



**RADA
UNII EUROPEJSKIEJ**

**Bruksela, 20 stycznia 2012 r. (20.01)
(OR. en)**

**5596/12
ADD 1**

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

PISMO PRZEWODNIE

Od:	Komisja Europejska
Data otrzymania:	19 stycznia 2012 r.
Do:	Sekretariat Generalny Rady Unii Europejskiej
Dotyczy:	Załącznik do projektu rozporządzenia Komisji (UE) nr .../... z XXX zmieniającego, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1907/2006 w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

Delegacje otrzymują w załączeniu dokument Komisji D018298/01 Załącznik.

Załącznik: D018298/01 Załącznik

ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się następujące zmiany:

1. rozdział B.42 otrzymuje brzmienie:

„B.42 Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych

WSTĘP

1. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów i opracowane według nich metody badań UE są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi, oraz troską o dobrostan zwierząt. Pierwotna metoda badania (TM) przy określaniu działania uczulającego na skórę u myszy - badanie lokalnych węzłów chłonnych (LLNA); wytyczna OECD nr 429 dotycząca badań; rozdział B.42 niniejszego załącznika) została przyjęta już wcześniej (1). Szczegóły walidacji LLNA i przegląd powiązanej bibliografii opublikowano w (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Zaktualizowana metoda LLNA opiera się na ocenie doświadczeń i danych naukowych (12). Jest to druga TM opracowywana w celu oceny potencjału działania uczulającego na skórę przez chemikalia (substancje i mieszaniny) u zwierząt. Druga TM (tj. wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań; rozdział B.6 niniejszego załącznika) wykorzystuje badania na świnkach morskich, w szczególności test maksymalizacji na świnkach morskich oraz test Buehlera (13). LLNA jest korzystniejsza od metody B.6 i wytycznej OECD nr 406 (13) dotyczącej badań w odniesieniu do dobrostanu zwierząt. Ta zaktualizowana LLNA TM obejmuje zestaw norm efektywności (PS) (dodatek 1), które mogą być wykorzystywane do oceny statusu zatwierdzenia nowych lub zmodyfikowanych metod badania, które są funkcjonalnie i pod względem mechanistycznym podobne do LLNA, zgodnie z zasadami określonymi w wytycznych OECD nr 34 (14).

2. LLNA bada fazę indukcyjną uczulenia skóry i dostarcza danych ilościowych odpowiednich dla dokonania oceny dawka-reakcja. Trzeba zauważyć, że łagodne/umiarkowane czynniki uczulające, które zalecane są jako odpowiednie pozytywne substancje kontrolne dla metod testów na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13) są również właściwe do stosowania w LLNA (6) (8) (15). Ograniczone podejście LLNA (rLLNA), w którym możnaby wykorzystywać do 40% mniej zwierząt, jest również opisane jako opcja w tej TM (16) (17) (18). Metoda rLLNA może być wykorzystywana, jeśli istnieje potrzeba regulacyjna, aby potwierdzić negatywne oczekiwania co do potencjału działania uczulającego na skórę, pod warunkiem przestrzegania wszystkich innych specyfikacji protokołów LLNA, jak to opisano w niniejszej TM. Przewidywania negatywnego wyniku powinny opierać się na wszystkich dostępnych informacjach, o których mowa w pkt 4. Przed zastosowaniem podejścia rLLNA, należy przedstawić jasne uzasadnienie i naukowe przesłanki uzasadniające jego stosowanie. Jeżeli, wbrew oczekiwaniom, uzyskuje się w rLLNA pozytywny lub niejednoznaczny wynik, konieczne mogą być dodatkowe badania w celu interpretacji lub wyjaśnienia nieprawidłowości. Metody rLLNA nie należy wykorzystywać do identyfikacji zagrożeń ze strony badanych substancji uczulających skórę w przypadku, gdy potrzebne są informacje dotyczące zależności dawka-reakcja w celach takich jak dokonanie podziału na podkategorie na potrzeby rozporządzenia

(WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin oraz Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ.

DEFINICJE

3. Definicje są zamieszczone w dodatku 2.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. LLNA jest alternatywną metodą identyfikowania potencjalnych chemikaliów uczulających skórę. Nie oznacza to, że należy koniecznie we wszystkich przypadkach stosować LLNA zamiast testu na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (12), a tylko, że badanie to ma tę samą wartość merytoryczną i może zostać zastosowane jako badanie alternatywne, którego pozytywne lub negatywne wyniki nie wymagają już dalszego potwierdzenia. Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę chemiczną badanej substancji; jej właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* badanej substancji i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie pokrewnych substancji chemicznych. Informacje te należy uwzględnić w celu ustalenia, czy LLNA jest odpowiednia dla substancji (ze względu na niezgodność ograniczonych rodzajów chemikaliów z LLNA - patrz pkt 5) oraz do pomocy przy doborze dawek.

5. Będąc metodą *in vivo* LLNA nie eliminuje wykorzystania zwierząt w określaniu alergicznego kontaktowego działania uczulającego. Daje jednak potencjalne możliwości obniżenia liczby zwierząt potrzebnych do tego celu. Co więcej, LLNA oferuje znacznie bardziej udoskonalony sposób wykorzystywania zwierząt (mniej bólu i cierpienia) do badania alergicznego kontaktowego działania uczulającego. LLNA opiera się na obserwacji zjawisk immunologicznych zachodzących podczas fazy indukcyjnej uczulania. W odróżnieniu od testów na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13), test LLNA nie wymaga wywoływania reakcji nadwrażliwości skóry poprzez prowokację. Ponadto, LLNA nie wymaga zastosowania adiuwantu, jak wymaga tego test maksymalizacji na świnkach morskich (13). Tym samym LLNA zmniejsza ból i cierpienie zwierząt. Niezależnie od przewagi LLNA nad metodami B.6 i wytyczną OECD nr 406 dotyczącą badań, należy przyznać, że istnieją pewne ograniczenia, które mogą spowodować konieczność wykorzystania B.6 lub wytycznej OECD nr 406 (13) dotyczącej badań (np. fałszywe wyniki negatywne dla LLNA w przypadku niektórych metali, fałszywe wyniki pozytywne w przypadku niektórych środków drażniących skórę [takich jak niektóre chemikalia powierzchniowo czynne] lub rozpuszczalność badanej substancji) (19) (20). Ponadto klasy chemiczne lub substancje zawierające grupy funkcjonalne co do których wykazano, że działają jako potencjalne czynniki zakłócające (21), mogą wymagać użycia badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13). Co więcej na podstawie ograniczonej bazy danych walidacyjnych, która składała się głównie z form użytkowych pestycydów, otrzymanie pozytywnego wyniku dla tego rodzaju badanych substancji jest bardziej prawdopodobne w przypadku LLNA, niż w przypadku testów na świnkach morskich (22). Jednak podczas badania form użytkowych, można rozważyć wykorzystanie podobnych substancji o znanych wynikach jako substancji referencyjnych w celu wykazania, że LLNA działa prawidłowo (zob. pkt 16). Poza tymi przypadkami zidentyfikowanych ograniczeń LLNA powinna być stosowana do badania wszelkich

substancji, chyba że istnieją właściwości związane z tymi substancjami, które mogą zakłócać dokładność LLNA.

ZASADA BADANIA

6. Podstawową zasadą u podłoża LLNA jest fakt, że czynniki uczulające wywołują pierwotną proliferację limfocytów w węźle chłonny odprowadzającym limfę z miejsca przyłożenia badanej substancji. Ta proliferacja jest proporcjonalna do zastosowanej dawki oraz potencjału zastosowanego alergenów i jest prostym środkiem uzyskania ilościowego pomiaru uczulenia. Proliferacja jest mierzona przez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej otrzymującej nośnik (VC). Określa się stosunek średniej proliferacji w każdej grupie poddanej działaniu środka do średniej proliferacji w równoległej grupie VC, który jest nazywany wskaźnikiem stymulacji (SI) i powinien wynosić ≥ 3 zanim substancja badana zostanie zaklasyfikowana jako potencjalny czynnik uczulający skórę. Procedury opisane w niniejszym dokumencie są oparte na wykorzystaniu do pomiaru *in vivo* znakowania markerem promieniotwórczym zwiększonej liczby komórek rozmnażających się wegetatywnie w odprowadzających usznych węzłach chłonnych. Można jednak zastosować inne punkty końcowe do oceny liczby rozmnażających się komórek pod warunkiem, że wymogi PS są całkowicie spełnione (dodatek 1).

OPIS BADANIA

Dobór gatunków zwierząt

7. Mysz jest gatunkiem preferowanym do tego badania. Używa się młodych, dorosłych samic myszy szczepów CBA/Ca lub CBA/J, które nie rodziły i nie są ciężarne. Na początku doświadczenia samice powinny mieć 8-12 tygodni, a zróżnicowanie mas ciała poszczególnych zwierząt powinno być minimalne i nie przekraczać 20% średniej masy ciała. Można ewentualnie wykorzystać inne szczepy i samce, jeżeli otrzymano wystarczające dowody na to, że nie istnieją znaczące specyficzne różnice w reakcji na LLNA w zależności od szczepu i/lub płci.

Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie

8. Myszy powinny być trzymane w grupach (23), chyba że istnieją odpowiednie naukowe przesłanki dla trzymania myszy pojedynczo. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30% i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70% poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50-60%. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Przygotowanie zwierząt

9. Zwierzęta wybierane są losowo i znakowane w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację (ale nie przez jakiejkolwiek znaki na uszach) i trzymane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem dawkowania w celu umożliwienia zaaklimatyzowania do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem podawania bada się wszystkie zwierzęta w celu upewnienia się, że nie mają żadnych zauważalnych zmian skórnych.

Przygotowanie roztworów dozujących

10. Stałe substancje powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, przed zastosowaniem na uchu myszy. Chemikalia płynne można zastosować czyste lub rozcieńczone przed dawkowaniem. Chemikalia nierozpuszczalne, takie jak te najczęściej spotykane w wyrobach medycznych, należy poddać przesadnej ekstrakcji w odpowiednim rozpuszczalniku w celu wykrycia wszystkich możliwych do wyekstrahowania składników do badania przed zastosowaniem na uchu myszy. Substancje badane należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Sprawdzenie wiarygodności

11. Pozytywne substancje kontrolne (PC) wykorzystuje się do wykazania właściwego działania badania poprzez reakcję badanej substancji uczulającej z odpowiednią i powtarzalną czułością, dla której wielkość reakcji jest dobrze scharakteryzowana. Włączanie kolejnych PC jest zalecane, ponieważ potwierdza się w ten sposób kompetencje laboratorium do skutecznego przeprowadzenia każdego badania i umożliwia dokonanie oceny odtwarzalności i porównywalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej. Niektóre organy regulacyjne wymagają PC dla każdego badania i w związku z tym użytkownicy są zachęceni do przeprowadzenia konsultacji z właściwymi organami przed rozpoczęciem LLNA. Odpowiednio zaleca się rutynowe wykorzystywanie równoległej PC, aby uniknąć potrzeby dodatkowych badań na zwierzętach do spełnienia tych wymagań, które mogą powstać w związku ze stosowaniem okresowej PC (zob. pkt 12). PC powinna dać w teście LLNA odpowiedź pozytywną na poziom narażenia na działanie, przy którym oczekuje się wzrostu wskaźnika stymulacji (SI) > 3 więcej niż w grupie kontroli negatywnej (NC). Dawkę PC należy dobrać w taki sposób, by nie powodować nadmiernego podrażnienia skóry lub ogólnoustrojowej toksyczności, a indukcja była powtarzalna, ale nie nadmierna (tj. SI > 20 byłyby zbyt wysokie). Preferowana PC to 25% aldehydu cynamonowego heksylu (Chemical Abstracts Service [CAS] nr 101-86-0) w acetonie: oliwie z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v) i 5% merkaptobenzotiazolu (CAS nr 149-30-4) w N,N,-dimetyloformamidzie (zob. dodatek 1, tabela 1). Mogą zaistnieć okoliczności, w których można użyć innych PC spełniających powyższe kryteria, pod warunkiem, że istnieje po temu odpowiednie uzasadnienie.

12. Pomimo że zaleca się włączenie równoległej grupy PC, mogą zaistnieć sytuacje, w których okresowe badanie PC (tj. w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy) może okazać się wystarczające w przypadku laboratoriów, które regularnie przeprowadzają badanie LLNA (tj. przeprowadzają badanie LLNA co najmniej raz na miesiąc) i dysponują wcześniejszymi danymi z pozytywnych kontroli, świadczącymi o tym, że laboratorium jest w stanie uzyskiwać odtwarzalne i dokładne wyniki w pozytywnych kontrolach. Można wykazać odpowiedni poziom biegłości w wykonywaniu badania LLNA uzyskując stałe pozytywne wyniki PC w co najmniej 10 niezależnych badaniach przeprowadzonych w rozsądnym terminie (tj. w okresie krótszym niż rok).

13. Należy zawsze włączać równoległą grupę PC, jeśli zachodzi proceduralna zmiana w LLNA (np. zmiana przeszkolonego personelu, zmiany w metodzie badania materiałów i/lub odczynników, zmiany w metodzie badania urządzenia, zmiana źródła zwierząt testowych), a przedmiotowe zmiany powinny być udokumentowane w laboratoryjnych sprawozdaniach. Należy zwrócić uwagę na wpływ tych zmian na odpowiedniość ustalonych wcześniej danych przy określaniu konieczności zgromadzenia nowej bazy danych aby udokumentować spójność wyników PC.

14. Badacze powinni być świadomi, że decyzja o przeprowadzeniu badania PC na zasadzie okresowej zamiast równoległe wywiera wpływ na odpowiedność i akceptowalność negatywnych wyników badań uzyskanych bez równoległej PC w okresie pomiędzy każdym okresowym badaniem PC. Na przykład, jeżeli w okresowych PC uzyskany zostaje wynik fałszywie negatywny, negatywne wyniki substancji badanej uzyskane w okresie między ostatnim dopuszczalnym okresowym badaniem PC i niedopuszczalnym okresowym badaniem PC mogą być kwestionowane. Należy dokładnie rozważyć tego rodzaju skutki przy podejmowaniu decyzji czy należy włączyć równoległą PC czy tylko przeprowadzać PC na zasadzie okresowej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość wykorzystania mniejszej liczby zwierząt w ramach grupy równoległej PC, jeżeli jest to naukowo uzasadnione, oraz jeżeli laboratorium może wykazać, w oparciu o wcześniej zgromadzone dane, że można wykorzystać mniejszą liczbę myszy (12).

15. Chociaż substancja kontroli pozytywnej powinna być testowana w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje konsekwentną reakcję (np. aceton: oliwa z oliwek; w proporcji objętościowej 4:1, v/v), mogą jednak zaistnieć pewne sytuacje wynikające z przepisów, w których przetestowanie w niestandardowym nośniku (o formulacji odpowiedniej klinicznie/chemicznie) może być również konieczne (24). Jeżeli równoległa PC jest badana w innym nośniku niż substancja badana, wówczas należy włączyć oddzielną VC w odniesieniu do równoległej PC.

16. W przypadkach, gdy ocenia się substancje badane konkretnej klasy chemicznej lub dające pewien zakres reakcji, substancje wzorcowe mogą służyć także temu aby wykazać, czy metoda badawcza jest odpowiednia dla dokonania oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę tego rodzaju badanych substancji. Odpowiednie substancje wzorcowe powinny posiadać następujące właściwości:

- strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do klasy badanej substancji;
- znane właściwości fizyczne i chemiczne;
- dane potwierdzające z LLNA;
- dane potwierdzające z innych modeli zwierzęcych i/lub ludzkich.

PROCEDURA BADANIA

Liczba zwierząt i poziomy dawek

17. W każdej grupie dawkowania powinny być użyte nie mniej niż cztery zwierzęta, z minimalną liczbą trzech stężeń badanej substancji oraz negatywną grupą kontrolną otrzymującą jedynie nośnik badanej substancji i pozytywną grupą kontrolną (równoległą lub najnowszą, zgodnie z podejściem laboratorium, bierze się pod uwagę pkt 11-14). Należy rozważyć zbadanie wielu dawek PC, szczególnie gdy badanie PC jest prowadzone na zasadzie nieregularnej. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grup kontrolnych należy się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grup badanych.

18. Dobór dawek i wybór nośnika powinien być oparty na zaleceniach podanych w pozycjach (3) i (5) bibliografii. Kolejne dawki zazwyczaj wybiera się z odpowiedniego szeregu stężeń takich jak 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, itd. Do wyboru szeregu stężeń należy dołączyć odpowiednie naukowe uzasadnienie. O ile są dostępne, należy uwzględnić wszystkie istniejące informacje toksykologiczne (np. o ostrej toksyczności i o

podrażnieniu skóry) oraz o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach badanej substancji (i/lub substancji zbliżonych pod względem budowy) przy wyborze trzech kolejnych stężeń, tak aby najwyższe stężenie maksymalizowało narażenie nie doprowadzając jednak do ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry (3) (25). W przypadku braku takich informacji, może okazać się konieczne przeprowadzenie badania wstępnego (zob. pkt 21-24)

19. Nośnik nie powinien zakłócać wyniku badania lub wpływać na niego oraz powinien być wybrany na podstawie maksymalizowania rozpuszczalności w celu uzyskania najwyższego osiągalnego stężenia, dając jednocześnie możliwość uzyskania roztworu/zawiesiny nadającej się do podania substancji badanej. Zalecanymi nośnikami są aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v), N,N-dimetyloformamid, metyloetylo-keton, glikol propylenowy i sulfotlenek dimetylowy (19), ale mogą być użyte inne, jeśli przedstawi się wystarczające uzasadnienie naukowe. W niektórych sytuacjach może okazać się konieczne użycie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika odpowiedniego ze względów klinicznych, lub postaci handlowej, w której badana substancja wprowadzana jest na rynek. Szczególną uwagę należy zwrócić na zapewnienie, aby hydrofilne substancje badane zostały włączone do systemu nośnika, który nawilża skórę i nie spływa z niej natychmiast, przez włączenie odpowiednich środków zwiększających rozpuszczalność (np. 1% Pluronic® L92). A zatem należy unikać roztworów całkowicie wodnych.

20. Przetwarzanie węzłów chłonnych z poszczególnych myszy umożliwia ocenę zmienności pomiędzy zwierzętami oraz statystyczne porównanie różnicy między substancją badaną i pomiarami grupy VC (zob. pkt 35). Ponadto dokonanie oceny możliwości obniżenia liczby myszy w grupie PC jest wykonalne wówczas, gdy gromadzone są dane dotyczące poszczególnych zwierząt (12). Co więcej niektóre organy regulacyjne wymagają zbierania danych dotyczących poszczególnych zwierząt. Niemniej jednak połączenie danych dotyczących zwierząt może być uznane za możliwe do przyjęcia przez niektóre organy regulacyjne i w takich przypadkach użytkownicy mogą mieć możliwość gromadzenia indywidualnych lub połączonych danych dotyczących zwierząt.

Badanie wstępne

21. W przypadku braku informacji pozwalającej określić najwyższą dawkę, jaka ma zostać zbadana (zob. pkt 18), należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego poziomu dawki do badania w metodzie LLNA. Celem badania wstępnego jest opracowanie wytycznych dotyczących wyboru maksymalnej dawki, jaką należy stosować w głównym badaniu LLNA, w przypadku gdy nie dysponuje się informacjami na temat stężenia powodującego toksyczność ogólnoustrojową (zob. pkt 24) i/lub nadmierne miejscowe podrażnienie skóry (zob. pkt 23). Maksymalny poziom badanej dawki powinien wynosić 100% substancji badanej w przypadku cieczy lub maksymalne możliwe stężenie w przypadku ciał stałych lub zawiesin.

22. Badanie wstępne przeprowadza się w warunkach identycznych do tych, w jakich przeprowadza się główne badanie LLNA, z tym że nie przeprowadza się oceny proliferacji węzła chłonnego oraz można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt w grupie dawkowania. Zaleca się jedno lub dwa zwierzęta w grupie dawkowania. Wszystkie myszy będą

obserwowane codziennie pod kątem jakichkolwiek klinicznych oznak toksyczności ogólnoustrojowej lub miejscowego podrażnienia skóry w miejscu zastosowania. Masy ciała są rejestrowane przed badaniem i przed jego zakończeniem (dzień 6.). Obydwoje uszu każdej myszy bada się pod kątem wystąpienia rumienia i ocenia przy wykorzystaniu tabeli 1 (25). Pomiary grubości ucha są przeprowadzane przy wykorzystaniu grubościomierza (np. cyfrowych mikrometrów lub grubościomierzem Peacock Dial) w dniu 1. (przed podaniem substancji), w dniu 3. (około 48 godzin następujących po podaniu pierwszej dawki) oraz w dniu 6. Ponadto, w dniu 6. grubość ucha można określić za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy, co powinno być przeprowadzone po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Nadmierne miejscowe podrażnienie skóry jest sygnalizowane wystąpieniem rumienia o wyniku ≥ 3 i/lub zwiększeniem grubości ucha $\geq 25\%$ w dniu pomiaru (26) (27). Najwyższa dawka wybrana do głównego badania LLNA to następna niższa dawka w szeregu stężeń badania wstępnego (zob. pkt 18), która nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry.

Tabela 1 Wyniki dotyczące rumienia

Objawy	Wynik
Brak rumienia	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)	1
Wyraźny rumień	2
Rumień umiarkowany do mocnego	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację rumienia	4

23. Oprócz 25% zwiększenia grubości ucha (26) (27), do zidentyfikowania substancji drażniących w metodzie LLNA wykorzystywano też statystycznie istotne zwiększenie grubości ucha u myszy badanych w porównaniu do myszy kontrolnych (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). O ile jednak statystycznie znaczące zwiększenie może wystąpić przy grubości ucha mniejszej niż 25%, to nie udało się go powiązać z nadmiernym podrażnieniem (30) (32) (33) (34).

