rakkude arv}))}{(\text{rakkude koguarv})}$$

Seega vastab CBPI väärtus 1 (kõik rakud on ühetuumsed) 100 % tsütostaasile.

$$\text{Tsütostaas} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((2\text{-tuums. rakkude arv}) + (2 \times 1\text{-tuums. rakkude arv})) \div (\text{rakkude koguarv})_T}{((2\text{-tuums. rakkude arv}) + (2 \times 1\text{-tuums. rakkude arv})) \div (\text{rakkude koguarv})_C} \times 100$$

T = töödeldud kultuurid

C = kontrollkultuurid

2. RI = 53 % tähendab seega, et kui kontrollkultuurides on teatav arv rakke jagunenud ja moodustanud kahetuumseid ja paljutuumseid rakke, siis töödeldud kultuuris on jagunenud kõigest 53 % sellest arvust, see tähendab 47 % oli tsütostaasi.

3. Kui tsütoB-d ei kasutata, soovitatakse tsütotoksilisust hinnata **rakkude arvukuse suhtelise suurenemise (Relative Increase in Cell Counts, RICC)** või **rakupopulatsiooni suhtelise kahekordistumise (Relative Population Doubling, RPD)** järgi (58), kuna mõlema näitaja puhul võetakse arvesse jagunenud rakkude osakaalu rakupopulatsioonis.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{rakkude arvu suurenemine töödeldud kultuurides (lõplik - alguses)})}{(\text{rakkude arvu suurenemine kontrollkultuurides (lõplik - alguses)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv töödeldud kultuurides})}{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv kontrollkultuurides})} \times 100$$

kus:

populatsiooni kahekordistumine = $[\log(\text{rakkude arv pärast töötlust} \div \text{esialgne rakkude arv})] \div \log 2$

4. Seega tähendab 53 % RICC või RPD, et 47 % oli tsütotoksilisust/tsütostaasi.

5. Tsütotoksilisust võib hinnata 1 rakust koosnevate kloonide (c11), 2 rakust koosnevate kloonide (c12), 3–4 rakust koosnevate kloonide (c14) ja 5–8 rakust koosnevate kloonide (c18) loendamise ja paljunemisindeksi (PI) kasutamisega:

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{c11}) + (2 \times \text{c12}) + (3 \times \text{c14}) + (4 \times \text{c18}))}{(\text{c11} + \text{c12} + \text{c14} + \text{c18})}$$

6. PI-d on kasutatud tsütotoksilisuse väärtusliku ja usaldusväärse näitajana ka rakuliinide puhul, mida on kultiveeritud *in situ* tsütoB puudumisel (25)(26)(27)(28).

3. liide

TULEMUSLIKKUSE HINDAMISEKS SOOVITATAVAD VÕRDLUSKEMIKAALID¹

Kategooria	Kemikaal	CASi nr	EÜ nr
1. Ilma metaboolse aktivatsioonita toimivad klastogeenid			
	tsütosiinarabinosiid	147-94-4	205-705-9
	mitomütsiin C	50-07-7	200-008-6
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad klastogeenid			
	benso(a)püreen	50-32-8	200-028-5
	tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeenid			
	kolhitsiin	64-86-8	200-598-5
	vinblastiin	143-67-9	205-606-0
4. Negatiivsed ained			
	di-(2-etüülheksüül)ftalaat	117-81-7	204-211-0
	nalidiksape	389-08-2	206-864-7
	püreen	129-00-0	204-927-3
	naatriumkloriid	7647-14-5	231-598-3

¹. Võrdluskemikaalid on kasutamiseks soovitatavad kemikaalid. Võrdluskemikaale võib asendada või lisada loetelusse uusi kemikaale, kui nende toime on teada ja need tekitavad mikrotuumi sama toimemehhanismi kaudu ning on näidatud, et need on asjakohased MN vit-eeskirja järgi uuritavate kemikaalide puhul. Otstarbest olenevalt võiks põhjendus hõlmata ka paljude erinevate ainetega tehtud valideerimisuuringut või valideerimisuuringut, mis on suunatud kitsamale aineteringile, mis on seotud uuritava aine kemikaaliklassiga või uuritava kahjustusmehhanismiga.