24. Następujące obserwacje kliniczne mogą wskazywać na toksyczność ogólnoustrojową (35) (36), jeśli są wykorzystywane jako część zintegrowanej oceny i w związku z tym mogą określać maksymalne dawki do stosowania w LLNA: zmiany w funkcjach układu nerwowego (np. piloerekcja, ataksja, drżenia, oraz konwulsje); zmiany w zachowaniu (na przykład agresja, zmiany w czyszczeniu, wyraźna zmiana w poziomie aktywności); zmiany w sposobie oddychania (np. zmiany w częstotliwości i intensywności oddychania, takie jak duszność, dyszenie oraz rzęzenie) a także zmiany w konsumpcji żywności i wody. Ponadto w ocenie należy wziąć pod uwagę oznaki stanów zwiększonej senności i/lub brak reakcji oraz wszelkie objawy kliniczne sygnalizujące coś więcej niż niewielki lub chwilowy ból i cierpienie, lub $>5\%$ spadek masy ciała od dnia 1. do dnia 6. czy śmiertelność. Zwierzęta konające oraz

zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy oznaki ostrego i przewlekłego strachu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny (37).

Harmonogram doświadczalny głównego badania

25. Harmonogram doświadczalny badania jest następujący:

- Dzień 1:

indywidualnie określić i odnotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Stosuje się 25 μ l właściwego roztworu lub samego nośnika, lub kontroli pozytywnej (równoległej lub najnowszej, na podstawie polityki laboratoryjnej, bierze się pod uwagę pkt 11-15), na część grzbietową każdego ucha.

- Dzień 2 i 3:

Powtórzyć procedurę stosowania przeprowadzoną w dniu 1.

- Dzień 4 i 5:

Bez podawania.

- Dzień 6:

Zanotować masę każdego zwierzęcia. Podać w iniekcji 250 μ l sterylnego roztworu chlorku sodu buforowanego fosforanami (PBS) zawierającego 20 μ Ci ($7,4 \times 10^5$ Bq) (^3H) -metylo tymidyny trytovej wszystkim zwierzętom badanym i kontrolnym przez żyłę ogonową. Alternatywnie podać w iniekcji 250 μ l sterylnego PBS zawierającego 2 μ Ci ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jododezoksyuridyny i 10^{-5}M fluorodezoksyuridyny wszystkim myszom przez żyłę ogonową. Pięć godzin (5 h) później uśmiercić w sposób humanitarny zwierzęta. Wyciąć uszne węzły chłonne z każdego ucha myszy i przetwarzać razem w PBS dla każdego zwierzęcia (traktowanie w ujęciu osobniczym); alternatywnie wyciąć i zebrać węzły chłonne z każdego ucha w PBS z każdej grupy dawkowania (traktowanie zbiorcze w ujęciu grupowym). Informacje i schematy identyfikacji i rozbioru węzła chłonnego można znaleźć w pozycji (12). Do celów dalszego monitorowania miejscowych reakcji skóry w badaniu głównym, w protokole badania można uwzględnić dodatkowe parametry, takie jak punktacja rumienia ucha lub pomiar grubości ucha (zrobiony za pomocą grubościomierza lub za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy w czasie sekcji).

Przygotowanie zawiesiny komórek

26. Zostaje przygotowana jedna wspólna porcja zawiesiny z komórek węzła chłonnego (LNC) usuniętych obustronnie u pojedynczych zwierząt albo z połączonych grup dawkowania przez delikatne mechaniczne rozdzielanie agregatów na siateczce ze stali nierdzewnej o oczkach wielkości 200 μm lub za pomocą innych możliwych do przyjęcia technik służących tworzeniu jednokomórkowych zawiesin. Komórki węzłów chłonnych są przemywane dwukrotnie pozostałym PBS a DNA jest strącane 5 % kwasem trichlorooctowym (TCA) w 4

oC przez 18 godzin (3). Peletki są albo zawieszane ponownie w 1 mL TCA i przenoszone do fiolek scyntylacyjnych zawierających 10 mL płynu scyntylacyjnego do policzenia ^3H , lub też przenoszone bezpośrednio do fiolek do liczenia impulsów gamma, w celu liczenia impulsów ^{125}I .

Określenie proliferacji komórek (wbudowanie związku promieniotwórczego)

27. Wbudowanie ^3H -metylotymidyny mierzone jest przez liczenie impulsów β -scyntytacji jako liczba rozpadów na minutę (DPM). Wbudowywanie ^{125}I -jododezoksyuridyny mierzone jest jako impulsy ^{125}I i również wyrażane jako DPM. W zależności od zastosowanego podejścia, wbudowanie wyrażane jest jako DPM/mysz (ujęcie osobnicze) lub DPM/grupa dawkowania (ujęcie zbiorcze).

Ograniczone podejście LLNA

28. W pewnych sytuacjach, jeśli zachodzi potrzeba regulacyjna, aby potwierdzić negatywne oczekiwania co do potencjału działania uczulającego na skórę, można zastosować fakultatywny protokół rLLNA (16) (17) (18) z wykorzystaniem mniejszej liczby zwierząt, pod warunkiem, że są przestrzegane wszystkie inne specyfikacje protokołu LLNA w tej TM. Przed zastosowaniem podejścia rLLNA, należy przedstawić jasne uzasadnienie i naukowe przesłanki uzasadniające jego stosowanie. Jeżeli uzyskuje się wynik pozytywny lub niejednoznaczny, mogą się okazać konieczne dodatkowe badania w celu interpretacji lub wyjaśnienia nieprawidłowości.

29. Zmniejszenie liczby grup dawkowania jest jedyną różnicą między protokołami badania metod LLNA i rLLNA i z tego powodu rLLNA nie dostarcza informacji na temat relacji między dawką a reakcją. Dlatego też rLLNA nie należy stosować w przypadku, gdy potrzebne są informacje na temat relacji między dawką a reakcją. Podobnie jak w wielodawkowym LLNA, stężeniem substancji badanej ocenianym w rLLNA powinno być maksymalne stężenie, które nie wywołuje widocznej ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry u myszy (zob. pkt 18).

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

30. Zwierzęta poddaje się starannej obserwacji klinicznej raz dziennie pod kątem jakichkolwiek oznak klinicznych, czy to miejscowego podrażnienia w miejscu zastosowania czy też ogólnoustrojowej toksyczności. Wszystkie obserwacje kliniczne są systematycznie odnotowywane w postaci zapisów prowadzonych dla każdej myszy. Plany monitorowania powinny obejmować kryteria umożliwiające szybką identyfikację tych myszy, które wykazują oznaki toksyczności ogólnoustrojowej, nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry lub żrącego działania na skórę, w celu eutanazji (37).

Masy ciała

31. Jak wskazano w pkt 25, indywidualne masy ciała określone są na początku badania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu zwierząt.

OBLICZANIE WYNIKÓW

32. Wyniki dla każdej grupy dawkowania są wyrażane jako SI. Jeżeli zastosowano ujęcie osobnicze, SI otrzymuje się przez podzielenie średniej wartości DPM/mysz w obrębie każdej grupy dawkowania badanej substancji i grupy pozytywnej kontroli przez średnią wartość DPM/zwierzę dla grupy kontrolnej rozpuszczalnika/nośnika.. Średnie SI dla grup VC wynosi zatem jeden. Przy zastosowaniu ujęcia zbiorczego, SI otrzymuje się przez podzielenie zbiorczego wbudowania związku promieniotwórczego dla każdej grupy dawkowania przez wbudowanie w zbiorczej próbie grupy VC; to daje średnie SI.

33. W procesie decyzyjnym wynik uznawany jest za pozytywny jeśli $SI \geq 3$. Jednakże siła reakcji na dawkę, znaczenie statystyczne i spójność reakcji rozpuszczalnik/nośnik i PC mogą również być stosowane przy ustalaniu, czy wynik graniczny można uznać za pozytywny (4)(5)(6).

34. Jeżeli zachodzi potrzeba objaśnienia otrzymanych wyników, należy rozważyć różne własności badanej substancji, w tym rozważyć, czy jest strukturalnie pokrewna znanym czynnikom uczulającym, czy powoduje nadmierne podrażnienie skóry u myszy, a także rozważyć charakter zaobserwowanej relacji dawka-reakcja. Te i inne względy omówione są szczegółowo gdzie indziej (7).

35. Gromadzenie danych dotyczących radioaktywności na poziomie poszczególnych myszy umożliwi analizę statystyczną danych w odniesieniu do obecności i relacji dawka-reakcja. Ocena statystyczna może obejmować ocenę relacji między dawką a reakcją, jak również odpowiednio dostosowane porównania badanych grup (np. grupa dawkowania w parach w porównaniu do równoległej grupy kontrolnej otrzymującej nośnik). Analizy statystyczne mogą obejmować, np. regresję liniową lub badanie Williamsa w celu dokonania oceny tendencji w relacji między dawką a reakcją oraz badanie Dunnetta w odniesieniu do porównań par. Przy wyborze właściwej metody analizy statystycznej danych, prowadzący badanie powinien zachować świadomość możliwej nierówności wariancji lub innych powiązanych problemów, które mogą spowodować konieczność transformacji danych lub przeprowadzenia nieparametrycznej analizy statystycznej. W każdym przypadku prowadzący badanie musi liczyć się z koniecznością przeprowadzenia obliczeń SI i analiz statystycznych z wykorzystaniem pewnych punktów danych i bez nich (tzw. „wartości odbiegające”).

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

36. Dane należy przedstawić w formie tabeli. Przy wykorzystaniu podejścia w ujęciu osobniczym należy przedstawić wartości DMP dla poszczególnych zwierząt, średnią wartość DPM/zwierzę w danej grupie, powiązany opis błędu (np. SD, SEM), oraz średnie SI dla każdej grupy dawkowania porównywane z równoległą grupą VC. Przy wykorzystaniu ujęcia zbiorczego, należy wskazać średnią/medianę DPM i średnie SI dla każdej grupy dawkowania porównane z równoległą grupą VC.

Sprawozdanie z badań

37. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Substancje: badana i kontrolna:

- dane identyfikacyjne (np. numery CAS lub WE, jeśli są dostępne); źródło: czystość; znane zanieczyszczenia; numer partii);
- cechy fizyczne i własności fizykochemiczne (np. lotność, stabilność, rozpuszczalność);
- jeżeli jest to mieszanina, skład i względne udziały procentowe składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

- - dane identyfikacyjne (czystość; stężenie, tam gdzie stosowne; wykorzystane objętości);
- uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta badane:

- źródło, z którego pochodzą myszy szczepu CBA;
- status mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany;
- liczba i wiek zwierząt;
- źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiska, pokarm itp.

Warunki badania:

- szczegóły przygotowania i stosowania substancji badanej;
- uzasadnienie doboru dawek (łącznie z wynikami z badania wstępnego, jeśli było przeprowadzane);
- nośnik i użyte stężenia substancji testowej oraz całkowita ilość zastosowanej substancji badanej;
- szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody);
- szczegóły dotyczące poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek;
- metody pomiaru toksyczności;
- kryteria uznawania badań za pozytywne lub negatywne;
- szczegóły dotyczące protokołu odchyłeń i wyjaśnienie, w jaki sposób odchylenie ma wpływ na planowanie badań i ich wyniki;

Sprawdzenie wiarygodności:

- podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności, w tym informacji o wykorzystanej substancji badanej, stężeniach i nośniku;
- równoległe i/lub wcześniejsze pozytywne i negatywne dane kontroli laboratorium prowadzącego badanie;
- jeżeli nie włączono równoległej grupy PC, data i sprawozdanie laboratoryjne z ostatniego okresowego PC i sprawozdanie wyszczególniające wcześniejsze dane dotyczące PC dla danego laboratorium, uzasadniające przyczyny dla których nie przeprowadzono PC równoległe;

Wyniki:

- masa poszczególnych myszy na początku dawkowania i przy planowanym uśmierceniu; jak również średnia i opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) w odniesieniu do każdej grupy dawkowania;

- przebieg czasowy pojawienia się i oznaki toksyczności, w tym podrażnień skóry w miejscu podania, jeśli takie wystąpiły, u każdego zwierzęcia;
- tabelę indywidualnych (podejście w ujęciu osobniczym) lub średnich/mediana (ujęcie zbiorcze) wartości DPM oraz SI dla każdej grupy dawkowania;
- średnią oraz opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) dla wartości DPM/mysz dla każdej grupy dawkowania i wyniki analizy wartości odbiegających dla każdej grupy dawkowania przy zastosowaniu podejścia osobniczego;
- obliczone SI i odpowiednią miarę zmienności, uwzględniającą zmienność między zwierzętami w obu grupach: substancji badanej i kontrolnej przy użyciu podejścia osobniczego;
- relacja dawka-reakcja;
- analizy statystyczne, tam gdzie stosowne;

Omówienie wyników:

- krótki komentarz do wyników, analiza zależności reakcji od dawki oraz w stosownych przypadkach, analizy statystyczne, z wnioskiem czy substancja testowa powinna być uznana za czynnik uczulający skórę.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paryż. Available at: [<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. Dostępny na stronie:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Kwiecień 2007. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [<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. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, 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, dostępne na stronie: [<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, Paryż, France. Dostępny na stronie: 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. Dostępny na stronie: [<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, Paryż, France. Dostępny na stronie: [<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, Available at: 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, Paryż. Dostępny na stronie: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Dodatek 1

NORMY EFEKTYWNOŚCI DO CELÓW OCENY PROPONOWANYCH PODOBNYCH DO LLNA LUB ZMODYFIKOWANYCH METOD BADANIA DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ

WSTĘP

1. Normy efektywności służą przede wszystkim ustaleniu w jaki sposób określić, czy nowe metody badań, zarówno zastrzeżone (tj. chronione prawem autorskim czy znakiem towarowym, zarejestrowane) jak i niezastrzeżone, są wystarczająco dokładne i wiarygodne w odniesieniu do konkretnych celów badawczych. Te normy efektywności, opracowane na podstawie zatwierdzonych i zaakceptowanych metod badawczych, mogą być wykorzystane do oceny wiarygodności i dokładności innych podobnych metod (nazywanych potocznie metodami „naśladowczymi”), które opierają się na podobnych zasadach naukowych i mierzą lub przewidują te same skutki biologiczne lub toksyczne (14).

2. Przed przyjęciem zmodyfikowanych metod (tj. proponowanych ewentualnych usprawnień do zatwierdzonej metody badań), należy dokonać oceny w celu określenia wpływu proponowanych zmian na działanie badania oraz zakres, w jakim zmiany takie mają wpływ na informacje dostępne dla innych elementów procesu zatwierdzania. W zależności od liczby i charakteru proponowanych zmian, wygenerowanych danych i towarzyszącej tym zmianom dokumentacji, powinny one być poddawane takiemu samemu procesowi walidacji, jak opisano w odniesieniu do nowego badania, lub, w stosownych przypadkach, ograniczonej ocenie wiarygodności i istotności przy użyciu sprawdzonej normy efektywności (14).

3. Podobne lub zmodyfikowane metody zaproponowane w ramach tej TM, należy poddać ocenie w celu określenia ich wiarygodności i dokładności przy użyciu substancji chemicznych reprezentujących pełne spektrum ocen LLNA. W celu uniknięcia nieuzasadnionego wykorzystywania zwierząt, zaleca się, aby naukowcy opracowujący modele zasięgnęli opinii właściwych władz przed rozpoczęciem badania walidacyjnego zgodnie z normami efektywności i wytycznymi zamieszczonymi w niniejszej TM.

4. Niniejsze normy efektywności opierają się na normach US-ICCVAM, EC-ECVAM oraz japońskiej zharmonizowanej normie efektywności JaCVAM (12), służących do oceny wiarygodności metod podobnych do LLNA lub zmodyfikowanych jej wersji. Norma efektywności składa się z zasadniczych elementów metody badania, zalecanych substancji odniesienia i norm dotyczących dokładności i wiarygodności, które proponowana metoda powinna spełniać lub przewyższać.

I. Istotne elementy metody badania

5. W celu zagwarantowania, że zmodyfikowana wersja metody LLNA lub metoda podobna do niej jest pod względem funkcjonalnym i mechanistycznym analogiczna do LLNA i mierzy ten sam biologiczny skutek, w protokole metody badania powinny zostać uwzględnione następujące elementy:

- substancja badana powinna być stosowana miejscowo na obu uszach myszy;
- proliferacja limfocytów powinna być mierzona w węzłach chłonnych odprowadzających z miejsca stosowania badanej substancji;

- proliferacja limfocytów powinna być mierzona w fazie indukcyjnej uczulenia skóry;
- wybraną dla badanej substancji najwyższą dawką powinno być maksymalne stężenie, które nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry u myszy. Dla pozytywnej chemicznej substancji odniesienia, najwyższa dawka powinna być co najmniej tak duża, jak wartości LLNA EC3 odpowiednich chemicznych substancji odniesienia (zob. Tabela 1) bez wywoływania ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry u myszy;
- powinna zostać włączona równoległa VC do każdego badania oraz, w stosownych przypadkach, powinny być również wykorzystane równoległe PC;
- w grupie dawkowania powinny być wykorzystane co najmniej cztery zwierzęta;
- można gromadzić indywidualne lub zbiorcze dane z badań na zwierzętach.

Jeżeli którekolwiek z tych kryteriów nie jest spełnione, wówczas dane normy efektywności nie mogą być wykorzystywane do zatwierdzania podobnych lub zmodyfikowanych metod.

II. Minimalny wykaz chemicznych substancji odniesienia

6. W normach US-ICCVAM, EC-ECVAM oraz japońskiej zharmonizowanej normie efektywności JaCVAM (12) zidentyfikowano 18 podstawowych chemicznych substancji odniesienia, które należy wykorzystywać i cztery nieobowiązkowe chemiczne substancje odniesienia (tj. substancje, które w LLNA: DA dają fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne wyniki, jeśli porównać je do wyników badań na ludziach i na świnkach morskich (B.6 i wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13), i z tego względu umożliwiają wykazanie, że dana metoda działa równie dobrze jak LLNA lub ją przewyższa), które włączono do normy efektywności dotyczącej LLNA. W celu zidentyfikowania tych substancji chemicznych posłużono się następującymi kryteriami:

- wykaz chemicznych substancji odniesienia reprezentuje typy substancji zazwyczaj badane w odniesieniu do potencjalnego działania uczulającego na skórę i do zakresu reakcji, które LLNA jest w stanie mierzyć lub przewidywać;
- substancje mają ściśle określone chemiczne struktury;
- udostępniono dla każdej substancji dane LLNA z badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13) oraz, tam gdzie możliwe, dane z badań na ludziach; oraz
- substancje były łatwo dostępne z handlowego źródła.

Zalecane chemiczne substancje odniesienia przedstawiono w tabeli 1. Badania przy użyciu proponowanych chemicznych substancji odniesienia powinny być oceniane w nośniku, z którym są wymienione w tabeli 1. W sytuacjach, w których wymieniona w wykazie substancja nie jest dostępna, można stosować inne substancje spełniające kryteria doboru, z odpowiednim uzasadnieniem.

TABELA 1 ZALECANE W NORMIE EFEKTYWNOŚCI LLNA CHEMICZNE SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Numer	Substancje chemiczne ¹	Nr CAS	Forma	Nośnik ²	EC3 % ³	N ⁴	0.5x - 2.0x EC3	Rzeczywisty zakres EC3	LLNA w porównaniu z badaniami na świnkach morskich	LLNA w porównaniu z badaniami na ludziach
1	5-chloro-2-metylo-4-izotiazolino-3-jeden (CMI)/2-metylo-4-izotiazolino-3-jeden (MI) ₅	26172-55-4/ 2682-20-4	Ciecz	DMF	0.009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Stała	AOO	0.049	15	0.025-0.099	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-fenylendiamina	106-50-3	Stała	AOO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	Chlorek kobaltu	7646-79-9	Stała	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	Izoeugenol	97-54-1	Ciecz	AOO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Stała	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	Cytral	5392-40-5	Ciecz	AOO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Ciecz	AOO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Ciecz	AOO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	Benzoesan fenylu	93-99-2	Stała	AOO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+
11	Alkohol cynamonowy	104-54-1	Stała	AOO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Stała	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metakrylan metylu	80-62-6	Ciecz	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	chlorobenzen	108-90-7	Ciecz	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Alkohol izopropylowy	67-63-0	Ciecz	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Kwas mlekowy	50-21-5	Ciecz	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Salicylan metylu	119-36-8	Ciecz	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Kwas salicylowy	69-72-7	Stała	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Numer	Substancje chemiczne ¹	Nr CAS	Forma	Nośnik ²	EC3 % ³	N ⁴	0.5x - 2.0x EC3	Rzeczywisty zakres EC3	LLNA w porównaniu z badaniami na świnkach morskich	LLNA w porównaniu z badaniami na ludziach
Nieobowiązkowe substancje, które mają wykazać poprawę wyników w odniesieniu do LLNA										
19	Sól sodowa siarczanu dodecyłu	151-21-3	Stała	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	Dimetakrylan glikolu etylenowego	97-90-5	Ciecz	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/-
21	Ksylen	1330-20-7	Ciecz	AOO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	Chlorek niklu	7718-54-9	Stała	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Skróty: AOO = aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4: 1 v/v); Nr CAS = Numer w Chemical Abstracts Service = Serwisie Dokumentacji Chemicznej; DMF = N, N-dimetyloformamid; DMSO = sulfotlenek dimetylowy; DNCB = 2,4-chlorodinitrobenzen; EC 3= szacowane stężenie konieczne do wyprodukowania wskaźnika stymulacji 3; GP = wynik testów na świnkach morskich (tj. B. 6 lub wytyczna OECD nr 406 dotycząca badań) (13); HCA = aldehyd cynamonowy heksylu; Liq = ciecz; LLNA = wynik badania lokalnych węzłów chłonnych na myszach (tj. B. 42 lub wytyczna OECD nr 429 dotycząca badań) (1); MEK = keton metylo-etylowy; ND = nie dotyczy, ponieważ wskaźnik stymulacji <3; NC = nie obliczone, ponieważ dane zostały uzyskane z jednego badania; SOL = stałe; veh = badany nośnik.

¹ Substancje należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

² Ze względu na potencjalny wpływ różnych nośników na efektywność LLNA należy zastosować zalecany dla każdej chemicznej substancji odniesienia nośnik (24) (32).

³ Wartość średnia, w przypadku gdy była dostępna więcej niż jedna wartość EC3. W odniesieniu do negatywnych substancji (tj. o wskaźniku stymulacji <3) podano najwyższe badane stężenie.

⁴ Liczba badań LLNA, z których dane zostały uzyskane.

⁵ Dostępny w handlu jako Kathon CG (Nr CAS 55965-84-9), mieszanina CMI IMI w proporcji 3:1. Odpowiednie stężenia dla każdego składnika wahają się między 1,1% a 1,25% (CMI) oraz 0,3% a 0,45% (MI). Obojętne składniki to: sole magnezu (od 21,5% do 24%) i azotan miedzi (od 0,15% do 0,17%), natomiast pozostała postać użytkowa to 74% – 77% wody. Kathon CG jest łatwo dostępny w firmach Sigma-Aldrich i Rohm and Haas (obecnie Dow Chemical Corporation).

*= Przypuszcza się, że u ludzi nie wywołuje uczulenia ze względu na fakt, że nie stwierdzono oznak klinicznych testu skórnoego, nie jest on uwzględniony w teście skórnym plasterkowym z zestawem alergenów, a także nie stwierdzono przypadków działania uczulającego na człowieka.

** = GP brak dostępnych danych.

III. Zdefiniowane normy wiarygodności i dokładności

7. Dokładność podobnej lub zmodyfikowanej metody LLNA powinna być taka sama, jak określona w normie efektywności LLNA, ocenionej przy użyciu 18 podstawowych chemicznych substancji odniesienia, jakie powinny być stosowane, lub ją przewyższać. Zastosowanie nowej lub zmodyfikowanej metody powinno prowadzić do poprawnej klasyfikacji w oparciu o decyzję „tak/nie”. Jednak nowa lub zmodyfikowana metoda może nie zaklasyfikować poprawnie wszystkich z podstawowych chemicznych substancji odniesienia, jakie powinny być stosowane. Jeżeli na przykład jeden z czynników słabo uczulających został nieprawidłowo zaklasyfikowany, uzasadnienie nieprawidłowej klasyfikacji i odpowiednie dodatkowe dane (np. wyniki testów, na podstawie których prawidłowo zaklasyfikowano inne substancje z fizycznymi, chemicznymi i uczulającymi właściwościami podobnymi do tych posiadanych przez nieprawidłowo zaklasyfikowaną chemiczną substancję odniesienia) mogłyby być uznane za świadczące o równoważnej efektywności. W takich okolicznościach status zatwierdzenia nowej lub zmodyfikowanej metody LLNA będzie oceniany na zasadzie jednostkowych przypadków.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

8. W celu określenia odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, nowa lub zmodyfikowana metoda LLNA powinna być oceniona przy wykorzystaniu substancji uczulającej, która jest dobrze scharakteryzowana w LLNA. Z tego względu normy efektywności LLNA opierają się na zmienności wyników z powtórzonych badań aldehydu cynamonowego heksylu (HCA). Aby ocenić wiarygodność wewnątrzlaboratoryjną, należy wyprowadzić szacunkowe progowe wartości stężenia dla HCA cztery razy, w co najmniej jednodziennych odstępach czasu. Potwierdzeniem dopuszczalnej wewnątrzlaboratoryjnej odtwarzalności jest zdolność laboratorium do uzyskania, w każdym badaniu HCA progowych szacunkowych wartości dla HCA między 5% i 20%, tj. o zakresie 0,5-2,0 razy średnia EC₃ określona dla HCA (10%) w LLNA (zob. tabela 1).

Odtwarzalność międzylaboratoryjna

9. Odtwarzalność międzylaboratoryjna nowej lub zmodyfikowanej metody LLNA powinna być oceniona przy użyciu dwóch substancji uczulających, które są dobrze scharakteryzowane w LLNA. Normy efektywności LLNA opierają się na zmienności wyników z badań HCA i 2,4-chlorodinitrobenzenu (DNCB) w różnych laboratoriach. Progowe szacunkowe wartości stężenia powinny być ustalane niezależnie, w wyniku pojedynczego badania przeprowadzonego przynajmniej w trzech różnych laboratoriach. Aby wykazać dopuszczalną odtwarzalność międzylaboratoryjną, każde laboratorium powinno uzyskać progowe szacunkowe wartości stężenia wielkości od 5% do 20% dla HCA i od 0,025% do 0,1% dla DNCB, tj. o zakresie 0,5-2,0 razy średnia EC₃ stężeń określonych dla HCA (10%) i DNCB (0,05%), odpowiednio, w LLNA (zob. tabela 1).

Dodatek 2

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (14).

Substancja wzorcowa : Uczulająca lub nieuczulająca substancja wykorzystywana jako norma dla celów porównania z substancją badaną. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizykochemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

Oszacowany próg stężenia (ECt): Oszacowane stężenie substancji badanej, niezbędne do wyprodukowania wskaźnika stymulacji, który jest oznaką pozytywnej reakcji.

Oszacowane stężenie 3 (EC3): Oszacowane stężenie substancji badanej, niezbędne do wyprodukowania wskaźnika stymulacji o wartości 3.

Falszywy wynik negatywny: Substancja badana w wyniku zastosowania metody badania oznaczona niewłaściwie jako negatywna lub nieaktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest pozytywna lub aktywna.

Falszywy wynik pozytywny: Substancja badana w wyniku zastosowania metody badania oznaczona niewłaściwie jako pozytywna lub aktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest negatywna lub nieaktywna.

Zagrożenie: Możliwość wywierania negatywnego wpływu na zdrowie lub środowisko. Niekorzystny wpływ przejawia się tylko wtedy, gdy istnieje wystarczające narażenie.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: Miernik zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję mogą przynieść jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest określana w procesach poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje w jakim stopniu badanie można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (14).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: Ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również odtwarzalnością laboratoryjną (14).

Badanie naśladowcze: potoczne określenie metody badania, która jest strukturalnie i funkcjonalnie podobna do zwalidowanych i zaakceptowanych zgodnie z referencyjną metodą badania. Taka metoda badania kwalifikowałaby się do wykorzystania jako skrócona metoda walidacji. Zamiennie wykorzystana z podobną metodą badania (14).

Wynik odbiegający: Wynik odbiegający jest obserwacją, która znacznie różni się od innych wartości w losowej próbie z populacji.

Normy efektywności (PS): Normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badania, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) istotne elementy metody badania; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników w uzyskanych dla zatwierdzonej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem minimalnego wykazu chemicznych substancji odniesienia (14).

Zastrzeżona metoda badawcza: Metoda badania, której produkcja i dystrybucja jest ograniczona poprzez patenty, prawa autorskie, znaki towarowe, itp.

Zapewnienie jakości: Proces zarządzania, w którym przestrzeganie norm i wymogów w zakresie badań laboratoryjnych, oraz procedur dotyczących dokumentacji i dokładności przekazywania danych jest oceniane przez osoby niezależne od tych, które przeprowadzają badania.

Chemiczne substancje odniesienia: substancje chemiczne wybrane do wykorzystania w procesie walidacji, dla których reakcje w systemie badań referencyjnych *in vitro*, jak i *in vivo* lub odpowiednie dla badań gatunki są już znane. Te substancje powinny być reprezentatywne dla klas substancji chemicznych, w odniesieniu do których – zgodnie z oczekiwaniami – będzie stosowana dana metoda badawcza i powinny reprezentować pełny zakres reakcji, jakich można się spodziewać po substancjach chemicznych, w odniesieniu do których środek może być stosowany, od reakcji silnych przez słabe aż do negatywnych. Różne zestawy chemicznych substancji odniesienia mogą być wymagane na różnych etapach procesu zatwierdzania, a także w odniesieniu do różnych metod badawczych i zastosowań badania (14).

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (14).

Wiarygodność : Miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (14).

Działanie uczulające na skórę: Proces immunologiczny, do którego dochodzi w przypadku, gdy osobnik wrażliwy jest narażony miejscowo na wywołujący uczulenie chemiczny alergen, powodujący immunologiczną reakcję skórą, co może prowadzić do uczulania przez kontakt ze skórą.

Wskaźnik stymulacji (SI): Wartość obliczona dla oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę przez substancję badaną, który wyraża się stosunkiem proliferacji w grupach poddanych działaniu środka do proliferacji w równoległej grupie kontrolnej nośnika.

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

Zwalidowana metoda badania : Metoda badania, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zwalidowana metoda badania może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (14).”;

2. rozdział B.46 otrzymuje brzmienie:

„B.46 Działanie drażniące na skórę *in vitro*: badanie na modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka

WSTĘP

1. Działanie drażniące na skórę oznacza powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę substancji badanej na okres do 4 godzin [zgodnie z definicją Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) i z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (1)(3)]. Niniejsza metoda badania (TM) obejmuje procedurę *in vitro*, która może być wykorzystywana do identyfikacji zagrożeń w przypadku chemikaliów (substancje drażniące i mieszaniny) zgodnie z GHS ONZ i UE CLP kategorii 2 (1) (2) (3). W UE i w innych regionach, które nie przyjęły fakultatywnej kategorii 3 GHS ONZ (lekko drażniące), ta TM może być wykorzystywana również w celu zidentyfikowania chemikaliów niezakwalifikowanych do żadnej kategorii, tj. w GHS ONZ i UE CLP określonych mianem „brak kategorii” (1)(3). Niniejsza TM może być wykorzystywana do ustalenia drażliwości substancji dla skóry na podstawie samodzielnego badania zastępczego dla badania działania drażniącego na skórę metodą *in vivo* w wielopoziomowej strategii badań (4 i Rozdział B.4 niniejszego załącznika).

2. Ocena działania drażniącego na skórę obejmowała na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych (zob. wytyczna OECD nr 404 dotycząca badań; rozdział B.4 w niniejszym załączniku)(4). Z uwagi na konieczność zapewnienia dobrostanu zwierząt zmodyfikowano w 2004 r. metodę B.4, umożliwiając ustalenie działania żrącego/drażniącego na skórę dzięki zastosowaniu strategii badań wielopoziomowych, przy użyciu zwalidowanych metod badania *in vitro* i *ex vivo*, co z kolei pozwoliło na uniknięcie zadawania bólu zwierzętom i powodowania ich cierpienia. Trzy zwalidowane metody badania *in vitro* zostały przyjęte w wytycznych OECD nr 430, 431 i 435 dotyczących badań (5) (6) (7) i dwóch z nich jako rozdziały B.40 i B.40bis niniejszego załącznika, które mają być stosowane do części dotyczącej badań działania żrącego w ramach strategii badań wielopoziomowych B.4 lub wytycznej OECD nr 404 dotyczącej badań (4).

3. Niniejsza TM odnosi się do punktu końcowego w zakresie zdrowia ludzkiego działania drażniącego na skórę. Opiera się ona na wykorzystaniu modeli zrekonstruowanego ludzkiego naskórka (RhE), które pod względem ogólnej struktury (zastosowanie niezmiennych keratynocytów naskórka pochodzenia ludzkiego jako źródła komórek, reprezentatywnej tkanki i cytoarchitektury) imitują ściśle biochemiczne i fizjologiczne właściwości górnych warstw ludzkiej skóry, tj. naskórka.. Niniejsza TM obejmuje również zestaw norm efektywności (PS) (dodatek 2) do oceny podobnych i zmodyfikowanych metod badania z wykorzystaniem RhE opracowanych przez EC-ECVAM (8), zgodnie z zasadami wytycznych OECD nr 34 (9).

4. Istnieją trzy zwalidowane metody, które są zgodne z niniejszą TM. Przeprowadzono badania wstępne, optymalizacyjne i walidacyjne metody *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), z wykorzystaniem modelu RhE, dostępnego w handlu pod nazwą EpiSkin™ (oznaczonego jako zwalidowana metoda referencyjna – VRM). Dwie inne dostępne w handlu metody badania *in vitro* działania drażniącego na skórę z wykorzystaniem

RhE wykazały podobne wyniki do VRM zgodnie z walidacją opartą na normach efektywności (21), a są to metody EpiDerm™ SIT (EPI-200) i SkinEthic™ RHE (22)

5. Zanim będzie możliwe wykorzystanie proponowanej podobnej lub zmodyfikowanej metody badania *in vitro* z wykorzystaniem RhE innej niż VRM, EpiDerm™ SIT (EPI-200) lub SkinEthic™ RHE do celów regulacyjnych, należy ustalić jej wiarygodność, istotność (dokładność) i ograniczenia w zakresie dotyczącym jej proponowanego stosowania, aby zapewnić jej porównywalność ze zwalidowaną metodą referencyjną, zgodnie z normami efektywności określonymi w niniejszej metodzie badania (dodatek 2). Ponadto zaleca się odniesienie się do dokumentu OECD zawierającego wyjaśnienia dotyczące badania *in vitro* działania drażniącego na skórę zanim podobna lub zmodyfikowana metoda badania *in vitro* z wykorzystaniem RhE zostanie opracowana, zwalidowana i przedłożona do przyjęcia (23).

DEFINICJE

6. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

7. Ograniczeniem TM, jak wykazano w badaniu walidacyjnym (16), jest fakt, że nie umożliwia ona klasyfikacji substancji chemicznych do opcjonalnej kategorii 3 GHS ONZ (lekko drażniące) (1). Przy zastosowaniu jej do częściowego zastąpienia badania, mogą się okazać konieczne kolejne badanie *in vivo* do uzyskania pełnego opisu potencjalnego działania drażniącego na skórę (4 i rozdział B.4 niniejszego załącznika). Uznaje się, że zastosowanie ludzkiej skóry podlega międzynarodowym i krajowym zastrzeżeniom i warunkom etycznym.

8. Niniejsza TM odnosi się do elementu badania *in vitro* działania drażniącego na skórę w wielopoziomowej strategii badań B.4 (wytyczna OECD nr 404 dotycząca badań) w odniesieniu do działania żrącego/podrażniającego dla skóry (4). Pomimo, że niniejsza TM nie zapewnia wystarczających informacji na temat działania żrącego na skórę, należy zauważyć, że metoda B.40bis (wytyczna OECD nr 431 dotycząca badań) dotycząca działania żrącego na skórę opiera się również na tym samym systemie badań z RhE, choć z wykorzystaniem innego protokołu (rozdział B.40 bis). Niniejsza metoda opiera się na modelach RhE wykorzystujących ludzkie keratynocyty, które w związku z tym w badaniach *in vitro* pełnią rolę docelowego narządu u docelowego gatunku. Ponadto bezpośrednio obejmuje ona pierwszy etap kaskady zapalnej/mechanizmu działania (uszkodzenia komórki i tkanki dające w wyniku miejscowy uraz), które występuje podczas podrażnienia skóry *in vivo*. W ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej TM zbadano szeroką gamę chemikaliów – a empiryczna baza danych badań walidacyjnych wyniosła ogółem 58 chemikaliów (16)(18)(23). Ma to zastosowanie do substancji stałych, płynnych, półstałych i wosków. Płyny mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne w wodzie lub nie. W miarę możliwości substancje stałe powinny zostać wcześniej zmielone do postaci drobnoziarnistego proszku przed ich zastosowaniem; żadna inna obróbka wstępna próbki nie jest wymagana. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniach walidacyjnych (24). Jest możliwe, że mogą one być badane z wykorzystaniem technologii RhE, obecna TM nie pozwala na badanie gazów i aerozoli. Należy również zauważyć, że mocno zabarwione substancje chemiczne mogą zakłócać pomiary żywotności komórek i wymagać stosowania przystosowanych kontroli w celu korekty (zob. pkt 24-26).

9. Pojedyncza seria oznaczeń, w skład której wchodzi trzy replikaty tkanki, powinna wystarczyć dla zbadania substancji chemicznej, jeśli klasyfikacja jest jednoznaczna. Jednakże w przypadku wątpliwych wyników, jak np. niezgodność powtarzalnych pomiarów i/lub

średnia procentowa żywotności równa $50 \pm 5\%$, należy rozważyć przeprowadzenie drugiej serii oznaczeń, jak również trzeciej w przypadku niezgodności między wynikami dwóch pierwszych serii.

ZASADA BADANIA

10. Badana substancja chemiczna jest наносzona miejscowo na trójwymiarowy model RhE składający się z niezmiennych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka, które poddano hodowli w celu uzyskania wielowarstwowego, wysoce zróżnicowanego modelu ludzkiego naskórka. Model ten składa się ze zorganizowanych warstw: podstawnej, kolczystej i ziarnistej oraz z wielopoziomowej warstwy rogowej zawierającej międzykomórkowe, blaszkowate warstwy lipidów przedstawiających główne lipidowe struktury, analogiczne do stwierdzanych *in vivo*.

11. Sprowokowane chemicznie działanie drażniące na skórę, objawiające się poprzez rumień i obrzęk, jest wynikiem kaskady wydarzeń zaczynającej się od penetracji warstwy rogowej i uszkodzenia leżących głębiej warstw keratynocytów. Umierające keratynocyty uwalniają mediatory, rozpoczynające kaskadę zapalną, która oddziałuje na komórki w skórze, w szczególności na komórki zrębowe i na endoteliocyty. To na skutek rozszerzenia i wzrostu przepuszczalności endoteliocytów można zaobserwować rumień i obrzęk (24). Metoda oparta na RhE dokonuje pomiaru początkowych zdarzeń w kaskadzie.

12. Żywotność komórek w modelach RhE jest mierzona metodą enzymatycznej konwersji przyżyciowego barwnika MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy, błękit tiazolilowy; numer CAS 298-93-1, w niebieską sól formazanową, którą oznacza się ilościowo po ekstrakcji z tkanek (25)]. Substancje drażniące identyfikuje się na podstawie ich zdolności do zmniejszenia żywotności komórek poniżej określonych wartości progowych (tj. $\leq 50\%$ dla substancji drażniących kategorii 2 GHS ONZ/UE CLP). W zależności od ram regulacyjnych, w których wyniki tej TM są wykorzystane, chemikalia, które prowadzą do zachowania żywotności komórek powyżej określonego poziomu progowego, można uznać za niedrażniące (tj. $> 50\%$ - brak kategorii).

WYKAZANIE EFEKTYWNOŚCI

13. Przed rozpoczęciem rutynowego stosowania którejkolwiek z trzech zatwierdzonych metod, które są zgodne z niniejszą TM, laboratoria powinny wykazać jej efektywność techniczną z wykorzystaniem dziesięciu chemicznych substancji odniesienia wymienionych w tabeli 1. W odniesieniu do podobnych metod, opracowanych w ramach niniejszej TM, lub do zmodyfikowanych wersji którejkolwiek z trzech zatwierdzonych metod powinny być spełnione wymogi normy efektywności opisane w dodatku 2 dotyczącym niniejszej TM, zanim dana metoda zostanie wykorzystana do badań regulacyjnych.

14. W ramach wykazywania efektywności zaleca się, aby użytkownik sprawdził właściwości bariery cechujące tkanki po ich otrzymaniu, zgodnie ze wskazaniem producenta modelu RhE. Jest to szczególnie ważne, jeżeli tkanki są wysłane na duże odległości lub w długich okresach czasu. Gdy metoda została z powodzeniem wprowadzona oraz wykazano jej efektywność, weryfikacja taka nie będzie konieczna w ramach rutynowej procedury. Jednak w przypadku rutynowego zastosowania metody zaleca się, aby w dalszym ciągu oceniać właściwości bariery w regularnych odstępach czasu.

Tabela 1 Chemiczne substancje odniesienia ¹

Che mika lia	nr CAS	Ocena <i>in vivo</i> ²	Stan fizyczny	Kategoria w klasyfikacji GHS ONZ/UE CLP
Kwas naftylooctowy	86-87-3	0	Ciało Stałe	Brak kat.
Izopropanol	67-63-0	0.3	Ciecz	Brak kat.
Stearynian metylu	112-61-8	1	Ciało Stałe	Brak kat.
Maślan heptylu	5870-93-9	1.7	Ciecz	Brak kat. (nieobowiązkowa kat. 3) ^{3,4}
Salicylan heksylu	6259-76-3	2	Ciecz	Brak kat. (nieobowiązkowa kat. 3) ^{3,4}
Aldehyd cyklamenu	103-95-7	2.3	Ciecz	Kat. 2
1-bromohexan	111-25-1	2.7	Ciecz	Kat. 2
wodorotleek potasu (5% roztwór wodny)	1310-58-3	3	Ciecz	Kat. 2
1-metylo-3-fenyl-1-piperazyna	5271-27-2	3.3	Ciało Stałe	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	3.4	Ciecz	Kat. 2

¹ Wymienione chemiczne substancje odniesienia stanowią podgrupę chemicznych substancji odniesienia używanych w badaniach walidacyjnych.

² Ocena *in vivo* zgodnie z B.4 i wytycznymi OECD nr 404 dotyczącymi badań (4).

³ Zgodnie z niniejszą metodą badania, opcjonalna kategoria 3 GHS ONZ (lekko drażniące) (1) jest uznawana za brak kategorii.

⁴ GHS ONZ opcjonalna kategoria 3 nie jest stosowana w ramach UE CLP.