B.50. Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlme de katse: DA

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlme de katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidiini või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA:DA (mille töötas välja Daicel Chemical Industries, Ltd.) on LLNA variant, mis on vaba radioaktiivsusest ja milles lümfotsüütide paljunemise näitajana kasutatakse adenosüintrifosfaadi (ATP) sisaldus määramiseks bioluminestsentsi abil. Katsemeetod LLNA:DA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline eksperdihinnangu komisjon soovib seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerumist põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10) (11) (12) (13). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (14). LLNA-d (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhis 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamiset versiooni, need on LLNA:DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhis 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhis 442 B), tuleb eelistada merisea katsetele peatükis B.6, OECD katsejuhis 406 (14), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.

2. Samaselt LLNA-le, uuritakse LLNA:DA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhis 406) (14) selleks otstarbeks.

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

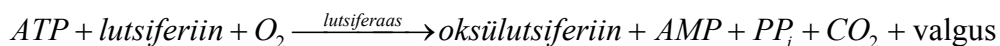
4. LLNA:DA on muudetud LLNA-meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (14) asemel LLNA:DA-d, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10) (11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalise-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja

struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: DA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: DA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

5. LLNA: DA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhised 406) (14). Lisaks võimaldab LLNA: DA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi), kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: DA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Hoolimata LLNA: DA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (14) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi kohaste katsete 406 kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (16), olla vaja kasutada meriseakatseid (st B.6 või OECD katsejuhendit 406 (14)). LLNA puhul kindlakstehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: DA puhul (10). Lisaks ei tarvitse LLNA: DA kasutamine olla sobiv selliste ainete uurimiseks, mis mõjutavad ATP taset (näiteks ATP inhibiitorina toimivad ained) või segavad rakusisese ATP täpset määramist (nt ATPd lagundavate ensüümide juuresolek, rakuvälise ATP olemasolu lümfisõlmes). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: DA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: DAg saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,8–2,5 (vt punktid 31–32). See tugineb 44 ainekohaselt koosnevale valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi $\geq 1,8$ (vt punkt 6), millest LLNA: DA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kolme aine puhul 12st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainekohasest, mille SI oli 1,8–2,5 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

6. LLNA: DA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis drenivad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,8 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseerija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetod põhineb sellel, et bioluminestsentsi järgi mõõdetakse ATP sisaldust ja (kuna see korreleerub elusrakkude arvuga) (17) hinnatakse selle järgi paljunevate rakkude arvu suurenemist kõrvaldest drenivates lümfisõlmedes (18) (19). Bioluminestsentsi meetodis kasutatakse ensüümi lutsiferaasi, mis katalüüsib valguse tekkimist ATPst ja lutsiferiini vastavalt järgmisele reaktsioonile:



Eralduva valguse intensiivsus on lineaarselt seotud ATP kontsentratsiooniga ja seda mõõdetakse luminomeetriga. Lutsiferiini-lutsiferaasi katse on tundlik meetod ATP kvantitatiivseks mõõtmiseks ja seda kasutatakse paljudes meetodites (20).

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: DA valideerimisuringud tehti ainult CBA/J-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (12) (13). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: DA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (21), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusväärse kontrolli

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned

reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA:DA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katsed, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA:DA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,8 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 10 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service [CASi] number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4:1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st mitte enam kui kuue kuu järel) tehakse LLNA:DAd ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA:DA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA:DA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija) ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatсени uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (22).

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4:1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (23). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esilekutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

- struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;
- teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;
- varasemad toetavad LLNA: DA andmed;
- toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse sarnaselt katserühma loomadega, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.

18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes (2) ja (24) antud soovitusel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (24) (25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).

19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4:1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutuda vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ja ei voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (22). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid

loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamisega), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: DA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: DA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela katseaine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: DA põhikatses, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (8. päev). Iga hiire kumbagi kõrvaletta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvaletta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust), 7. päeval (24 tundi enne katse lõpetamist) ja 8. päeval. Lisaks võib 8. päeval mõõta kõrvaletta paksuse, milleks pärast looma humansest surmamist lüüakse kõrvaletast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvaletta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26) (27). LLNA: DA põhikatses jaoks valitud kõrgeim annus on järgmine madalam annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäära nahaärritust.

Tabel 1. Punetuse hinne

Nähtud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvaletta paksuse 25 % suurenemisele (26) (27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvaletta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvaletta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30) (31) (32) (33) (34).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: DA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordineerimise kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuhmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 8. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humanitaarselt surmata (36).

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine:

- 1. päev

Määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse naatriumlaurylsulfaadi (SLS) 1 % vesilahust, kasutades SLSi lahusesse kastetud pintslit ja kattes kogu kõrvalesta väliskülje nelja-viie pintslitõmbega. Üks tund pärast SLSiga töötlemist kantakse kummagi kõrvalesta välisküljele 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või hiljutine perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).