PROCEDURA

15. Poniżej przedstawiono opis składowych i procedur badania oceniającego działanie drażniące na skórę przy wykorzystaniu RhE. Należy odtworzyć model RhE: może być on przygotowany w laboratorium lub uzyskany na rynku. Są dostępne standardowe procedury operacyjne (SPO) dla EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) i SkinEthic RHE™ (26)(27)(28). Badania należy wykonywać zgodnie z poniższymi zaleceniami:

Składowe METODY BADANIA RHE

Warunki ogólne

16. W celu odtworzenia naskórka należy użyć niezmiennych keratynocytów pochodzących od człowieka. Pod zachowującą funkcje życiowe warstwą rogową powinno znajdować się kilka warstw żywych komórek naskórka (warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista). Warstwa rogowa powinna być wielopoziomowa i powinna zawierać lipidy niezbędne do utworzenia czynnościowej bariery na tyle wytrzymałej, aby uniemożliwiała szybkie przenikanie cytotoksycznych markerów, np. soli sodowej siarczanu

dodecyłu (SDS) lub markera Triton X-100. Funkcję bariery należy wykazać i można ocenić albo poprzez ustalenie stężenia, w którym marker zmniejsza żywotność tkanek o 50% (IC₅₀) po ustalonym czasie narażenia na działanie, albo poprzez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50% (ET₅₀) po zastosowaniu markera w określonym, stałym stężeniu. Właściwości izolacyjne modelu RhE powinny zapobiegać przechodzeniu materiału przez warstwę rogową do żywej tkanki, gdyż w innym razie modelowanie narażenia skóry mogłoby być niewłaściwe. Model RhE nie powinien być skażony bakteriami, wirusami, mykoplazmami ani grzybami.

Warunki funkcjonalne

Żywotność

17. Próbą stosowaną dla ustalenia wielkości żywotności jest próba MTT (25). Użytkownicy modelu RhE powinni zapewnić, aby każda partia stosowanego modelu RhE spełniała określone kryteria kontroli negatywnej (NC). Gęstość optyczna (OD) samego rozpuszczalnika do ekstrakcji powinna być wystarczająco niska, tj. OD < 0,1. Zakres dopuszczalności (górna i dolna granica) kontroli negatywnej wartości gęstości optycznej (w warunkach metody badania działania drażniącego na skórę) jest określony przez producentów/dostawców modelu RhE, a zakresy akceptowalności dla trzech zatwierdzonych metod są podane w tabeli 2. Należy udokumentować stabilność w hodowli (uzyskiwanie podobnych wyników pomiarów żywotności) tkanki poddanej działaniu NC w badanym okresie narażenia.

Tabela 2 Zakresy dopuszczalności kontroli negatywnej wartości gęstości optycznej (OD)

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1.0	≤ 2.5
SkinEthic™ RHE	≥ 1.2	≤ 2.5

Funkcja bariery

18. Warstwa rogową i wchodzące w jej skład lipidy powinny być na tyle odporne, aby nie było możliwe szybkie przenikanie przez nie cytotoksycznych markerów, np. SDS lub markera Triton X-100, według oceny na podstawie IC₅₀ lub ET₅₀ (tabela 3).

Morfologia

19. Badanie histologiczne modelu RhE należy przeprowadzić z wykazaniem istnienia struktury przypominającej ludzki naskórek (w tym wielopoziomowej warstwy rogowej).

Odtwarzalność

20. Wyniki pozytywnej kontroli substancji chemicznej (PC), oraz negatywne kontrole (NC) metody badania powinny wykazywać odtwarzalność w czasie.

Kontrola jakości (QC)

21. Producent bądź dostawca modelu RhE powinni zapewnić i wykazać, że każda partia wykorzystywanego modelu RhE spełnia określone kryteria zwolnienia do produkcji, spośród których te dotyczące *żywołności* (pkt 17), *funkcji bariery* (pkt 18) i *morfologii* (pkt 19) są najbardziej istotne. Dane te powinny być przekazane użytkownikom metody, tak aby mogli oni uwzględnić tę informację w sprawozdaniu z badania. Zakres dopuszczalności (górną i dolną granicą) IC_{50} lub ET_{50} powinien zostać ustalony przez producenta/dostawcę modelu skóry (lub badacza w przypadku stosowania modelu opracowanego wewnętrznie). Do wiarygodnego przewidywania klasy podrażnienia można przyjąć wyłącznie wyniki uzyskane z użyciem zakwalifikowanych tkanek. Przykładowe zakresy dopuszczalności dla trzech zatwierdzonych metod podano w tabeli 3.

Tabela 3 Przykłady kryteriów zwolnienia serii na podstawie kontroli jakości

	Dolna granica dopuszczalności	Górna granica dopuszczalności
EpiSkin™ (SM) (poddawanie działaniu SDS przez 18 godzin) (26)	$IC_{50} = 1.0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100)(27)	$ET_{50} = 4.8 \text{ hr}$	$ET_{50} = 8.7 \text{ hr}$
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)(28)	$ET_{50} = 4.0 \text{ hr}$	$ET_{50} = 9.0 \text{ hr}$

Nakładanie substancji badanej i kontrolnej

22. Należy użyć co najmniej trzy powtórzenia dla każdej substancji badanej i kontrolnej w każdej serii. W przypadku płynnych i stałych substancji należy nałożyć na skórę dostateczną ilość substancji badanej, tak aby równomiernie pokrywała powierzchnię skóry, unikając jednak nakładania dawki nieograniczonej, tj. należy użyć co najmniej $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ lub $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. W przypadku ciał stałych przed nałożeniem należy zwilżyć powierzchnię naskórka wodą dejonizowaną lub destylowaną w celu poprawy kontaktu między badaną substancją chemiczną i powierzchnią naskórka. W miarę możliwości substancje stałe powinny być badane w postaci drobnoziarnistego proszku. Pod koniec okresu narażenia na działanie substancję badaną należy ostrożnie zmyć z powierzchni skóry buforem wodnym lub 0,9% NaCl. Zależnie od tego, która z trzech zatwierdzonych metod z wykorzystaniem RhE jest stosowana, okres narażenia na działanie może się wahać od 15 do 60 minut, a temperatura inkubacji może wynosić od 20 do 37 °C. Czas narażenia na działanie i temperatura są dobrane odpowiednio dla każdej z metod RhE i stanowią swoiste właściwości, różne dla każdej metody. Szczegółowe informacje określono w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących omawianych metod (26)(27)(28).

23. Równoległe NC i PC powinny być stosowane w każdej serii, aby wykazać, że żywołność (przy NC), funkcja bariery i ostateczna czułość tkankowa (przy PC) są zawarte w dopuszczalnym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. Proponowana PC to 5% roztworu wodnego SDS. Zalecanymi substancjami stanowiącymi NC są woda lub roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami (PBS).

Pomiary żywotności komórek

24. Najważniejszym elementem procedury badania jest to, że pomiarów żywotności nie wykonuje się natychmiast po narażeniu na substancje badane, ale po dostatecznie długim okresie inkubacji tkanek przemytych po tej ekspozycji, w świeżym podłożu. Ten okres pozwala zarówno na ustąpienie słabych działań cytotoksycznych, jak i na pojawienie się wyraźnych działań cytotoksycznych. Faza optymalizacji badania (11) (12) (13) (14) (15) wykazała, że okres 42 godzin inkubacji tkanek po ekspozycji jest optymalny.

25. Próba MTT jest uznaną metodą ilościową, którą należy wykorzystywać do pomiarów żywotności komórek w ramach niniejszej TM. Można ją stosować do badań z użyciem trójwymiarowego wytworu tkankowego. Próbkę tkanki umieszcza się w roztworze MTT o właściwym stężeniu (np. 0,3–1 mg/mL) na 3 godziny. Wytrącony niebieski produkt formazanowy ekstrahuje się następnie z tkanki przy użyciu rozpuszczalnika (np. izopropanol, kwaśny izopropanol) i mierzy się stężenie formazanu poprzez oznaczenie OD przy długości fali 570 nm, wykorzystując filtr w paśmie maksimum ± 30 nm.

26. Właściwości optyczne badanej substancji chemicznej lub jej działanie chemiczne na MTT mogą wpływać na próbę, powodując zafałszowanie oceny żywotności (ponieważ substancja badana może uniemożliwiać lub odwracać oraz powodować powstawanie barwy). Może tak się zdarzyć w przypadku niecałkowitego usunięcia określonej substancji badanej z tkanki przez przemywanie lub gdy substancja ta przeniknie przez naskórek. Jeśli substancja badana oddziałuje bezpośrednio na MTT (reduktor MTT), jest naturalnie barwna lub staje się barwna w trakcie oddziaływania na tkankę, należy zastosować dodatkowe kontrole w celu wykrycia i skorygowania wpływu substancji badanej na technikę pomiaru żywotności. Szczegółowy opis korekty bezpośredniej redukcji MTT i zakłóceń przez barwniki jest dostępny w standardowych procedurach operacyjnych dotyczących trzech zatwierdzonych metod (26) (27) (28).

Kryteria dopuszczalności

27. Dla każdej metody z zastosowaniem zwalidowanych serii RhE (zob. pkt 21), tkanki poddane działaniu NC powinny wykazywać OD odpowiednią do jakości tkanek poddanych wszystkim etapom wysyłki i odbioru oraz wszystkim procesom protokołu badania. Wartości OD kontroli nie powinny być niższe niż dolne granice zdefiniowane na podstawie danych historycznych. Podobnie tkanki poddane działaniu PC, tj. 5% roztworem wodnym SDS, powinny odzwierciedlać ich zdolności do reagowania na drażniącą substancję chemiczną w warunkach TM (26) (27) (28). Należy zdefiniować powiązane i właściwe miary zmienności pomiędzy replikatami tkanek (np. w przypadku stosowania odchyłeń standardowych (SD)) powinny one mieścić się w jednostronnym przedziale tolerancji 95% obliczonym na podstawie danych historycznych; dla VRM $SD < 18\%$).

Interpretacja wyników i model predykcyjny

28. Wartości OD uzyskane dla każdej substancji badanej można wykorzystać do obliczenia procentowej żywotności znormalizowanej w odniesieniu do NC, której żywotność ustala się na 100%. Należy wyraźnie zdefiniować i udokumentować wartość odcięcia procentowej żywotności komórek, odróżniającą drażniące substancje badane od niesklasyfikowanych substancji badanych, oraz procedury statystyczne stosowane do oceny wyników i identyfikacji substancji drażniących; należy również udowodnić, że są one właściwe. Wartości odcięcia do predykcji działania drażniącego są podane poniżej:

badana substancja chemiczna jest uważana za drażniącą dla skóry zgodnie z klasyfikacją GHS ONZ/UE CLP kategorii 2 jeśli żywotność tkanki po narażeniu i następującej po nim inkubacji jest mniejsza lub równa ($\leq$) 50%.

W zależności od ram regulacyjnych, w których są wykorzystywane wyniki niniejszej TM, badaną substancję można uznać za niewywierająca działania drażniącego na skórę zgodnie z GHS ONZ/UE CLP „brak kategorii” jeśli żywotność tkanki po narażeniu na działanie i następującej po nim inkubacji jest większa niż ($>$) 50%.

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

29. Dla każdej serii należy przedstawić w formie tabelarycznej, z uwzględnieniem w stosownych przypadkach danych z powtórzeń eksperymentu, dane z poszczególnych replikatów tkanek (np. dane dotyczące wartości OD i obliczonej procentowej żywotności komórek dla każdej substancji badanej, łącznie z klasyfikacją). Ponadto należy zgłosić średnie $\pm$ odchylenie standardowe dla każdej serii. Powinny być przedstawione zaobserwowane interakcje z odczynnikiem MTT i z barwnymi substancjami badanymi w odniesieniu do każdej substancji badanej.

Sprawozdanie z badania

30. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

- nazwy chemiczne, np. nazwa i numer CAS, nazwa i numer WE, jeżeli jest znany;
- czystość i skład substancji (w procentach wagowych);
- właściwości fizykochemiczne istotne dla prowadzenia badania (np. stan fizyczny, stabilność, lotność, pH i rozpuszczalność w wodzie, jeśli jest znana);
- postępowanie z substancjami badanymi / kontrolnymi przed rozpoczęciem badań, w odpowiednich przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- warunki przechowywania.

Uzasadnienie dla zastosowanego modelu RhE i protokołu

Warunki badania:

- zastosowany system komórkowy;
- pełne informacje podstawowe na temat stosowanego modelu RhE, z uwzględnieniem jego efektywności. Powinno to w szczególności obejmować:
 - (i) żywotność;
 - (ii) funkcję bariery;
 - (iii) morfologię;
 - (iv) odtwarzalność i predykcyjność;

- (v) kontrole jakości (QC) modelu;
- szczegóły zastosowanej procedury testowej;
- zastosowane badane dawki, czas trwania narażenia i okresu inkubacji po narażeniu;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badania;
- odwołanie do danych historycznych modelu. Powinno to między innymi obejmować:
 - (i) dopuszczalność danych QC z odwołaniem do danych dotyczących serii historycznych;
 - (ii) dopuszczalność wartości kontroli pozytywnych i negatywnych, z określeniem pozytywnych i negatywnych średnich oraz zakresów kontroli;
- opis stosowanych kryteriów oceny, z uzasadnieniem wyboru punktu(-ów) odcięcia w modelu predykcyjnym;
- odniesienie do kontroli historycznych danych.

Wyniki:

- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych substancji chemicznych dla każdej serii i każdego powtarzalnego pomiaru;
- wskazanie prób kontroli używanych w odniesieniu do bezpośrednich reduktorów MTT i/lub barwiących substancji badanych;
- Opis innych zaobserwowanych skutków.

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

- (1) Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa 2009. Dostępny na stronie: [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 Kwiecień 2009. Dostępny na stronie: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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)? Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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 . Dostępny na stronie: [<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 Kwiecień 2007. Dostępny na stronie: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Dostępny na stronie: [<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. Dostępny na stronie: [<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,

Paryż. Dostępny na stronie:

[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 (luty 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. Dostępny na stronie: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (poddany przeglądowi w marcu 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). Dostępny na stronie: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (luty 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Dostępny na stronie: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: *Practical Contact Dermatitis*, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, Nowy Jork.

(30) Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z dnia 6 sierpnia 2001 r. dostosowująca po raz dwudziesty ósmy do postępu technicznego dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych, Dz.U. L 225 z 21.8.2001, s. 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.

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (9).

Żywotność komórek: parametr określający całkowitą aktywność populacji komórek, np. zdolność dehydrogenaz w mitochondriach komórek do obniżenia zawartości przyżyciowego barwnika MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy, błękit tiazolilowy), który – w zależności od mierzonego punktu końcowego i zastosowanego schematu badania – odpowiada całkowitej liczbie i/lub żywotności żywych komórek.

Zgodność: jest to miara efektywności metody badania w odniesieniu do metod badań, które dają wyniki kategoryczne i jest jednym z aspektów istotności. Określenie jest stosowane wymiennie z określeniem „dokładność”; definiuje się jako odsetek wszystkich badanych substancji chemicznych, które są prawidłowo sklasyfikowane jako pozytywne lub negatywne. (9).

ET₅₀: może być oszacowane przez ustalenie czasu narażenia na działanie potrzebnego do zmniejszenia żywotności komórek o 50 % po zastosowaniu substancji chemicznej pełniącej rolę markera w określonym, stałym stężeniu, zob. również IC₅₀.

UE CLP (rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin): wdraża w Unii Europejskiej (UE) system GHS ONZ służący do celów klasyfikacji i etykietowania chemikaliów (substancje i mieszaniny) (3).

GHS (globalnie zharmonizowany system klasyfikacji i etykietowania chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ)): system proponujący klasyfikację chemikaliów (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz uwzględniający odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich działań niepożądanych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

IC₅₀: może być oszacowane poprzez oznaczanie stężenia, w którym substancja chemiczna pełniąca rolę markera powoduje zmniejszenie żywotności tkanek o 50% (IC₅₀) po stałym czasie narażenia na działanie, zob. również ET₅₀.

Dawka nieograniczona: ilość substancji badanej nakładana na skórę, przekraczająca ilość konieczną do całkowitego, jednolitego pokrycia jej powierzchni.

Badanie naśladowcze: potoczne określenie metody badania, która jest strukturalnie i funkcjonalnie podobna do zwalidowanych i zaakceptowanych zgodnie z referencyjną metodą badania. Taka metoda badania kwalifikowałaby się do wykorzystania jako skrócona metoda walidacji. Zamiennie wykorzystana z podobną metodą badania (9).

Normy efektywności (PS): normy oparte na zwalidowanej metodzie badania, zapewniające podstawę do oceny porównywalności proponowanej metody badania, która jest podobna do metody referencyjnej pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym. Uwzględnia się: (i) istotne elementy metody badania; (ii) podstawowy wykaz chemicznych substancji odniesienia, wybranych spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w celu wykazania akceptowalnej efektywności zwalidowanej metody badania; oraz (iii) podobny poziom dokładności i wiarygodności, na podstawie wyników w uzyskanych dla zwalidowanej metody badania, który proponowana metoda badania powinna osiągnąć przy ocenie z wykorzystaniem podstawowego wykazu chemicznych substancji odniesienia (9).

Chemiczne substancje odniesienia: substancje chemiczne wybrane do wykorzystania w procesie walidacji, dla których reakcje w systemie badań referencyjnych *in vitro*, jak i *in vivo* lub odpowiednie dla badań gatunki są już znane. Te substancje powinny być reprezentatywne dla klas substancji chemicznych, w odniesieniu do których – zgodnie z oczekiwaniami – będzie stosowana dana metoda badawcza i powinny reprezentować pełny zakres reakcji, jakich można się spodziewać po substancjach chemicznych, w odniesieniu do których środek może być stosowany, od reakcji silnych przez słabe aż do negatywnych. Różne zestawy chemicznych substancji odniesienia mogą być wymagane na różnych etapach procesu zatwierdzania, a także w odniesieniu do różnych metod badawczych i zastosowań badania (9).

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne dla konkretnego celu. Jest to zakres, w jakim badanie prawidłowo mierzy lub przewiduje biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badania (9).

Wiarygodność : Miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (9).

Badanie zastępcze: badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń i/lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że zapewnia równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska, odpowiednio, w porównaniu do zaakceptowanego badania, we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych chemikaliów (9).

Czułość: odsetek wszystkich pozytywnych/aktywnych chemikaliów prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

Działanie drażniące na skórę: powodowanie odwracalnego uszkodzenia skóry w wyniku nałożenia na skórę badanej substancji chemicznej na okres do 4 godzin. Działanie drażniące na skórę jest powstającą miejscowo, nieimmunogenną reakcją, która pojawia się wkrótce po stymulacji (29). Jego główną cechą jest odwracalny proces obejmujący reakcje zapalne oraz większość charakterystycznych objawów klinicznych podrażnienia (rumień, obrzęk, świąd i ból) związanych z procesem zapalnym.

Swoistość: odsetek wszystkich negatywnych/nieczynnych badanych chemikaliów prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badania, która

daje wyniki kategoryczne, stanowiąca parametr istotny dla oceny istotności metody badania (9).

Wielopoziomowa strategia badania: Badanie, w którym zastosowano metody badania w sposób sekwencyjny; Decyzje dotyczące wyboru metod badawczych na każdym kolejnym poziomie podejmowane są w oparciu o wyniki uzyskane w poprzednim poziomie badań (9).

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

Dodatek 2

NORMY EFEKTYWNOŚCI DO CELÓW OCENY PROPONOWANYCH PODOBNYCH DO BADAŃ *IN VITRO* Z WYKORZYSTANIEM ZREKONSTRUOWANEGO LUDZKIEGO NASKÓRKA (RhE) LUB ZMODYFIKOWANYCH METOD BADANIA DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ

WSTĘP

1. Normy efektywności (PS) służą przede wszystkim ustaleniu w jaki sposób określić, czy nowe metody badań, zarówno zastrzeżone (tj. chronione prawem autorskim czy znakiem towarowym, zarejestrowane) jak i niezastrzeżone, są wystarczająco dokładne i wiarygodne w odniesieniu do konkretnych celów badawczych. Te normy efektywności, opracowane na podstawie zwalidowanych i zaakceptowanych metod badawczych, mogą być wykorzystane do oceny wiarygodności i dokładności innych podobnych metod (nazywanych potocznie metodami „naśladowczymi”), które opierają się na podobnych zasadach naukowych i mierzą lub przewidują te same skutki biologiczne lub toksyczne (9).
2. Przed przyjęciem zmodyfikowanych metod (tj. proponowanych ewentualnych usprawnień do zatwierdzonej metody badań), należy dokonać oceny w celu określenia wpływu proponowanych zmian na działanie badania oraz zakres, w jakim zmiany takie mają wpływ na informacje dostępne dla innych elementów procesu walidacji. W zależności od liczby i charakteru proponowanych zmian, wygenerowanych danych i towarzyszącej tym zmianom dokumentacji, powinny one być poddawane takiemu samemu procesowi walidacji, jak opisano w odniesieniu do nowego badania, lub, w stosownych przypadkach, ograniczonej ocenie wiarygodności i istotności przy użyciu sprawdzonej normy efektywności (9).
3. Metody podobne (naśladowcze) do którejkolwiek z trzech zwalidowanych metod [EpiSkin™ (zwalidowana metoda referencyjna – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) i SkinEthic™ RHE] lub ich zmodyfikowane wersje zaproponowane do stosowania w ramach niniejszej TM należy poddać ocenie w celu określenia ich wiarygodności i dokładności z wykorzystaniem substancji chemicznych reprezentujących pełny zakres wskaźników podrażnienia wg Draize’a. W ocenie z użyciem 20 zalecanych w normach efektywności chemicznych substancji odniesienia (tabela 1) proponowane lub zmodyfikowane metody powinny mieć wartości wiarygodności i dokładności porównywalne do wykazywanych przez VRM (tabela 2) lub od nich lepsze (2) (16). Wartości wiarygodności i dokładności, które należy osiągnąć, są określone w pkt 8 do 12 niniejszego dodatku. Zostały uwzględnione zarówno chemikalia niezaklasyfikowane (GHS ONZ/UE CLP brak kategorii) jak i zaklasyfikowane (GHS ONZ/UE CLP kategoria 2) (1), reprezentujące różne klasy substancji chemicznych tak, aby można było porównać wiarygodność i dokładność (czułość, swoistość i ogólną dokładność) proponowanej metody do wiarygodności i dokładności VRM. Przed zastosowaniem metody badania do badań nowych substancji badanych należy określić jej wiarygodność, a także zdolność do prawidłowej identyfikacji substancji drażniących należących do kategorii 2 GHS ONZ/UE CLP a także, w zależności od ram regulacyjnych na potrzeby których generowane są dane, jej zdolność do prawidłowej identyfikacji substancji niezaklasyfikowanych do żadnej kategorii w systemie UN GHS/UE CLP (brak kategorii).
4. Niniejsze normy efektywności opierają się na EC-ECVAM PS (8), zaktualizowanej odpowiednio według systemów klasyfikacji i etykietowania GHS ONZ i UE CLP (1) (3). Pierwotnie PS zostały określone po zakończeniu badania walidacyjnego (21) i opracowane w

oparciu o wspólnotowy system klasyfikacji ustanowiony w dyrektywie Komisji 2001/59/WE z dnia 6 sierpnia 2001 r. dostosowującej po raz dwudziesty ósmy do postępu technicznego dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych¹. W związku z przyjęciem systemu GHS ONZ do celów klasyfikacji i etykietowania w UE (UE CLP) (3), jakie miało miejsce w okresie pomiędzy zakończeniem badania walidacyjnego a ukończeniem niniejszej TM, normy efektywności zostały uaktualnione (8). W uaktualnionej wersji zawarto wiele zmian (i) w objętym normami efektywności zestawie chemicznych substancji odniesienia; oraz (ii) w określonych wartościach wiarygodności i dokładności (2) (23).

¹ Dz.U. L 225 z 21.8.2001, s. 1.

NORMY EFEKTYWNOŚCI DLA METOD BADANIA IN VITRO DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ Z WYKORZYSTANIEM RhE

5. Normy efektywności obejmują trzy następujące elementy (9):

- I) Istotne elementy metody badania
- II) Minimalny wykaz chemicznych substancji odniesienia
- III) Zdefiniowane wartości wiarygodności i dokładności

I) Istotne elementy metody badania

6. Obejmują one kluczowe strukturalne, funkcjonalne, i proceduralne elementy metody zwalidowanej, które powinny być zawarte w protokole metody proponowanej, podobnej do metody odniesienia pod względem mechanistycznym i funkcjonalnym, lub zmodyfikowanej jej wersji. Elementy te obejmują wyjątkowe cechy metody, krytyczne szczegóły proceduralne oraz środki kontroli jakości. Przestrzeganie zasadniczych elementów metody badania przyczyni się do zapewnienia, że podobna lub zmodyfikowana proponowana metoda opiera się na tej samej koncepcji, co odpowiadająca im VRM (9). Istotne elementy metody badania zostały szczegółowo opisane w pkt 16 – 21 niniejszej TM a badanie należy wykonywać zgodnie z zaleceniami zawartymi w:

warunkach ogólnych (pkt 16)

warunkach funkcjonalnych, które obejmują:

- żywotność (pkt 17);
- funkcję bariery (pkt 18);
- morfologię (pkt 19);
- odtwarzalność (pkt 20); oraz
- kontrolę jakości (pkt 21)

II) Minimalny wykaz chemicznych substancji odniesienia

7. Chemiczne substancje odniesienia są wykorzystywane do określenia, czy wiarygodność i dokładność proponowanej podobnej lub zmodyfikowanej metody, co do której udowodniono, że jest strukturalnie i funkcjonalnie wystarczająco podobna do VRM, lub stanowi niewielką zmianę jednej z trzech zwalidowanych metod, są porównywalne do wiarygodności i dokładności VRM lub od nich lepsze (2) (8) (16) (23). 20 zalecanych chemicznych substancji odniesienia, które zostały wymienione w tabeli 1, obejmuje chemikalia reprezentujące różne klasy substancji chemicznych (tj. kategorie chemiczne opracowane na podstawie grup funkcjonalnych) i reprezentują pełny zakres wskaźników podrażnienia wg Draize'a (od niedrażniących po silnie drażniące). Chemikalia zawarte w tym wykazie obejmują 10 chemikaliów należących do kategorii 2. systemu GHS ONZ/UE CLP i 10 chemikaliów niezaklasyfikowanych, z których 3 są nieobowiązkowymi chemikaliami z kategorii 3. systemu GHS ONZ. Zgodnie z niniejszą metodą badania opcjonalna kategoria 3. jest uznawana za brak kategorii. Chemikalia wymienione w tabeli 1 zostały wybrane spośród substancji chemicznych wykorzystanych w fazie optymalizacji badania, która nastąpiła po etapie procedur poprzedzających walidację i w badaniu walidacyjnym VRM, w odniesieniu do funkcjonalności chemicznej i stanu fizycznego (14) (18). Te chemiczne substancje odniesienia to minimalna liczba chemikaliów, które powinny być wykorzystane do oceny

dokładności i wiarygodności proponowanej podobnej lub zmodyfikowanej metody, nie powinny jednak być wykorzystywane przy opracowywaniu nowych metod. W sytuacjach, w których wymieniona w wykazie substancja chemiczna jest niedostępna, można wykorzystać inne chemikalia w stosunku do których dysponuje się odpowiednimi danymi referencyjnymi z badań *in vivo*, głównie spośród substancji chemicznych wykorzystywanych w fazie optymalizacji badania, która następuje po etapie procedur poprzedzających walidację lub w badaniu walidacyjnym VRM. W razie potrzeby, aby dodatkowo ocenić dokładność proponowanej metody badania, można dodać do wykazu minimalnego substancji referencyjnych dodatkowe substancje reprezentujące inne klasy chemiczne, dla których są dostępne dostateczne dane referencyjne z badań *in vivo*.

Tabela 1 Minimalny wykaz chemicznych substancji odniesienia, w celu określenia wartości dokładności i wiarygodności dla podobnych lub zmodyfikowanych metod badania działania drażniącego na skórę z wykorzystaniem RhE¹

Chemikalia	Numer CAS	Stan fizyczny	Ocena <i>in vivo</i>	Kat. VRM <i>in vitro</i>	Kat. GHS ONZ/UE CLP <i>in vivo</i>
1-bromo-4-chlorobutan	6940-78-9	Ciecz	0	Kat. 2	Brak kat.
Ftalan dietylu	84-66-2	Ciecz	0	Brak kat.	Brak kat.
Kwas naftylooctowy	86-87-3	Ciało Stałe	0	Brak kat.	Brak kat.
Fenoksyoctan allilu	7493-74-5	Ciecz	0.3	Brak kat.	Brak kat.
Izopropanol	67-63-0	Ciecz	0.3	Brak kat.	Brak kat.
Aldehyd 4-metylo-tio-benzoesowy	3446-89-7	Ciecz	1	Kat. 2	Brak kat.
Stearynian metylu	112-61-8	Ciało Stałe	1	Brak kat.	Brak kat.
Maślan heptylu	5870-93-9	Ciecz	1.7	Brak kat.	Brak kat.
Salicylan heksylu	6259-76-3	Ciecz	2	Brak kat.	Brak kat.
Aldehyd cynamonowy	104-55-2	Ciecz	2	Kat. 2	Brak kat. (nieobowiązkowa kat. 3) ³
<i>1-decanol</i> ²	<i>112-30-1</i>	<i>Ciecz</i>	<i>2.3</i>	<i>Kat. 2</i>	<i>Kat. 2</i>
Aldehyd cyklamenu	103-95-7	Ciecz	2.3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	Ciecz	2.7	Kat. 2	Kat. 2
Chloro wodorek 2-chlorometylo -3,5-dimetylo-4-metoksypirydyny	86604-75-3	Ciało Stałe	2.7	Kat. 2	Kat. 2
<i>Disiarczek di-n-propylu</i> ²	<i>629-19-6</i>	<i>Ciecz</i>	<i>3</i>	<i>Brak kat.</i>	<i>Kat. 2</i>
wodorotlenek potasu (5% roztwór wodny)	1310-58-3	Ciecz	3	Kat. 2	Kat. 2
Benzenotiol, 5-(1,1-dimetyloetylo)-2-metylu	7340-90-1	Ciecz	3.3	Kat. 2	Kat. 2
1-metylo-3-fenyl-1-piperazyna	5271-27-2	Ciało Stałe	3.3	Kat. 2	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	Ciecz	3.4	Kat. 2	Kat. 2
Tetrachloroetylen	127-18-4	Ciecz	4	Kat. 2	Kat. 2

¹ Wybór chemikaliów opiera się na następujących kryteriach: (i) substancje chemiczne są dostępne na rynku; (ii) są reprezentatywne dla pełnego zakresu wskaźników podrażnienia wg Draize'a (od niedrażniących po silnie drażniące); (iii) mają określoną budowę chemiczną; (iv) są reprezentatywne dla funkcjonalności chemicznej wykorzystywanej w procesie walidacji; oraz (v) nie wykazują wysoce toksycznych właściwości (np. nie są rakotwórcze ani toksyczne dla układu rozrodczego) i nie wiążą się z nadmiernymi kosztami usuwania pozostałości.

² Chemikalia, które działają drażniąco na skórę u królika, ale w odniesieniu do których dostępne są wiarygodne dowody na to, że nie wywołują podrażnienia skóry u ludzi (31) (32) (33).

³ W systemie GHS ONZ, lecz nie w UE CLP

III) Zdefiniowane wartości wiarygodności i dokładności

8. Aby określić wiarygodność i istotność proponowanych podobnych lub zmodyfikowanych metod, które mają być przekazywane między laboratoriami, należy zbadać wszystkie 20 chemicznych substancji odniesienia z tabeli 1 w co najmniej trzech laboratoriach. Jednak, gdy proponowana metoda ma być stosowana w jednym laboratorium, wielolaboratoryjne badania nie będą konieczne do walidacji. Ważne jednak, aby takie badania walidacyjne zostały niezależnie ocenione przez uznane na poziomie międzynarodowym organy zatwierdzające, zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi (9). W każdym laboratorium wszystkich 20 chemicznych substancji odniesienia powinno zostać zbadane w trzech niezależnych seriach, wykonanych na tkankach pochodzących z różnych partii i odpowiednio rozłożonych w czasie. Każda seria dla każdej uwzględnionej badanej substancji powinna składać się z przynajmniej trzech równocześnie badanych powtórzeń poddawania tkanek działaniu badanej substancji, NC i PC.

9. Wartości wiarygodności i dokładności proponowanych metod należy obliczyć uwzględniając wszystkie cztery poniższe kryteria i dbając, aby wartości dla wiarygodności i istotności obliczane były w określony i spójny sposób:

1. Jedynie dane z kompletnych sekwencji serii kwalifikują się do obliczenia wewnątrz-laboratoryjnej i między-laboratoryjnej zmienności i możliwości prognozowania (dokładności) metody.
2. Klasyfikację końcową dla każdej chemicznej substancji odniesienia należy wyznaczyć w każdym uczestniczącym laboratorium przy użyciu wartości średniej żywotności w różnych seriach kompletnej sekwencji serii.
3. Jedynie dane uzyskane dla tych substancji chemicznych, dla których przeprowadzono kompletne sekwencje serii we wszystkich uczestniczących laboratoriach kwalifikują się do obliczania zmienności międzylaboratoryjnej metody.
4. Wartości dokładności należy obliczyć na podstawie indywidualnych prognoz laboratoryjnych uzyskanych dla 20 chemicznych substancji odniesienia przez różne uczestniczące laboratoria.

W tym kontekście **sekwencja serii** składa się z trzech niezależnych serii przeprowadzonych przez jedno laboratorium dla jednej badanej substancji. **Kompletna sekwencja serii** to sekwencja serii przeprowadzona przez jedno laboratorium dla jednej badanej substancji w przypadku gdy wszystkie trzy serie są ważne. Oznacza to, że pojedyncza nieważna seria unieważnia całą sekwencję składającą się z trzech serii.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

10. Ocena odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej powinna wykazywać zgodność klasyfikacji (GHS ONZ/UE CLP kategoria 2 i brak kategorii) uzyskanej w różnych,

niezależnych seriach badań 20 chemicznych substancji odniesienia w pojedynczym laboratorium większą lub równą ($\geq$) 90 %.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna

11. Ocena odtwarzalności międzylaboratoryjnej nie jest niezbędna, jeśli proponowana metoda badania ma być stosowana tylko w jednym laboratorium. Aby można było przenosić metody pomiędzy laboratoriami, zgodność klasyfikacji (GHS ONZ/UE CLP kategoria 2 i brak kategorii) uzyskanej w różnych, niezależnych seriach badań 20 chemicznych substancji odniesienia pomiędzy, najkorzystniej, minimalnie trzema laboratoriami powinna być większa lub równa ($\geq$) 80%.

Możliwości prognozowania (dokładność)

12. Dokładność (czułość, swoistość i ogólna dokładność) proponowanej podobnej lub zmodyfikowanej metody powinna być porównywalna do tej uzyskiwanej w VRM lub lepsza, biorąc pod uwagę dodatkowe informacje odnoszące się do istotności u gatunków odpowiednich do badań (tabela 2). Czuość powinna wynosić co najmniej 80% ($\geq$) (2) (8) (23). Jednak do czułości proponowanej metody *in vitro* stosuje się dalsze szczególne ograniczenia: tylko dwie substancje chemiczne kategorii 2 stosowane do badań *in vivo*: *1-Dekanol* i *dwusiarczek di-n-propylu* mogą być nieprawidłowo zaklasyfikowane jako brak kategorii przez więcej niż jedno uczestniczące laboratorium. Swoistość powinna wynosić co najmniej 70% ($\geq$) (2) (8) (23). Nie ma dalszych ograniczeń w odniesieniu do swoistości proponowanej metody *in vitro*, tj. każde uczestniczące laboratorium może nieprawidłowo zaklasyfikować wszelkie substancje chemiczne określane mianem „brak kategorii” wykorzystywane do badań *in vivo*, o ile ostateczna swoistość metody badawczej mieści się w dopuszczalnym zakresie. Ogólna dokładność powinna wynosić co najmniej 75% ($\geq$) (2) (8) (23). Choć czuość VRM obliczona dla 20 chemicznych substancji odniesienia, wymienionych w tabeli 1 jest równa 90%, określoną wartością minimalną czułości, wymaganą aby podobną lub zmodyfikowaną metodę można było uznać za ważną, ustala się na 80%, ponieważ zarówno o *1-Dekanolu* (substancja chemiczna o wartości granicznej) jak i o *dwusiarczku di-n-propylu* (fałszywie negatywny w VRM) wiadomo, że nie powodują podrażnień u ludzi (31) (32) (33), chociaż zostały zidentyfikowane jako drażniące w badaniach na królikach. Z uwagi na fakt, że modele RhE bazują na komórkach pochodzenia ludzkiego, mogą one przewidzieć uznanie tych chemikaliów za niewywierające działania drażniącego (GHS ONZ/UE CLP brak kategorii).

Tabela 2. Przewidywane wartości czułości, swoistości i dokładności ogólnej wymagane aby wszelkie podobne lub zmodyfikowane metody uznać za ważne.

Czułość	Swoistość	Ogólna dokładność
$\geq 80\%$	$\geq 70\%$	$\geq 75\%$

Kryteria dopuszczalności badania

13. Możliwe jest, że jedno lub kilka badań odnoszących się do jednej lub kilku badanych substancji chemicznych nie spełnia kryteriów akceptacji badania dla substancji badanej oraz kontrolnej lub jest nie do przyjęcia z innych powodów. W celu uzupełnienia brakujących danych dla każdej substancji badanej dopuszcza się maksymalnie dwa dodatkowe badania („ponowne badanie”). Dokładniej rzecz ujmując, ponieważ w przypadku ponownego badania

również PC i NC muszą być równolegle poddane badaniom, można przeprowadzić maksymalnie dwie dodatkowe serie dla każdej badanej substancji.

14. Jest możliwe, że nawet po ponownym przebadaniu nie uda się uzyskać minimalnej liczby trzech ważnych serii wymaganych dla każdej badanej substancji w odniesieniu do każdej chemicznej substancji odniesienia w każdym uczestniczącym laboratorium, co skutkowałoby niekompletną siatką danych. W takich przypadkach, aby uznać zestawy danych za akceptowalne, powinny zostać spełnione następujące trzy kryteria:

1. W odniesieniu do wszystkich spośród 20 chemicznych substancji odniesienia powinno się dysponować co najmniej jedną kompletną sekwencją serii.
2. W każdym z co najmniej trzech uczestniczących laboratoriów co najmniej 85 % sekwencji serii powinno być kompletnych (dla 20 chemikaliów: tj. dopuszczalne są 3 nieważne sekwencje serii w jednym laboratorium).
3. Co najmniej 90 % wszystkich możliwych sekwencji serii z co najmniej trzech laboratoriów musi być kompletnych (w odniesieniu do 20 chemikaliów badanych w 3 laboratoriach oznacza to, że dopuszczalnych jest ogółem 6 nieważnych sekwencji serii)."

3. Dodaje się następujące rozdziały:

„ B.49 Badanie mikrojądrowe *in vitro* w komórkach ssaków

WSTĘP

1. Badanie mikrojądrowe *in vitro* (MNvit) jest badaniem genotoksyczności w celu wykrywania mikrojądra (MN) w cytoplazmie komórek w interfazie. Mikrojądra mogą pochodzić odpowiednio z acentrycznych fragmentów chromosomów (tj. nie posiadających centromera), lub z całych chromosomów, które nie są w stanie migrować do biegunów w stadium anafazy podziału komórek. To badanie wykrywa klastogenne i aneugenne działanie chemikaliów (substancji i mieszanin) (1) (2) w komórkach, w których doszło do podziału komórek podczas narażenia na działanie substancji badanej lub po nim. Niniejsza metoda badania (TM) dopuszcza stosowanie protokołów z inhibitorem polimeryzacji aktyny cytochalazyną B (cytoB) i bez niego. Dodanie cytoB przed ukierunkowaną mitozą umożliwia określenie i selektywną analizę częstotliwości występowania mikrojąder w komórkach, które ukończyły jedną mitozę, ponieważ takie komórki są dwujądrowe (3) (4). Niniejsza TM pozwala również na stosowanie protokołów bez blokady cytokinezy, pod warunkiem że istnieją dowody na to, że badana populacja komórek przeszła mitozę.

2. Oprócz badania MNvit wykorzystywanego do identyfikowania chemikaliów (substancji i mieszanin), które powodują powstawanie mikrojąder, informacji na temat mechanizmów uszkodzania chromosomu i formowania mikrojąder mogą dostarczyć również: blokada cytokinezy, immunochemiczne oznaczanie kinetochorów lub hybrydyzacja z sondami centromerowymi/telomerowymi (hybrydyzacja z fluorescencją *in situ* (FISH)) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Procedury oznaczania i hybrydyzacji mogą być wykorzystywane w przypadku, gdy następuje wzrost procesu formowania mikrojąder i badający zamierza ustalić, czy ten wzrost jest skutkiem klastogennych lub aneugennych zdarzeń.

3. Mikrojądra stanowią uszkodzenie, które zostało przekazane do komórek potomnych, podczas gdy aberracje chromosomowe odnotowane w komórkach metafazy mogą nie być przekazywane. Ponieważ mikrojądra w komórkach w stadium interfazy można stosunkowo obiektywnie ocenić, pracownicy laboratorium muszą tylko określić, czy komórki się podzieliły i ile spośród komórek zawiera mikrojądro. W rezultacie preparaty mogą być ocenione względnie szybko a analizy mogą być zautomatyzowane. Badanie staje się wydajniejsze, bo można oceniać tysiące zamiast setek komórek poddanych działaniu. Wreszcie, ponieważ mikrojądra mogą tworzyć się z chromosomów opóźnionych, istnieje możliwość wykrycia czynników wywołujących aneuploidię, które trudno badać w konwencjonalnych badaniach aberracji chromosomalnych np. wytyczna ODCE dotycząca badań nr 473 (rozdział B.10 niniejszego załącznika) (17). Jednak badanie MNvit nie pozwala na różnicowanie chemikaliów wywołujących poliploidalność od tych wywołujących działanie klastogenne bez specjalnych technik, takich jak badanie FISH, opisane w pkt 2.

4. Badanie MNvit jest metodą *in vitro*, w której zazwyczaj wykorzystuje się hodowane komórki ludzkie lub gryzoni. Dostarcza ona kompleksowych podstaw do badania *in vitro* potencjalnego działania powodującego uszkodzenia chromosomowe, ponieważ można wykryć zarówno aneugeny jak i klastogeny.

5. Badanie MNvit jest solidne i skuteczne w odniesieniu do różnych rodzajów komórek, oraz w obecności lub przy braku cytoB. Istnieje dużo danych na poparcie ważności badania MNvit z wykorzystaniem różnych linii komórkowych gryzoni (CHO, V79, CHL/IU i L5178Y) i ludzkich limfocytów (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30), (31). Obejmują one w szczególności międzynarodowe badania walidacyjne koordynowane przez Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) i sprawozdania z International Workshop on Genotoxicity Testing (międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych) (4) (16). Dostępne dane zostały również poddane ponownej ocenie w oparciu o analizę ciężaru dowodów w retrospektywnym badaniu walidacyjnym przez Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) Komisji Europejskiej i metoda badania została zatwierdzona jako naukowo uzasadniona przez naukowy komitet doradczy ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). Opisano wykorzystywanie ludzkich komórek z linii limfoblastoidów TK6 (35), komórek HepG2 (36) (37) i komórek zarodka chomika syryjskiego (38), pomimo że nie zostały one wykorzystane w badaniach walidacyjnych.