- 2., 3. ja 7. päev:

Korratakse 1. päeval tehtud eeltöötlust SLSi 1 % vesilahusega ja uuritava aine pealekandmist.

- 4., 5. ja 6. päev:

Loomi ei töödelda.

- 8. päev

Määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Ligikaudu 24–30 tundi pärast 7. päeval toimunud uuritava aine pealekandmist algust surmatakse loomad humanitaarselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta drenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlmi fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (22). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga väljalöödud tüki massi mõõtmisega).

Rakususpensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga hiire mõlemalt küljelt väljalõigatud lümfisõlmerakkude üherakuline suspensioon, milleks lümfisõlmed pannakse kahe objektiklaasi vahele ja purustatakse klaaside kerge surumisega üksteise vastu. Pärast kontrollimist, et kude on jaotunud õhukese kihina, eraldatakse objektiklaasid teineteisest. Mõlemal objektiklaasil olev kude suspendeeritakse fosfaatpuhvriga soolalahuses, milleks kumbagi objektiklaasi hoitakse kaldu Petri tassi kohal ja loputatakse puhverlahusega, kraapides samal ajal rakukaabitsaga kudet klaasi küljest lahti. Negatiivse kontrolli loomade lümfisõlmed on väiksed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Kokku tuleks mõlema objektiklaasi loputamiseks kasutada 1 ml fosfaatpuhvriga soolalahust. Lümfisõlmerakkude suspensioon Petri tassil tuleb rakukaabitsaga kergelt homogeniseerida. Seejärel võetakse mikropipetiga 20 µl alikvoot lümfisõlmerakkude suspensioonist, püüdes mitte võtta silmaga nähtavat membraani ja segatakse siis 1,98 ml fosfaatpuhvriga soolalahusega, nii et kokku saadakse 2 ml proovi. Samal viisil valmistatakse siis teine 2 ml proov, nii et iga looma kohta saadakse kaks proovi.

Rakkude vohamise määramine (lümfotsüütide ATP-sisalduse mõõtmine)

27. Lümfisõlmede ATP-sisalduse suurenemine määratakse lutsiferiin-lutsiferaasi meetodiga, kasutades ATP mõõtmise komplekti, millega bioluminestsents määratakse suhtelistes luminestsentsi ühikutes (RLU). Katse läbiviimise aeg looma tapmisest kuni ATP-sisalduse mõõtmiseni peaks iga üksiku looma puhul olema ühesugune, umbes 30 minuti piires, kuna ATP-sisaldus pärast looma tapmist möödunud ajaga järk-järgult väheneb (12). Seega tuleks kogu tegevus kõrvalesta lümfisõlmede väljalõikamisest kuni ATP mõõtmiseni lõpetada 20 minuti jooksul vastavalt ettemääratud ajakavale, mis on kõikide loomade puhul ühesugune. ATP luminestsents tuleks mõõta kummaski 2 ml proovis, nii et kokku saadakse iga looma kohta kaks ATP mõõtmist. Seejärel määratakse kindlaks keskmine ATP luminestsents ja kasutatakse seda edasistes arvutustes (vt punkt 30).

TÄHELEPANEKUD

Kliinilised tähelepanekud

28. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitused (36).

Kehamass

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine RLU hiire kohta lahusti-/kandeaime-kontrollrühma keskmise RLU-ga hiire kohta. Keskmine SI kandeaime-kontrollrühmade puhul on seega 1.

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,8 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,8–2,5) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse

tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (2) (3) (37).

32. Kui SI on vahemikus 1,8–2,5, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse lisateavet nagu annuse-immuunvastuse sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või tugeva nahaärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on üksikasjalikult arutatud mujal (4).

33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete lahuse/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma RLU väärtused, rühma keskmine suhte RLU/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katsearuanne

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

Uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalised-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad.

Lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus.

Katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne.

Katsetingimused:

- ATP määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed ATP määramise komplekti kohta;
- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi.

Usaldusväarsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväarsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;
- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist.

Tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- iga katselooma surmamise aeg ja tema proovidest ATP mõõtmise aeg;
- tabelina iga üksiku hiire RLU väärtused ja iga katserühma SI väärtused;
- iga katserühma RLU/hiire keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;
- arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;
- annuse-immuunvastuse sõltuvus;
- vajaduse korral statistilised analüüsid.

Tulemuste arutelu:

- lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Vt:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt:
[<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products.

Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf]

- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm]

- (36) 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 Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.
- (38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (38).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitavas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

Valenegatiiv: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

Valepositiiv: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta.

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (38).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (38).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärssuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (38).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontakt sensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

B.51. Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: BrdU-ELISA

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42). LLNA valideerimise üksikasjad ja sellega seotud töö ülevaade on avaldatud (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidiini või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA: BrdU-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs) on LLNA katse-eeskirja modifikatsioon, milles ei kasutata radioaktiivsust ja lümfotsüütide vohamise mõõtmiseks ELISA-põhise katsesüsteemiga kasutatakse radioaktiivselt märgistamata 5-bromo-2-desoksüüridiini (BrdU, Chemical Abstracts Service'i [CASi] nr 59-14-3). Katsemeetod LLNA: BrdU-ELISA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline sõltumatu teaduslik eksperdihinnangu komisjon soovib seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerumist põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10) (11) (12). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13 LLNAd (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhend 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamiset versiooni, need on LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhend 442 B) ja LLNA: DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhend 442 A), tuleb eelistada merisea katsetele peatükis B.6, OECD katsejuhend 406 (13), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.

2. Sarnaselt LLNAle, uuritakse LLNA: BrdU-ELISA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhend 406) selleks otstarbeks (13).

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA: BrdU-ELISA on muudetud LLNA-meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) asemel LLNA: BrdU-ELISA, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10) (11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab uuritava aine nimetust ja

keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi, struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: BrdU-ELISA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: BrdU-ELISA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

5. LLNA: BrdU-ELISA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhiskirja 406) (13). Lisaks võimaldab LLNA: BrdU-ELISA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks, kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: BrdU-ELISA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Samuti ei eelda LLNA: BrdU-ELISA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (käesoleva lisa peatükk B.6, 13). Seega vähendab LLNA: BrdU-ELISA loomade kannatusi. Hoolimata LLNA: BrdU-ELISA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad nõuda B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsete (13) kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (15), olla vaja kasutada meriseakatseid (st B.6 või OECD katsejuhend 406 (13)). LLNA puhul kindlakstehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: BrdU-ELISA puhul (10). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: BrdU-ELISA olema kohaldatav igasuguste kemikaalide uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: BrdU-ELISAGA saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,6–1,9 (vt punktid 31–32). See tugineb 43 ainekohasele valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi $\geq 1,6$ (vt punkt 6), millest LLNA: BrdU-ELISA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kahe aine puhul 11st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainekohasest, mille SI oli 1,6–1,9 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

6. LLNA: BrdU-ELISA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,6 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseerija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad BrdU sisalduse mõõtmisel; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu suurenemist kõrvaldest dreenevates lümfisõlmedes. BrdU on tümidüüni analoog ja vohavad rakud kasutavad seda DNA sünteesil sarnaselt tümidüüniga. BrdU sisenemist DNAsse mõõdetakse ELISA abil, milles kasutatakse BrdU-spetsiifilist peroksidaasiga märgistatud

antikeha. Substraadi lisamisel reageerib peroksidaas substraadiga ning tekib värviline reaktsioonisaadus, mille kogus mõõdetakse neeldumise järgi teataval lainepikkusel, kasutades mikrotiiterplaadi lugejat.

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: BrdU-ELISA valideerimisuuringud tehti ainult CBA/JN-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (10) (12). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: BrdU-ELISA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides 16), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50-60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusväärse kontrolli

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned regulatiivasutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA: BrdU-ELISA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha

täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA: BrdU-ELISA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,6 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 14 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (CASi number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4:1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st mitte enam kui kuue kuu järel) tehakse LLNA: BrdU-ELISA ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA: BrdU-ELISA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA: BrdU-ELISA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija) ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatсени uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (17).

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4:1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (18). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esilekutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

- struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;
- teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;
- varasemad toetavad LLNA: BrdU-ELISA andmed;
- toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse sarnaselt katserühma loomadega, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.

18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 2 ja 19 antud soovitusel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (19)(20 ja käesoleva lisa peatükk B.4) Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).

19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4:1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüüleetüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutada vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ja ei voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (17). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamise), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18) tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: BrdU-ELISA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: BrdU-ELISA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % kontsentratsioon vedela katseaine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: BrdU-ELISA põhikatses, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrva uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (20, ja käesoleva lisa peatükk B.4). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrva paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (21) (22). LLNA: BrdU-ELISA põhikatses jaoks valitud kõrgeim annus on järgmine madalam annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäära nahaärritust.