DEFINICJE

6. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

UWAGI WSTĘPNE

7. Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogenicznego źródła aktywacji metabolicznej, chyba że komórki są metabolicznie wydolne w odniesieniu do badanych substancji. Egzogeniczny system aktywacji metabolicznej nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć warunków które mogłyby prowadzić do zniekształconych pozytywnych wyników nieodzwierciedlających wewnętrznej mutagenności, a które mogą wynikać ze zmian w pH lub w stężeniu osmolalnym lub być spowodowane przez wysokie poziomy cytotoksyczności (39) (40) (41). Jeśli badana substancja chemiczna powoduje zmianę w pH podłoża w momencie dodania, pH należy dostosować, najlepiej za pomocą buforowania roztworu podstawowego w taki sposób, aby wszystkie objętości we wszystkich badanych stężeniach oraz w odniesieniu do wszystkich kontroli pozostawały takie same.

8. Dla celów analizy indukcji mikrojąder istotne jest aby mitozę miała miejsce zarówno w hodowlach komórkowych poddanych działaniu substancji jak i w niepoddanych temu działaniu. Najpełniejsze informacje w zakresie obliczania mikrojąder można uzyskać na podstawie badań komórek, które ukończyły jedną mitozę w trakcie poddawania działaniu substancji badanej lub po nim.

ZASADA BADANIA

9. Hodowle komórek ludzi lub ssaków są poddawane działaniu substancji badanej zarówno z egzogenicznym źródłem aktywacji metabolicznej jak i bez niego, chyba że wykorzystuje się komórki o odpowiedniej zdolności metabolizowania. Stosowany równolegle rozpuszczalnik/nośnik (VC) i pozytywne substancje kontrolne (PC) są zawarte we wszystkich badaniach.

10. Komórki są hodowane w trakcie narażenia na działanie substancji badanej lub po nim przez okres, w którym uszkodzenia chromosomów lub wrzeczona mogą doprowadzić do tworzenia się mikrojąder w komórkach interfazy. Do indukcji aneuploidii substancja badana powinna zwykle być obecna w trakcie mitozy. Zebrane i zabarwione komórki interfazy są

analizowane pod kątem obecności mikrojąder. W warunkach idealnych do powstania mikrojąder powinno dochodzić jedynie w tych komórkach, które ukończyły mitozę podczas narażenia na substancję badaną lub w okresie po narażeniu, jeżeli jest stosowany. W hodowlach, które były poddane działaniu substancji z blokerem cytokinezy można to osiągnąć poprzez liczenie jedynie komórek dwujądrowych. W przypadku braku blokera cytokinezy ważne jest, aby wykazać, że w poddanych analizie komórkach prawdopodobnie doszło do podziału komórek podczas narażenia na działanie substancji badanej lub po nim. Dla wszystkich protokołów ważne jest, aby wykazać, że proliferacja komórek miała miejsce zarówno w hodowlach kontrolnych jak i w poddanych działaniu substancji, a także należy oszacować zakres cytotoksyczności wywołanej przez substancję lub cytostazy w hodowlach (lub w hodowlach równoległych), które są oceniane pod kątem zawartości mikrojąder.

OPIS BADANIA

Preparaty

11. Można wykorzystywać hodowane podstawowe limfocyty krwi obwodowej ludzi (5) (19) (42) (43) oraz komórki z szeregu linii komórkowych gryzoni takich jak CHO, V79, CHL/IU I L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Stosowanie innych linii komórkowych i typów powinno być uzasadnione na podstawie ich wykazanej efektywności w badaniu, zgodnie z kryteriami dopuszczalności opisanymi w odpowiednim rozdziale. Ponieważ podstawowa częstość występowania mikrojąder będzie miała wpływ na wrażliwość próby, zaleca się wykorzystywanie typów komórek, o niskiej, stałej częstości powstawania mikrojąder.

12. Limfocyty krwi obwodowej ludzi należy uzyskać od młodych (między 18 a 35 rokiem życia), zdrowych, niepalących osób, które ostatnio nie były narażone, o ile wiadomo, na działanie genotoksycznych substancji chemicznych lub na promieniowanie. Jeżeli dla celów stosowania łączy się komórki pochodzące od większej liczby dawców niż jeden, należy określić liczbę dawców. Częstość powstawania mikrojąder wzrasta wraz z wiekiem i tendencja ta jest wyraźniejsza w przypadku kobiet niż mężczyzn (44), dlatego należy to uwzględnić przy wyborze dawców komórek do łącznego poddawania działaniu.

Pożywki i warunki hodowli kultury

13. W utrzymywaniu hodowli powinny być stosowane odpowiednie warunki podłoża hodowli oraz inkubacji (naczynia do hodowli, stężenie CO₂, temperatura oraz wilgotność). Ustanowione linie komórkowe oraz szczepy powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz nieobecności zanieczyszczenia mykoplazmą oraz nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub w przypadku gdy liczba chromosomów uległa zmianie. Powinien być znany normalny czas cykliów komórkowych w warunkach hodowli stosowanej w laboratorium przeprowadzającym badania. Jeżeli stosowana jest metoda z blokerem cytokinezy wówczas stężenie inhibitorów cytokinezy powinno być dostosowane do danego rodzaju komórek oraz należy wykazać, że jest ona w stanie wyprodukować wystarczającą liczbę komórek dwujądrowych dla celów oceny.

Przygotowanie hodowli

14. Ustanowione linie komórkowe oraz szczepy: Komórki są rozmnażane z hodowli podstawowej, siane na podłożu hodowlanym w takiej gęstości, aby hodowle nie zraszały się

w warstwach, a hodowle w zawiesinie nie osiągały nadmiernego zagęszczenia przed czasem pobierania, oraz inkubowane w temperaturze 37°C.

15. Limfocyty: Krew pełną poddaną działaniu antykoagulantu (np. heparyny) lub oddzielone limfocyty hoduje się w obecności mitogenu np. fitohemoaglutyniny (PHA) przed narażeniem na działanie substancji badanej i cytoB.

Aktywacja metaboliczna

16. Zewnątrzpochodny układ metabolizujący należy stosować w przypadku, gdy stosuje się komórki o niewłaściwej wewnątrzpochodnej pojemności metabolicznej. Najbardziej powszechnie wykorzystywanym systemem jest uzupełniana współczynnikami frakcja pomitochondrialna (S9) przygotowana z wątroby gryzoni otrzymujących czynniki pobudzające enzymy takie jak Aroclor 1254 (45) (46) lub kombinacja fenobarbitonu oraz β -nafoflawonu (46) (47) (48) (49). To ostatnie połączenie nie pozostaje w sprzeczności z Konwencją sztokholmską w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (50) i rozporządzeniem (WE) nr 850/2004 dotyczącym trwałych zanieczyszczeń organicznych (66) i okazało się tak skuteczne jak Aroclor 1254 w wywołaniu oksydaz wieloczynnościowych (46) (47) (48) (49). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach o zakresie 1-10% (v/v) w końcowym podłożu badawczym. Warunki systemu aktywacji metabolicznej mogą być uzależnione od klasy badanej substancji chemicznej i w niektórych przypadkach właściwe może okazać się wykorzystanie więcej niż jednego stężenia S9.

17. Genetycznie skonstruowane linie komórkowe oddające szczególne dla ludzi lub gryzoni enzymy aktywujące mogą sprawić, że zewnątrzpochodny system aktywacji metabolicznej stanie się niepotrzebny i mogą być stosowane jako komórki badane. W takich przypadkach wybór wykorzystywanych linii komórkowych powinien być uzasadniony naukowo, np. poprzez istotność oksydaz wieloczynnościowych dla metabolizmu substancji badanej (51) i ich zdolność do reagowania na znane klastogeny i aneugeny (zob. oddzielny rozdział dotyczący kryteriów dopuszczalności). Należy uwzględnić fakt, że badana substancja może nie być metabolizowana przez wyrażoną oksydazę wieloczynnościową; W takim przypadku negatywne wyniki nie wskazują na to, że badana substancja nie może wywołać procesu powstawania mikrojąder.

Preparat substancji badanej

18. Stałe substancje chemiczne należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczyć, jeżeli jest to odpowiednie, zanim komórki zostaną poddane działaniu substancji badanej. Płynne substancje badane mogą być dodawane bezpośrednio do układu badawczego i/lub rozcieńczane przed poddaniem komórek działaniu substancji badanej. Gazy lub lotne substancje chemiczne powinny być badane za pomocą odpowiednich modyfikacji standardowych protokołów, takich jak poddawanie komórek działaniu substancji badanej w szczelnie zamkniętych naczyniach (52) (53). Należy wykorzystywać świeże preparaty substancji badanej, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji

Warunki badania

Rozpuszczalniki/nośniki

19. Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien reagować z substancją badaną, lub uniemożliwiać przeżywania komórek lub utrzymania działania S9 przy wykorzystywanym stężeniu. Jeśli są stosowane inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki (np. woda, podłoże hodowli komórkowych, sulfotlenek dimetylu), ich stosowanie powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność z substancją badaną oraz brak ich toksyczności genetycznej. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

Wykorzystanie cytoB jako blokera cytokinezy

20. Jedną z najistotniejszych kwestii w wykonywaniu badania MNvit jest zapewnienie, że oceniane komórki zakończyły mitozę podczas poddania działaniu substancji badanej lub w okresie po poddaniu, jeżeli jest stosowany. CytoB to czynnik, który był powszechnie stosowany do blokowania cytokinezy ponieważ hamuje on polimeryzację aktyny, a tym samym zapobiega oddzielaniu komórek potomnych po mitozie, doprowadzając do tworzenia komórek dwujądrowych (5) (54) (55). Z tego względu liczenie mikrojąder można ograniczyć do komórek, które przeszły mitozę w trakcie ich poddawania działaniu substancji badanej lub po nim. Wpływ substancji badanej na kinetykę proliferacji komórek może być mierzony jednocześnie. CytoB powinno być wykorzystywane jako blocker cytokinezy w przypadku gdy są stosowane ludzkie limfocyty, ponieważ czas cyklu komórkowego będzie różny dla różnych hodowli i różnych dawców oraz ze względu na to, że nie wszystkie limfocyty będą reagować na PHA. Inne metody zostały wykorzystane podczas badania linii komórkowych, aby ustalić, czy oceniane komórki się podzieliły; zostały one omówione poniżej (zob. pkt 26).

21. Laboratorium powinno określić odpowiednie stężenie cytoB dla każdego rodzaju komórek do osiągnięcia optymalnej częstości powstawania komórek dwujądrowych w hodowlach kontrolnych z wykorzystaniem rozpuszczalnika/nośnika. Odpowiednie stężenie cytoB zwykle wynosi między 3 i 6 $\mu\text{g/ml}$.

Pomiar proliferacji komórek i cytotoksyczności oraz wybór stężeń narażenia

22. Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji, które ma być badane, należy unikać stężeń, które mogą dawać zniekształcone pozytywne wyniki, takich jak te, które powodują nadmierną cytotoksyczność, opad w podłożu hodowlanym i znaczne zmiany pH lub osmolalności (39) (40) (41).

23. Dokonuje się pomiaru proliferacji komórek aby upewnić się, że komórki poddane działaniu substancji przeszły mitozę podczas badania, oraz, że poddawanie działaniu substancji jest prowadzone na odpowiednim poziomie cytotoksyczności (zob. pkt 29). Cytotoksyczność powinna być oznaczana z aktywacją metaboliczną oraz bez niej w komórkach wymagających aktywacji metabolicznej, z wykorzystaniem względnego wzrostu liczby komórek (RICC) lub względnego podwojenia populacji (RPD) (zob. wzory w dodatku 2), chyba że wykorzystuje się cytoB. Gdy wykorzystuje się cytoB, cytotoksyczność można określić wykorzystując wskaźnik replikacji (RI) (zob. wzór w dodatku 2).

24. Poddawanie działaniu substancji badanej hodowli z cytoB i pomiar względnych częstości występowania komórek jednojądrowych, dwujądrowych i wielojądrowych w

hodowli składają się na metodę dokładnego ilościowego określania wpływu na proliferację komórek i działanie cytotoksyczne lub cytostatyczne substancji badanej (5) oraz zapewnia, że liczone są jedynie komórki, w których dokonał się podział podczas poddawania działaniu substancji badanej lub po nim.

25. W badaniach z cytoB, cytostatyczność/cytotoksyczność można określić ilościowo na podstawie wskaźnika proliferacji blokera cytokinezy (CBPI) (5) (26) (56) lub można ją uzyskać z RI dla co najmniej 500 komórek na hodowlę (zob. wzory w dodatku 2). Gdy wykorzystuje się cytoB do oceny proliferacji komórek, należy określić CBPI lub RI na podstawie co najmniej 500 komórek na hodowlę. Pomiaru te, między innymi, można wykorzystać do oszacowania cytotoksyczności przez porównanie wartości w hodowlach, które zostały poddane działaniu substancji badanej oraz w hodowlach kontrolnych. Ocena innych markerów cytotoksyczności (np. zrastanie się, liczba komórek, apoptoza, martwica, liczenie metafaz) może dostarczyć użytecznych informacji.

26. W badaniach bez cytoB, należy wykazać, że w ocenianych komórkach w hodowli dokonał się podział podczas poddawania działaniu substancji badanej lub po nim, inaczej można otrzymać fałszywie ujemne reakcje. Wśród metod, które zostały wykorzystane dla zapewnienia, że oceniane są komórki po podziale można wyliczyć włączenie i późniejsze wykrywanie bromodeoksyurydyny (BrdU) w celu identyfikacji odtworzonych komórek (57), tworzenie się klonów, gdy komórki z trwałych linii komórkowych są poddawane działaniu i oceniane *in situ* na szkiełku mikroskopowym (wskaźnik proliferacji (PI)) (25) (26) (27) (28) lub pomiar względnego podwojenia populacji (RPD) czy względnego wzrostu liczby komórek (RICC) lub inne sprawdzone metody (16) (56) (58) (59) (zob. wzory w dodatku 2). Ocena innych markerów cytotoksyczności lub cytostazy (np. zrastanie się, liczba komórek, apoptoza, martwica, liczenie metafaz) może dostarczyć użytecznych informacji.

27. Co najmniej trzy nadające się do analizy stężenia badanej substancji powinny zostać poddane ocenie. Aby to osiągnąć, konieczne może okazać się przeprowadzenie doświadczenia z wykorzystaniem większej liczby stężeń o niewielkiej rozpiętości pomiędzy nimi i przeanalizowanie powstawania mikrojąder w tych stężeniach, przy zapewnieniu odpowiedniego zakresu cytotoksyczności. Alternatywnym sposobem postępowania jest wstępne zbadanie cytotoksyczności w celu ograniczenia zakresu ostatecznych badań.

28. Najwyższe stężenie powinno mieć na celu spowodowanie $55 \pm 5\%$ cytotoksyczności. Wyższe poziomy mogą powodować uszkodzenie chromosomu jako drugorzędny skutek cytotoksyczności (60). W przypadku gdy pojawia się cytotoksyczność, wybrane stężenia badanej substancji powinny obejmować zakres od stężenia powodującego $55 \pm 5\%$ cytotoksyczności do stężenia wywołującego niewielką cytotoksyczność lub jej brak.

29. Jeżeli nie występuje ani cytotoksyczność, ani opad, najwyższe stężenie badanej substancji powinno odpowiadać 0,01 M, 5 mg/mL lub 5 µl/mL, w zależności od tego, które ze stężeń jest najniższe. Stężenia wybrane do analizy powinny w zasadzie być rozdzielone o nie więcej niż 10. W przypadku substancji badanych, które wykazują gwałtowny wzrost krzywej stężenie-reakcja, konieczne może okazać się zmniejszenie rozpiętości pomiędzy stężeniami substancji badanej, tak aby możliwa była również ocena hodowli o umiarkowanych i niskich zakresach toksyczności

30. Gdy czynnikiem ograniczającym jest rozpuszczalność, maksymalnym stężeniem, jeśli nie jest ono ograniczone przez cytotoksyczność, powinno być najniższe stężenie, przy którym widoczny jest minimalny opad w hodowlach, pod warunkiem że nie istnieją żadne

zakłócenia oceny. Oceny opadu należy dokonać za pomocą metod takich jak mikroskopia świetlna, obserwując opad, który utrzymuje się lub pojawia podczas hodowli (pod koniec poddawania działaniu substancji badanej).

Kontrole

31. Równoległe kontrole pozytywne i kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej powinny zostać uwzględnione w każdym doświadczeniu.

32. PC są potrzebne, aby wykazać zdolność komórek, a także protokołu badań, do rozpoznawania klastogenów i aneugenów oraz aby potwierdzić zdolność metaboliczną preparatu S9. PC powinna wykorzystywać znane czynniki wywołujące powstawanie mikrojąder w stężeniach od których oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu poza tło, i wykazywać czułość systemu. Stężenia pozytywnych kontroli powinny zostać wybrane tak, aby skutki były jasne, ale by badającemu nie ujawniały bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek laboratoryjnych.

33. Klastogen, który wymaga aktywacji metabolicznej (np. cyklofosfamid; benzo[a]piren) powinien być wykorzystany by wykazać zarówno wydolność metaboliczną jak i zdolność systemu badania do wykrywania klastogenów. Można użyć innych PC, jeśli jest to uzasadnione. Jako że niektóre wymagające aktywacji metabolicznej PC mogą działać bez egzogenicznej aktywacji metabolicznej w pewnych warunkach poddawania działaniu substancji badanej lub w niektórych liniach komórkowych, potrzeba aktywacji metabolicznej i działania preparatu S9 powinny zostać zbadane w wybranej linii komórkowej i w wybranych stężeniach.

34. W chwili obecnej nie są znane anaugeny wymagające aktywacji metabolicznej dla ich działania genotoksycznego (16). Obecnie przyjęte PC w odniesieniu do działania aneugenicznego to, na przykład, kolchicina i winblastyna. Inne substancje chemiczne mogą być wykorzystane, o ile powodują powstawanie mikrojąder wyłącznie lub przede wszystkim poprzez działanie aneugeniczne. Aby uniknąć konieczności stosowania dwóch PC (na klastogenność i aneugenność) bez aktywacji metabolicznej, kontrola aneugenności może służyć jako PC bez S9, a kontrola klastogenności może być stosowana do badania adekwatności stosowanego systemu aktywacji metabolicznej. PC zarówno na klastogenność i aneugenność powinny być wykorzystywane w komórkach, które nie wymagają stosowania S9. Zalecane PC są zawarte w dodatku 3.

35. Wykorzystanie PC powiązanych z klasą chemiczną może być brane pod uwagę, jeżeli są dostępne odpowiednie substancje chemiczne. Wszystkie PC powinny być właściwe dla rodzaju komórki oraz warunków aktywacji.

36. Kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika powinny zostać włączone w ramach każdego okresu pobierania hodowli. Ponadto, NC niepoddane działaniu substancji badanej (brak rozpuszczalnika/nośnika) powinny być również wykorzystywane, chyba że istnieją opublikowane lub historyczne laboratoryjne dane dotyczące kontroli wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik w zastosowanych stężeniach nie powoduje szkodliwych skutków.

PROCEDURA BADANIA

Harmonogram poddawania działaniu substancji

37. Aby zmaksymalizować prawdopodobieństwo wykrycia aneugenu lub klastogenu oddziałującego na określonym etapie cyklu komórkowego, ważne jest, by wystarczającą liczbę komórek poddać działaniu substancji badanej na wszystkich etapach ich cykli komórkowych. Harmonogram poddawania działaniu substancji linii komórkowych i hodowli komórek podstawowych różni się nieznacznie od harmonogramu stosowanego w odniesieniu do limfocytów, które wymagają stymulacji mitogenicznej do rozpoczęcia cyklu komórkowego i o których mowa w pkt 41-43 (16).

38. Teoretyczne rozważania wraz z opublikowanymi danymi (18) wskazują na to, że większość aneugenów i klastogenów wykrywa się na skutek poddawania działaniu substancji przez krótki okres czasu, od 3 do 6 godzin, w obecności S9 i przy jej braku, po czym usuwa się badaną substancję i pozostawia na okres wzrostu trwający 1,5 – 2,0 cykli komórkowych (6). Próbkę komórek pobiera się w czasie równoważnym zwykłej (tj. takiej jak w momencie niepoddawania działaniu substancji) długości cyklu komórkowego pomnożonej przez 1,5-2,0 po rozpoczęciu lub na końcu poddawania działaniu substancji (zob. tabela 1). Okres pobierania próbek i odzyskiwania może zostać przedłużony, jeżeli wiadomo lub podejrzewa się, że substancja badana ma wpływ na szybkość cyklu komórek (np. gdy bada się nukleozydowe substancje analogiczne).

39. Ze względu na potencjalne działanie cytotoksyczne preparatu S9 na hodowane komórki ssaków, przedłużone narażenie na działanie substancji badanej o długości 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych stosuje się tylko w nieobecności S9. W przypadku przedłużonego poddawania działaniu substancji istnieją możliwości poddawania komórek działaniu substancji badanej w obecności cytoB lub bez cytoB. Z tych opcji można korzystać w sytuacjach, w których może istnieć niepewność co do możliwych reakcji między substancją badaną a cytoB.

40. Proponowane harmonogramy poddawania komórek działaniu substancji przedstawiono w tabeli 1. Te ogólne harmonogramy poddawania działaniu substancji mogą ulec zmianie w zależności od stabilności i reaktywności substancji badanej lub określonych właściwości wzrostowych danych komórek. Poddawanie działaniu substancji należy rozpocząć i zakończyć w momencie wykładniczego wzrostu komórek. Harmonogramy te przedstawiono bardziej szczegółowo poniżej w pkt 41-47.

Tabela 1. Czas poddawania komórek działaniu substancji i czas pobierania hodowli w badaniu MNvit

Limfocyty, komórki podstawowe i linie komórkowe poddane działaniu cytoB	+ S9	Poddawać działaniu przez 3-6 godzin w obecności S9; usunąć S9 oraz podłoże poddania działaniu; dodać świeże podłoże i cytoB; pobierać 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych później.
---	------	---

	– S9 Krótkie narażeni e na działani e	Poddawać działaniu substancji przez 3-6 godzin; usunąć podłoże poddawania działaniu; dodać świeże podłoże i cytoB; pobierać 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych później.
	– S9 przedłuż one narażeni e na działani e	<u>Wariant A</u> : Poddawać działaniu substancji przez 1,5 – 2 zwykłych cykli komórkowych w obecności cytoB; pobierać pod koniec okresu narażenia. <u>Wariant B</u> : Poddawać działaniu substancji przez 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych; usunąć substancję badaną; dodać świeże podłoże i cytoB; pobierać 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych później.
Linie komórkowe poddawane działaniu substancji <u>bez</u> cytoB (identyczne z przedstawionymi powyżej harmonogramami poddawania działaniu substancji, z tym wyjątkiem, że nie zostało dodane cytoB)		

Limfocyty, komórki podstawowe i linie komórkowe poddane działaniu cytoB

41. Najbardziej skutecznym podejściem w odniesieniu do limfocytów jest rozpoczęcie narażenia na działanie substancji badanej na 44-48 godzin po stymulacji PHA, kiedy przestanie dochodzić do synchronizacji cykli (5). W badaniu początkowym, komórki są poddawane działaniu substancji badanej przez 3 do 6 godzin w obecności S9 i przy jej braku. Usuwa się podłoże poddawania działaniu i zastępuje świeżym podłożem zawierającym cytoB, a komórki są pobierane 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych później.

42. Jeżeli obydwa początkowe badania polegające na krótkotrwałym (3-6 godzin) poddaniu działaniu substancji są negatywne lub niejednoznaczne, stosuje się przedłużone narażenie na działanie bez S9. Istnieją dwie opcje poddawania działaniu i obie są równie akceptowalne. Jednakże może okazać się bardziej stosowne stosowanie opcji A w odniesieniu do pobudzonych limfocytów wówczas gdy wzrost wykładniczy może maleć w 96 godzin po stymulacji. Ponadto hodowle komórek, które nie osiągnęły stanu przegęszczenia w chwili końcowego pobierania prób w wariantcie B.

- Wariant A: komórki są poddawane działaniu substancji badanej przez 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych i pobierane po zakończeniu poddawania działaniu.
- Wariant B: komórki są poddawane działaniu substancji badanej przez 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych. Podłoże poddawania działaniu substancji jest usuwane i zastępowane świeżym podłożem, a komórki są pobierane po przeprowadzeniu dodatkowych 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych.

43. Komórki podstawowe i linie komórkowe należy poddawać działaniu w sposób podobny do limfocytów, z wyjątkiem tego, że nie trzeba stymulować ich za pomocą PHA przez 44-48 godzin. Komórki inne niż limfocyty powinny być narażone na działanie w taki sposób, żeby pod koniec badania komórki nadal były w logarytmicznej fazie wzrostu.

Linie komórkowe bez cytoB

44. Komórki powinny być poddawane działaniu substancji przez 3-6 godzin w obecności S9 i przy jej braku. Usuwa się podłoże poddania działaniu i zastępuje świeżym podłożem, a komórki są pobierane 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych później.

45. Jeżeli obydwa początkowe badania polegające na krótkotrwałym (3-6 godzin) poddaniu działania substancji są negatywne lub niejednoznaczne, stosuje się przedłużone narażenie na działanie (bez S9). Istnieją dwie opcje poddawania działaniu i obie są równie akceptowalne:

- Wariant A: komórki są poddawane działaniu substancji badanej przez 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych i pobierane po zakończeniu poddawania działaniu.
- Wariant B: komórki są poddawane działaniu substancji badanej przez 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych. Podłoże poddania działaniu substancji jest usuwane i zastępowane świeżym podłożem, a komórki są pobierane po przeprowadzeniu dodatkowych 1,5 – 2,0 zwykłych cykli komórkowych.

46. W monowarstwach mogą być obecne komórki mitotyczne (można je rozpoznać po okrągłym kształcie i fackie, że oddzielają się od powierzchni) pod koniec 3-6 godzin poddawania działaniu substancji. Z uwagi na łatwość oddzielania się, komórki mitotyczne mogą zostać utracone w momencie gdy usuwane jest podłoże zawierające badaną substancję. Należy zadbać o to, by zostały pobrane w momencie mycia hodowli i zwrócone do hodowli aby uniknąć w momencie pobierania utraty komórek, które są w trakcie mitozy i w których może dochodzić do powstawania mikrojąder.

Liczba hodowli

47. Hodowle reprodukcyjne powinny być stosowane dla każdego stężenia substancji badanej oraz w odniesieniu do hodowli z wykorzystaniem rozpuszczalnika/nośnika oraz negatywnych hodowli kontrolnych. Gdy można wykazać minimalne zmiany między hodowlami reprodukcyjnymi na podstawie historycznych danych laboratoryjnych dopuszczalne jest wykorzystanie pojedynczych hodowli. Jeżeli wykorzystywane są pojedyncze hodowle, zalecane jest zbadanie większej liczby stężeń.

Pobieranie komórek i przygotowywanie szkiełek mikroskopowych

48. Każdą kulturę pobiera się oddzielnie i oddzielnie poddaje działaniu substancji. Przygotowanie komórek może obejmować hipotoniczne przetwarzanie komórek, ale etap ten nie jest konieczny, jeśli komórki rozprowadzono odpowiednio w inny sposób. Można wykorzystać różne techniki do przygotowania szkiełka, pod warunkiem że uzyskuje się wysokiej jakości preparaty komórkowe do celów oceny. Cytoplazmę komórek należy zachować w celu umożliwienia wykrycia mikrojąder oraz (w metodzie z wykorzystaniem blokera cytokinezy) przeprowadzenia wiarygodnej identyfikacji komórek dwujądrowych.

49. Szkiełka można barwić przy użyciu różnych metod, takich jak Giemsa lub fluorescencyjne szczególne barwniki DNA (59). Wykorzystanie szczególnego barwnika DNA (np. oranż akrydynowy (61) lub Hoechst 33258 plus pyronina-Y (62)) może wyeliminować niektóre spośród artefaktów związanych z barwnikiem nie nadającym się do szczególnego szczepu DNA. W celu określenia treści mikrojądra (chromosom/fragment chromosomu) można zastosować przeciwciała antykinetochorowe, FISH z wykorzystaniem pancentromerycznych sond DNA lub syntezę *in situ* przy udziale startera ze starterami szczególnymi dla pancentromerów, wraz z odpowiednim barwieniem kontrastowym DNA, jeżeli informacje dotyczące mechanizmu ich powstawania są przedmiotem zainteresowania (15) (16). Inne metody rozróżnienia między klastogenami i aneugenami mogą być wykorzystane, o ile okazały się skuteczne.

Analiza

50. Wszystkie szkiełka mikroskopowe, włącznie z tymi z rozpuszczalnikami/nośnikami i tymi dotyczącymi kontroli, powinny być niezależnie kodowane przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej. Alternatywnie, kodowane próbki mogą być analizowane przy pomocy zatwierdzonej automatycznej cytometrii przepływowej lub analizy obrazowej.

51. W hodowlach poddanych działaniu cytoB częstość powstawania mikrojąder powinna być analizowana w co najmniej 2000 komórek dwujądrowych przypadających na stężenie (co najmniej 1000 komórek dwujądrowych na hodowlę; dwie hodowle na stężenie). Jeżeli wykorzystywane są pojedyncze hodowle, przynajmniej 2000 komórek dwujądrowych przypadających na stężenie powinno być oceniane z danej hodowli. Jeżeli dostępnych do celów oceny jest zasadniczo mniej niż 1000 komórek dwujądrowych przypadających na hodowlę lub 2000 w przypadku hodowli pojedynczej na każde stężenie oraz jeżeli nie wykryto znacznego wzrostu liczby mikrojąder, należy powtórzyć badanie stosując więcej komórek lub mniej toksyczne stężenia, w zależności od tego, co bardziej właściwe. Należy zwrócić uwagę, by nie oceniać komórek dwujądrowych o nieregularnych kształtach lub w przypadku, gdy dwa jądra różnią się znacznie pod względem wielkości; nie należy również mylić komórek dwujądrowych ze źle rozproszonymi komórkami wielojądrowymi. Komórki zawierające więcej niż dwa jądra główne nie powinny być analizowane pod kątem zawartości mikrojąder, ponieważ podstawowa częstość powstawania mikrojąder może być wyższa w tych komórkach (63) (64). Ocena komórek wielojądrowych jest dopuszczalna, jeżeli wykazano, że substancja badana zakłóca działanie cytoB.

52. W liniach komórkowych badanych bez poddawania działaniu cytoB, mikrojądra powinny być oceniane w przynajmniej 2000 komórkach dla każdego stężenia (przynajmniej 1000 komórek na hodowlę; dwie hodowle na stężenie). W przypadku, gdy jest stosowana tylko jedna hodowla na stężenie, przynajmniej 2000 komórek powinno zostać ocenione z tej hodowli.

53. Gdy jest stosowane cytoB należy określić CBPI lub RI aby ocenić proliferację komórek (zob. dodatek 2), używając co najmniej 500 komórek na hodowlę. Jeśli poddawanie działaniu odbywa się przy nieobecności cytoB, konieczne jest uzyskanie dowodów, że oceniane komórki podległy proliferacji, jak omówiono w pkt 24-27.

Kryteria dopuszczalności

54. Laboratorium, w którym proponuje się wykonanie badania MNvit opisanego w niniejszej TM powinno wykazać, że jest w stanie w sposób wiarygodny i dokładny wykrywać

substancje chemiczne o znanym działaniu aneugennym i klastogennym, z aktywacją metaboliczną jak i bez niej, jak również znane negatywne chemikalia, wykorzystując substancje chemiczne odniesienia wymienione w dodatku 3. Jako dowód zdolności do wykonania niniejszej TM prawidłowo laboratorium powinno przedstawić dane świadczące o tym, że komórki oceniane pod kątem tworzenia mikrojąder ukończyły jeden jądrowy podział gdy badanie przeprowadza się bez użycia cytoB.

55. Chemikalia wymienione w dodatku 3 są zalecane do stosowania jako chemiczne substancje odniesienia. Można dodać zastępcze lub dodatkowe substancje chemiczne, jeśli ich działanie jest znane oraz jeśli powodują one powstawanie mikrojąder za pomocą takich samych mechanizmów działania, a także jeśli wykazano, że są odpowiednie dla chemikaliów, które będą badane przy wykorzystaniu procedury MNvit. Uzasadnienie mogłoby obejmować badanie walidacyjne z wykorzystaniem wielu różnorodnych substancji lub skoncentrowane na mniejszej ich liczbie na podstawie klasy chemicznej substancji badanej lub mechanizmu uszkodzania.

56. Kontrole z wykorzystaniem rozpuszczalnika/nośnika i niepoddane działaniu hodowle powinny dawać w rezultacie odtwarzalnie niską i stałą częstość powstawania mikrojąder (zazwyczaj 5-25 mikrojądra/1000 komórek dla rodzajów komórek określonych w pkt 11). Inne rodzaje komórek mogą mieć różne zakresy reakcji, które należy ustalić podczas walidowania ich dla celów wykorzystania w badaniu MNvit. Należy wykorzystać dane z kontroli negatywnych, z wykorzystaniem rozpuszczalnika oraz kontroli pozytywnych w celu ustalenia historycznych zakresów kontroli. Wartości te należy wykorzystać do ustalenia adekwatności równoczesnych NC/PC dla celów eksperymentu.

57. Jeżeli proponuje się wprowadzenie nieznacznych zmian do badania (np. wykorzystanie automatycznych raczej niż ręcznych technik oceny, zastosowanie nowego rodzaju komórek), wówczas należy wykazać skuteczność zmiany, zanim zmieniony protokół zostanie uznany za możliwy do stosowania. Wykazanie skuteczności obejmuje udowodnienie, że można wykryć główne mechanizmy uszkodzania chromosomów oraz zyski lub straty, oraz, że odpowiednie pozytywne i negatywne wyniki można osiągnąć w odniesieniu do klasy danej substancji, lub wielu substancji, które mają być badane.

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Opracowanie wyników

58. Jeżeli zastosowano technikę z blokerem cytokinezy, do oceny mechanizmu indukcji mikrojąder stosowane są jedynie komórki dwujądrowe z mikrojądrami (niezależnie od liczby mikrojąder przypadających na komórkę). Ocena liczby komórek z jednym, dwoma lub większą liczbą mikrojąder może dostarczyć użytecznych informacji, ale nie jest obowiązkowa.

59. Należy określić równoczesne pomiary cytotoksyczności oraz/lub cytostazy w odniesieniu do wszystkich poddanych działaniu substancji hodowli oraz hodowli kontrolnych z wykorzystaniem rozpuszczalnika/nośnika (58). Należy obliczyć CBPI lub RI dla wszystkich poddanych działaniu substancji hodowli oraz hodowli kontrolnych w charakterze pomiaru opóźnienia cyklu komórkowego, kiedy stosowana jest metoda z blokerem cytokinezy. W przypadku braku cytoB, powinny być zastosowane RPD lub RICC lub PI (zob. dodatek 2).

60. Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych hodowli. Dodatkowo wszelkie dane powinny być podsumowane w formie tabelarycznej.

61. Substancje chemiczne powodujące w badaniu MNvit powstawanie mikrojąder mogą doprowadzać do niego na skutek tego, że powodują uszkodzenia chromosomów czy ich utratę lub na skutek połączenia tych dwóch zjawisk. Dalsze analizy z wykorzystaniem przeciwciał anty-kinetochorowych, sond szczególnych dla centromerów *in situ* lub innych metod mogą służyć do określania, czy mechanizm indukcji mikrojąder jest spowodowany działaniem klastogennym czy aneugennym.

Ocena i interpretacja wyników

62. Nie istnieje wymóg sprawdzania przez dodatkowe badanie wyraźnie pozytywnych lub negatywnych reakcji. Niejednoznaczne wyniki mogą być wyjaśniane w drodze analizy kolejnych 1000 komórek z wszystkich hodowli, aby uniknąć strat związanych utratą anonimowości próby. Jeśli takie podejście nie przesądzi o wyniku, należy przeprowadzić dalsze badania. Modyfikacja parametrów badawczych w celu poszerzenia zakresu ocenionych warunków powinna zostać rozważona w dalszych doświadczeniach, jeśli to stosowne. Parametry badawcze, które mogą być zmodyfikowane obejmują zakres stężenia, terminy poddawania działaniu substancji i pobierania komórek i/lub warunki aktywacji metabolicznej.

63. Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany ze stężeniem wzrost lub statystycznie istotny wzrost w liczbie komórek zawierających mikrojądra. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Uwzględnienie, czy zaobserwowane wartości są w obrębie historycznych zakresów kontroli czy też poza nimi może stanowić wskazówkę przy ocenie biologicznego znaczenia reakcji. Można wykorzystać odpowiednie metody statystyczne jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (65). Jednakże wyniki badań statystycznych powinny być oceniane w odniesieniu do zależności dawka-reakcja. Należy również wziąć pod uwagę odtwarzalność oraz dane historyczne.

64. Choć większość eksperymentów przyniesie wyraźnie pozytywne lub negatywne wyniki, w niektórych przypadkach uzyskane dane uniemożliwią dokonanie ostatecznego osądu o działaniu badanej substancji. Tego rodzaju niejednoznaczne lub sporne wyniki można uzyskiwać niezależnie od tego ile razy powtarza się doświadczenie.

65. Wyniki pozytywne z badania MNvit wskazują, że substancja badana wywołuje uszkodzenia chromosomów lub ich utratę w hodowlanych komórkach ssaków. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych, substancja badana nie wywołuje uszkodzeń w chromosomach i/lub zysków lub strat chromosomów w hodowlanych komórkach ssaków.

Sprawozdanie z badania

66. Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Badana substancja chemiczna:

- dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services oraz numer WE;

- stan skupienia i czystość;
- właściwości fizykochemiczne istotne dla przeprowadzenia badania;
- reaktywność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku lub w hodowli komórkowej mediów;

Rozpuszczalnik/nośnik:

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika;
- rozpuszczalność oraz stabilność substancji badanej w rozpuszczalniku/nośniku;

Komórki:

- typ i źródło wykorzystywanych komórek;
- odpowiedniość wykorzystywanych komórek;
- nieobecność mykoplazmy, jeżeli ma zastosowanie;
- informacja dotycząca długości cyklu komórkowego, czasu podwojenia lub indeksu proliferacji;
- jeżeli stosuje się limfocyty, płeć, wiek, liczbę dawców krwi, jeśli ma to zastosowanie;
- jeżeli stosuje się limfocyty - informacja o tym, czy narażona jest krew pełna czy wydzielone limfocyty;
- liczba przejść, jeżeli ma zastosowanie;
- metoda utrzymania hodowli komórek, jeżeli ma zastosowanie;
- zmienna liczba chromosomów;
- zwykła (kontrola ujemna) długość cyklu komórkowego;

Warunki badania:

- dane identyfikacyjne substancji blokującej cytokinę (np. cytoB), o ile jest wykorzystywana i jej stężenie oraz czas narażenia komórek;
- racjonalne uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby hodowli, w tym np. dane dotyczące cytotoxyczności oraz ograniczeń rozpuszczalności, jeżeli są dostępne;
- skład podłoża, stężenie CO₂, jeżeli ma zastosowanie,
- stężenia substancji badanej;
- stężenia (i/lub objętość) nośnika oraz dodanej substancji badanej;

- temperatura i czas inkubacji;
- czas trwania poddania działaniu substancji;
- okres pobierania po poddaniu działaniu;
- gęstość komórki w czasie osadzania, jeżeli właściwe;
- rodzaj oraz skład systemu aktywacji metabolicznej, w tym kryteria dopuszczalności;
- substancje chemiczne kontroli pozytywnych i kontrole negatywne;
- metody przygotowania szkiełek mikroskopowych oraz stosowane techniki barwienia;
- kryteria identyfikacji mikrojąder;
- liczba poddanych analizie komórek;
- metody pomiaru cytotoksyczności;
- wszelkie dodatkowe informacje dotyczące cytotoksyczności;
- kryteria uznawania badań za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne;
- stosowana(-e) metoda (-y) analizy statystycznej;
- metody, takie jak wykorzystanie przeciwciał kinetochorowych, stosowane w celu określenia czy mikrojądra zawierają całe lub rozdrobnione chromosomy, jeśli ma to zastosowanie;

Wyniki:

- zastosowany pomiar cytotoksyczności, np. CBPI lub RI w przypadku metody z wykorzystaniem blokera cytokinezy; RICC, RPD lub PI gdy nie były wykorzystywane metody z wykorzystaniem blokera cytokinezy; inne uwagi w stosownych przypadkach, np. zranienie się komórek, apoptoza, martwica, liczenie metafaz, częstotliwość występowania komórek dwujądrowych;
- oznaki strącania;
- dane dotyczące pH oraz osmolalności podłoża poddania działaniu substancji, jeżeli są określone;
- definicja komórek dopuszczalnych do celów analizy;
- dystrybucja jedno-, dwu- i wielojądrowych komórek, jeżeli stosowana jest metoda z wykorzystaniem blokera cytokinezy;
- liczba komórek z mikrojądrami, podana oddzielnie dla każdej hodowli poddanej działaniu substancji i hodowli kontrolnej, wraz z informacją, czy to z komórek jedno- czy dwujądrowych, w stosownych przypadkach;

- zależność stężenie-reakcja, o ile to możliwe;
- dane dotyczące substancji chemicznej stosowanej jako równoczesna negatywna (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywna kontrola (stężenia i rozpuszczalniki);
- historyczne dane dotyczące substancji chemicznej stosowanej jako równoczesna negatywna (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywna kontrola, wraz z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami i przedziałem ufności (np. 95%);
- analiza statystyczna; wartości p jeśli istnieją;

Omówienie wyników

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

- (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, Paryż. Dostępny na stronie: [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. 25. konferencja ESAC, 16-17 listopada, 2006 r., dostępny na stronie: [<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, dostępne na stronie: [<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 r.), Konwencja Sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępny na stronie: [<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*. Nowy Jork, 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. Nowy Jork, NY, pp. 463-467.
- (66) Rozporządzenie (WE) nr 850/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. dotyczące trwałych zanieczyszczeń organicznych i zmieniające dyrektywę 79/117/EWG, Dz.U. L 229 z 30.4.2004, s. 5.

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneugen: każda substancja lub proces, który poprzez reakcję z elementami mitotycznego i mejotycznego cyklu podziału komórek prowadzi do aneuploidii w komórkach lub organizmach.

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie (-ach) chromosomów (poliploidalność).

Apoptoza: zaprogramowana śmierć komórki na którą składa się szereg etapów prowadzących do rozpadu komórek w cząstki otoczone błoną, które są następnie eliminowane przez fagocytozę lub wydalanie.

Proliferacja komórek: wzrost liczby komórek powstały w wyniku mitotycznego podziału komórek.

Centromer: region DNA chromosomu, w którym obydwie chromatydy się łączą i do którego są przyczepione obydwa kinetochory, jeden obok drugiego.

Klastogen: każda substancja lub proces, który powoduje strukturalne aberracje chromosomalne w populacjach komórek lub organizmów.

Cytokineza: proces podziału komórki następujący bezpośrednio po mitozie, mający na celu utworzenie dwóch komórek potomnych, z których każda zawiera jedno jądro.