Tabel 1. Punetuse hinne

Nähtud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta 25 % suurenemisele (21) (22) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (25) (26) (27) (28) (29).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: BrdU-ELISA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (30) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordinatsiooni kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine,

räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humaanselt surmata (31)

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine:

- 1. päev

Määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kumbagi kõrva välisküljele kantakse 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).

- 2. ja 3. päev

Korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.

- 4. päev:

Loomi ei töödelda.

- 5. päev:

Hiire kõhukelmesse süstitakse 0,5 ml (5 mg hiire kohta) BrdU lahust (10 mg/ml).

- 6. päev

Määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Umbes 24 tundi pärast BrdU süsti surmatakse loomad humaanselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlmi fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (17). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksuse mõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga väljalöödud tüki massi mõõtmisega).

Rakususpensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga looma mõlemalt poolelt väljalõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakususpensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 µm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse üksikrakususpensiooni valmistamiseks muud sobivat võtet (näiteks purustatakse lümfisõlmed ühekordselt kasutatava plastikuhmrinuiaga ja lastakse seejärel läbi nailonvõrgu avasuurusega nr 70). Lümfisõlmerakkude suspensiooni valmistamine on selle katse puhul otsustava tähtsusega ja metoodika iga kasutaja peaks eelnevalt omandama selle oskuse. Negatiivse

kontrolli loomade lümfisõlmed on väiksed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Igal juhul tuleb lümfisõlmerakkude suspensiooni lõppruumala viia kindlaksmääratud optimeeritud ruumalani (ligikaudu 15 ml). Optimeeritud ruumala määratakse nii, et negatiivse kontrolli rühmas saavutataks keskmine optiline neeldumine (tihedus) vahemikus 0,1–0,2.

Rakkude vohamise määramine (BrdU sisalduse mõõtmine lümfotsüütide DNAs)

27. BrdU määratakse ELISA meetodiga, kasutades müügil olevat komplekti (näiteks Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa, katalooginumber 11 647 229 001). Lühidalt, 100 µl lümfisõlmerakkude suspensiooni kantakse kolme lamedapõhjalise mikrotiiterplaadi süvendisse. Lümfisõlmerakud fikseeritakse ja denatureeritakse ning lisatakse siis igasse süvendisse BrdU-vastaseid antikehi. Seejärel eemaldatakse BrdU-vastased antikehad pesemisega ja lisatakse substraadi lahus ning lastakse tekkida kromogeenil. Määratakse optiline neeldumine 370 nm juures võrdluslainepikkuse 492 nm suhtes. Kõigil juhtudel on katsetingimusi vaja optimeerida (vt punkt 26).

TÄHELEPANEKUD

Kliinilised tähelepanekud

28. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmataks valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (31).

Kehamass

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine BrdU-märgistusindeks hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise BrdU-märgistusindeksiga hiire kohta. Keskmine SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1.

BrdU-märgistusindeks on määratletud järgmiselt:

$$\text{BrdU-märgistusindeks} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{tühikatse}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{tühikatse}_{\text{ref}}}),$$

kus: em = emissioonlainepikkus ja ref = võrdluslainepikkus.

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,6 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,6–1,9) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (3) (6) (32).

32. Kui SI on vahemikus 1,6–1,9, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse lisateavet nagu annuse-immuunvastuse

sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või ülemäärase ärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites (4).

33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete lahuse/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma BrdU-märgistusindeksi väärtused, rühma keskmine suhte BrdU-märgistusindeks/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katsearuanne

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

Uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalis-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad.

Lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus.

Katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne.

Katsetingimused:

- ELISA määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed komplekti kohta (antikeha tundlikkus ja spetsiifilisus ning määramispiir);
- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi.

Usaldusväärsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;
- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist.

Tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist; samuti iga katserühma keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- tabelina iga üksiku hiire BrdU-märgistusindeksi väärtused ja iga katserühma SI väärtused;
- iga katserühma BrdU-märgistusindeksi/hiire keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;
- arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;
- annuse-immuunvastuse sõltuvus;
- vajaduse korral statistilised analüüsid.

Tulemuste arutelu:

- lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].

- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gerner, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (31) 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 Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (33).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitatavas mõju tugevuse vahemikus.

Valenegatiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega (33).

Valepositiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimetaga (33).

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides sama ainet, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (33).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (33).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (33).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paiksest kokkupuutest keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontakt sensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.”