Wskaźnik proliferacji blokera cytokinezy (CBPI): odsetek komórek w trakcie drugiego podziału w populacji poddanej działaniu substancji w stosunku do hodowli kontrolnej nie poddawanej działaniu (zob. dodatek 2).

Cytostaza: hamowanie wzrostu komórek (zob. wzór w dodatku 2).

Cytotoksyczność: szkodliwe skutki dla struktury lub funkcji komórek, ostatecznie powodujące śmierć komórki.

Genotoksyczny: *termin ogólny, obejmujący wszystkie rodzaje uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym przerwy, przegrupowania adduktów, mutacje, aberracje chromosomowe i aneuploidię. Nie wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.*

Komórki w interfazie: komórki nie w fazie mitozy.

Kinetochor: struktura zawierająca białko na centromerze chromosomu, do której przyczepiają się włókna wrzeciona kariokinetycznego w trakcie podziału komórki, umożliwiając uporządkowane przemieszczanie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Mikrojądra: małe jądra, oddzielone oraz występujące dodatkowo w stosunku do jądra głównego komórek, wytwarzane w trakcie telofazy mitozy lub mejozy przez opóźnione fragmenty chromosomów lub całe chromosomy.

Mitoza: podział jądra komórkowego, na który zazwyczaj składają się profaza, prometafaza, metafaza, anafaza i telofaza.

Indeks mitotyczny: stosunek komórek w metafazie podzielony przez całkowitą liczbę komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji komórek tej populacji.

Mutagenny: tworzy dziedziczne zmiany w sekwencji (-ach) pary zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Nondysjunkcja: nierozdzielenie się pary chromatyd i brak odpowiedniego ich rozdziału do komórek potomnych, w wyniku czego powstają komórki potomne z nieprawidłową liczbą chromosomów.

Poliploidalność: liczbowe aberracje chromosomowe w komórkach lub organizmach, obejmujące cały zestaw (-y) chromosomów, a nie pojedyncze chromosomy (aneuploidia).

Wskaźnik proliferacji (PI): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytoB (zob. wzór w dodatku 2).

Względny wzrost liczby komórek (RICC): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytoB (zob. wzór w dodatku 2).

Względne podwojenie populacji (RPD): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytoB (zob. wzór w dodatku 2).

Wskaźnik replikacji (RI): odsetek zakończonych cykli podziału komórkowego w hodowli poddanej działaniu substancji w stosunku do hodowli kontrolnej nie poddawanej działaniu, podczas okresu narażenia i odzysku (zob. wzór w dodatku 2).

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

Dodatek 2

WZORY DO CELÓW OCENY CYTOTOKSYCZNOŚCI

1. **Kiedy stosuje się cytoB** ocena cytotoxyczności powinna opierać się na **wskaźniku proliferacji blokera cytokinezy (CBPI)** lub **wskaźniku replikacji (RI)** (16) (58). CBPI określa średnią liczbę cykli komórkowych przypadających na komórkę w okresie narażenia na cytoB i może być wykorzystane do obliczenia proliferacji komórek. RI określa względną liczbę jąder w hodowlach poddawanych działaniu substancji w stosunku do hodowli kontrolnych i może być wykorzystane do obliczenia % cytostazy:

$$\% \text{ cytostazy} = 100 - 100 \{ (CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1) \}$$

oraz

T = hodowla poddana działaniu substancji badanej

C = nośnik kultury kontrolnej

gdzie:

$$CBPI = \frac{(\text{liczba komórek jednojądrowych}) + (2 \times \text{liczba komórek dwujądrowych}) + (3 \times \text{liczba komórek wielojądrowych})}{(\text{całkowita liczba komórek})}$$

Dlatego też wartość CBPI równa 1 (wszystkie komórki są jednojądrowe) jest równoważna 100% cytostazy.

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

$$RI = \frac{(\text{liczba komórek dwujądrowych}) + (2 \times \text{liczba komórek wielojądrowych}) \div (\text{całkowita liczba komórek})_T}{(\text{liczba komórek dwujądrowych}) + (2 \times \text{liczba komórek wielojądrowych}) \div (\text{całkowita liczba komórek})_C} \times 100$$

T = hodowle poddawane działaniu substancji

C = hodowle kontrolne

2. Tym samym wartość RI równa 53% oznacza, że w porównaniu do liczby komórek, które podzieliły się i utworzyły komórki dwu- i wielojądrowe w hodowli kontrolnej, jedynie 53% tej liczby podzieliło się w hodowli poddanej działaniu, czyli cytostaza wynosi 47 %.

3. Kiedy nie stosuje się cytoB, zaleca się przeprowadzenie oceny cytotoksyczności w oparciu o **względny wzrost liczby komórek (RICC)** lub **względne podwojenie populacji (RPD)** (58), ponieważ oba te wskaźniki uwzględniają odsetek populacji komórek, które się podzieliły.

(wzrost liczby komórek w hodowlach poddanych działaniu substancji (liczba końcowa – liczba początkowa))

$$\text{RICC} = \frac{\text{wzrost liczby komórek w hodowlach poddanych działaniu substancji (liczba końcowa – liczba początkowa)}}{\text{wzrost liczby komórek w hodowlach kontrolnych (liczba końcowa – liczba początkowa)}} \times 100$$

(liczba podwojeń populacji w hodowlach poddanych działaniu substancji)

$$\text{RPD} = \frac{\text{liczba podwojeń populacji w hodowlach poddanych działaniu substancji}}{\text{liczba podwojeń populacji w hodowlach kontrolnych}} \times 100$$

gdzie:

Podwojenie populacji = $[\log(\text{liczby komórek po poddaniu działaniu} \div \text{początkowa liczba komórek})] \div \log 2$

4. Dlatego też RICC lub RPD równe 53% oznacza 47% cytotoksyczności/cytostazy.

5. Stosując **wskaźnik proliferacji (PI)**, można dokonać oceny cytotoksyczności poprzez liczenie klonów składających się z 1 komórki (c11), 2 komórek (c12), 3 – 4 komórek (c14) i 5 do 8 komórek (c18)

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

6. PI został wykorzystany jako cenny i wiarygodny parametr cytotoksyczności również w przypadku linii komórkowych hodowanych *in situ* w nieobecności cytoB (25) (26) (27) (28).

Dodatek 3

CHEMICZNE SUBSTANCJE ODNIESIENIA ZALECANE DLA OCENY EFEKTYWNOŚCI¹

Kategoria	Chemikalia	Nr CAS	Nr WE
1. Klastogeny czynne bez aktywacji metabolicznej			
	Arabinozyd cytozyny	147-94-4	205-705-9
	Mitomycyna C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogeny wymagające aktywacji metabolicznej			
	Benzo(a)piren	50-32-8	200-028-5
	Cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeny			
	Kolchicyna	64-86-8	200-598-5
	Winblastyna	143-67-9	205-606-0
4. Substancje negatywne			
	ftalan di(2-etyloheksylu)	117-81-7	204-211-0
	Kwas nalidyksowy	389-08-2	206-864-7
	Piren	129-00-0	204-927-3
	Chlorek sodu	7647-14-5	231-598-3

¹. Substancje chemiczne odniesienia są chemikaliami zalecanymi do stosowania. Zastąpienie lub dodanie substancji chemicznych do wykazu chemicznych substancji odniesienia może nastąpić, jeśli wiadomo, że ich działanie powoduje powstawanie mikrojąder w wyniku takich samych mechanizmów działania, i jeśli wykazano, że są odpowiednie dla chemikaliów, które będą badane przy wykorzystaniu procedury MN_{vit}. W zależności od celu, uzasadnienie mogłoby obejmować badanie walidacyjne z wykorzystaniem wielu różnorodnych substancji lub skoncentrowane na mniejszej ich liczbie na podstawie klasy chemicznej substancji badanej lub mechanizmu uszkodzenia.

B0,50 Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych DA

WSTĘP

1. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów i metody badań UE są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi, oraz troską o dobrostan zwierząt. Pierwsza metoda badania (TM) (B.42) przy określaniu działania uczulającego na skórę u myszy - badanie lokalnych węzłów chłonnych (LLNA; Wytyczna OECD 429 dotycząca badań) została poddana przeglądowi (1). Szczegóły walidacji LLNA i przegląd powiązanej bibliografii opublikowano w (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). W LLNA radioizotopy tymidyny lub jodyny są stosowane do pomiaru proliferacji limfocytów i w związku z tym badanie ma ograniczone zastosowanie w przypadku, gdy nabycie, zastosowanie lub usuwanie promieniotwórczości jest problematyczne. Badanie LLNA: DA (opracowane przez Daicel Chemical Industries, Ltd.) jest niepromieniotwórczym wariantem badania LLNA, dzięki któremu, poprzez wykorzystanie bioluminescencji, udaje się dokonać pomiaru ilościowego zawartości adenylozotrifosforanu (ATP), służącego za wskaźnik proliferacji limfocytów. Badanie LLNA DA została zatwierdzona i poddana przeglądowi oraz zalecona przez międzynarodowy panel ds. wzajemnych przeglądów jako przydatna do rozpoznawania chemikaliów uczulających skórę i jej nieuczulających, z pewnymi zastrzeżeniami (10) (11) (12) (13). Ta TM jest zaprojektowana dla celów oceny potencjału uczulenia skóry przez chemikalia (substancje i mieszaniny) u zwierząt. Rozdział B.6 niniejszego załącznika oraz wytyczna OECD dotycząca badań nr 406 wykorzystują badania na świnkach morskich, w szczególności test maksymalizacji na śwince morskiej oraz test Buehlera (14). metoda LLNA (rozdział B.42 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 429) oraz jej dwa niepromieniotwórcze warianty: LLNA: DA (rozdział B.50 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 A) oraz LLNA: BrdU-ELISA (rozdział B.51 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 B) zapewniają bardziej ograniczone i udoskonalone wykorzystanie zwierząt w porównaniu do badań na świnkach morskich opisanych w B.6 i w wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (14).

2. Podobnie jak metoda LLNA, LLNA: DA bada fazę indukcyjną uczulenia skóry i dostarcza danych ilościowych odpowiednich dla dokonania oceny dawka-reakcja. Ponadto, zdolność do wykrywania substancji działających uczulająco na skórę bez konieczności korzystania z izotopowego oznaczania DNA eliminuje możliwość narażenia zawodowego na działanie promieniotwórcze oraz kwestie związane z usuwaniem odpadów. To z kolei może pozwolić na zwiększone wykorzystanie myszy w celu wykrycia substancji działających uczulająco na skórę, co może doprowadzić do dalszego ograniczenia stosowania świnek morskich do badania odporności na działanie uczulające na skórę (tj. B6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (14).

DEFINICJE

3. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. LLNA: DA to zmodyfikowana metoda LLNA do wykrywania chemikaliów potencjalnie uczulających skórę, ze szczególnymi ograniczeniami. Nie oznacza to, że należy koniecznie we wszystkich przypadkach stosować LLNA: DA zamiast LLNA lub badań na

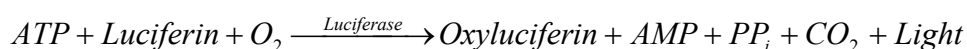
świnie morskiej (tj. B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (14), a tylko, że badanie to ma tę samą wartość merytoryczną i może zostać zastosowane jako badanie alternatywne, którego pozytywne lub negatywne wyniki nie wymagają już dalszego potwierdzenia (10) (11). Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę chemiczną badanej substancji; jej właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* badanej substancji i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie pokrewnych substancji chemicznych. Należy uwzględnić te informacje przy określaniu, czy metoda LLNA: DA jest odpowiednia do badania danej substancji (z uwagi na niekompatybilność niektórych rodzajów chemikaliów z metodą LLNA DA [zob. pkt 5] oraz przy wyborze dawki.

5. Będąc metodą *in vivo* LLNA: DA nie eliminuje wykorzystania zwierząt w określaniu alergicznego kontaktowego działania uczulającego. Może ona jednak ograniczyć stosowanie zwierząt do tego celu w porównaniu z badaniami na świnkach morskich (B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (14). Co więcej, LLNA oferuje znacznie bardziej wyrafinowany sposób wykorzystywania zwierząt (mniej bólu i cierpienia) do badania alergicznego kontaktowego działania uczulającego, gdyż w odróżnieniu od B.6 i wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 metoda DA nie wymaga wywoływania reakcji nadwrażliwości skóry poprzez prowokację. Pomimo zalet LLNA: DA i jej przewagi nad B.6 i wytyczną OECD dotyczącą badań nr 406 (14), istnieją pewne ograniczenia, które mogą spowodować konieczność wykorzystania B.6 lub wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (np. badanie niektórych metali, fałszywe wyniki pozytywne w przypadku niektórych środków drażniących skórę [takich jak niektóre substancje powierzchniowo czynne] (6) (1 oraz rozdział B.42 w niniejszym załączniku), rozpuszczalność badanej substancji). Ponadto klasy chemiczne lub substancje zawierające grupy funkcjonalne co do których wykazano, że działają jako potencjalne czynniki zakłócające (16), mogą wymagać użycia badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotyczącej badań nr 406 (14)). Zalecono stosowanie ograniczeń wskazanych w LLNA (1 oraz rozdział B.42 w niniejszym załączniku) również w odniesieniu do LLNA: DA (10). Ponadto wykorzystanie LLNA: DA może okazać się nieodpowiednie w przypadku badania substancji, które wpływają na poziom ATP (np. substancji działających jako inhibitory ATP) lub tych, które wpływają na pomiar międzykomórkowego ATP (np. z uwagi na obecność enzymów rozkładających ATP, obecność międzykomórkowego ATP w węzle chłonnym). Oprócz tych zidentyfikowanych przypadków metoda LLNA: DA powinna być odpowiednia do badania wszelkich substancji, chyba że istnieją właściwości związane z tymi substancjami, które mogą wpływać na dokładność badania LLNA: DA. Ponadto należy uwzględnić możliwość otrzymania pozytywnych wyników granicznych gdy wartości wskaźnika stymulacji (SI) kształtują się pomiędzy 1,8 a 2,5 (zob. pkt 31-32). Opiera się to na bazie danych uzyskanej przy zatwierdzaniu 44 substancji z wykorzystaniem $SI \geq 1,8$ (zob. pkt 6), gdzie za pomocą LLNA: DA poprawnie zidentyfikowano wszystkie 32 LLNA substancje uczulające, lecz niewłaściwie oznaczono trzy z 12 LLNA substancji nieuczulających o wartościach SI pomiędzy 1,8 i 2,5 (tj. graniczne wartości dodatnie) (10). Jednak w związku z tym, że ten sam zestaw danych był stosowany do ustalania wartości SI i obliczania przewidywalnych właściwości badania, przytoczone wyniki mogą być zawyżonym szacunkiem prawdziwych przewidywalnych właściwości.

ZASADA METODY BADANIA

6. Podstawową zasadą u podłoża LLNA: DA jest fakt, że czynniki uczulające wywołują proliferację limfocytów w węzle chłonnym odprowadzającym limfę z miejsca przyłożenia

środka chemicznego. Ta proliferacja jest proporcjonalna do zastosowanej dawki oraz potencjału zastosowanego alergenu i jest prostym środkiem uzyskania ilościowego pomiaru uczulenia. Proliferacja jest mierzona przez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej otrzymującej nośnik (VC). Określa się stosunek średniej proliferacji w każdej grupie poddanej działaniu środka do średniej proliferacji w równoległej grupie VC, który jest nazywany wskaźnikiem stymulacji (SI) i powinien wynosić $\geq 1,8$ zanim substancja badana zostanie zaklasyfikowana jako potencjalny czynnik uczulający skórę. Procedury opisane w niniejszym dokumencie są oparte na wykorzystaniu pomiaru zawartości ATP na podstawie bioluminescencji (o której wiadomo, że jest zgodna z liczbą żywych komórek) (17) do wykrycia zwiększonej liczby rozmnażających się wegetatywnie komórek w odprowadzających usznych węzłach chłonnych (18) (19). Metoda z wykorzystaniem bioluminescencji posługuje się enzymem lucyferazy do katalizowania zjawiska powstawania światła z ATP i lucyferyny zgodnie z następującą reakcją:



Natężenie emitowanego światła jest liniowo powiązane ze stężeniem ATP i mierzy się je za pomocą luminometra. Badanie z wykorzystaniem lucyferyny-lucyferazy jest czułą metodą ilościowego pomiaru ATP wykorzystywaną w szerokim wachlarzu zastosowań (20).

OPIS BADANIA

Dobór gatunków zwierząt

7. Mysz jest gatunkiem preferowanym do tego badania. Badania walidacyjne dla LLNA: DA były przeprowadzane wyłącznie na szczepie CBA/J, który z tego względu uznaje się za szczep preferowany (12) (13). Wykorzystuje się młode dorosłe samice myszy, które są nieródkami i nie są w ciąży. Na początku doświadczenia samice powinny mieć 8-12 tygodni, a zróżnicowanie mas ciała poszczególnych zwierząt powinno być minimalne i nie przekraczać 20% średniej masy ciała. Można ewentualnie wykorzystać inne szczepy i samce, jeżeli dysponuje się danymi świadczącymi o tym, że nie istnieją znaczące różnice w reakcji na LLNA: DA w zależności od szczepu i/lub płci.

Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie

8. Myszy powinny być trzymane w grupach (21), chyba że istnieją odpowiednie naukowe przesłanki dla trzymania myszy pojedynczo. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30% i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70% poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50-60%. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Przygotowanie zwierząt

9. Zwierzęta wybierane są losowo i znakowane w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację (ale nie przez jakiekolwiek znaki na uszach) i trzymane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem dawkowania w celu umożliwienia zaaklimatyzowania

do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem podawania bada się wszystkie zwierzęta w celu upewnienia się, że nie mają żadnych zauważalnych zmian skórnych.

Przygotowanie roztworów dozujących

10. Stałe substancje powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, przed zastosowaniem na uchu myszy. Chemikalia płynne można zastosować czyste lub rozcieńczone przed dawkowaniem. Chemikalia nierozpuszczalne, takie jak te najczęściej spotykane w wyrobach medycznych, należy poddać przesadnej ekstrakcji w odpowiednim rozpuszczalniku w celu wykrycia wszystkich możliwych do wyekstrahowania składników do badania przed zastosowaniem na uchu myszy. Substancje badane należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Sprawdzenie wiarygodności

11. Pozytywne substancje kontrolne (PC) wykorzystuje się do wykazania właściwego działania badania poprzez ich reakcję z odpowiednią i powtarzalną czułością na badaną substancję uczulającą, dla której wielkość reakcji jest dobrze scharakteryzowana. Włączanie równoległej PC jest zalecane, ponieważ potwierdza się w ten sposób kompetencje laboratorium do skutecznego przeprowadzenia każdego badania i umożliwia dokonanie oceny odtwarzalności i porównywalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej. Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać także PC dla każdego badania i w związku z tym zachęca się użytkowników do konsultacji z właściwymi organami przed rozpoczęciem LLNA: DA. Odpowiednio zaleca się rutynowe wykorzystywanie równoległej PC, aby uniknąć potrzeby dodatkowych badań na zwierzętach do spełnienia tych wymagań, które mogą powstać w związku ze stosowaniem okresowej PC (zob. pkt 12). PC powinna dać w teście LLNA: DA reakcję pozytywną na poziomie narażenia, przy którym oczekuje się wzrostu wskaźnika stymulacji ($SI \geq 1,8$ większego niż w grupie kontroli negatywnej (NC)). Dawkę PC należy dobrać w taki sposób, by nie powodować nadmiernego podrażnienia skóry lub ogólnoustrojowej toksyczności a indukcja była powtarzalna, ale nie nadmierna (tj. $SI > 10$ byłyby uznane za zbyt wysokie). Preferowane PC to 25% aldehyd cynamonowy heksylu (Chemical Abstracts Service [CAS] nr 101-86-0) i 25% eugenol (numer CAS 97-53-0) w acetonie: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v). Mogą zaistnieć okoliczności, w których można użyć innych PC spełniających powyższe kryteria, pod warunkiem, że istnieje po temu odpowiednie uzasadnienie.

12. Pomimo że zaleca się włączenie równoległej grupy PC, mogą zaistnieć sytuacje, w których okresowe badanie PC (tj. w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy) może okazać się wystarczające w przypadku laboratoriów, które regularnie przeprowadzają badanie LLNA: DA (tj. przeprowadzają badanie LLNA: DA co najmniej raz na miesiąc) i dysponują wcześniejszymi danymi z pozytywnych kontroli, świadczącymi o tym, że laboratorium jest w stanie uzyskiwać odtwarzalne i dokładne wyniki w pozytywnych kontrolach. Można wykazać odpowiedni poziom biegłości w wykonywaniu badania LLNA: DA uzyskując stałe pozytywne wyniki PC w co najmniej 10 niezależnych badaniach przeprowadzonych w rozsądnym terminie (tj. w okresie krótszym niż rok).

13. Należy zawsze włączać równoległą grupę PC, jeśli zachodzi proceduralna zmiana w LLNA: DA (np. zmiana przeszkolonego personelu, zmiany w metodzie badania materiałów i/lub odczynników, zmiany w metodzie badania urządzenia, zmiana źródła badanych zwierząt), a przedmiotowe zmiany powinny być udokumentowane w laboratoryjnych

sprawozdaniach. Należy zwrócić uwagę na wpływ tych zmian na odpowiedniość ustalonych wcześniej danych przy określaniu konieczności zgromadzenia nowej bazy danych aby udokumentować spójność wyników PC.

14. Badacze powinni być świadomi, że decyzja o przeprowadzeniu badania PC na zasadzie okresowej zamiast równoległej wywiera wpływ na odpowiedniość i akceptowalność negatywnych wyników badań uzyskanych bez równoległej PC w okresie pomiędzy każdym okresowym badaniem PC. Na przykład, jeżeli w okresowych PC uzyskany zostaje wynik fałszywie negatywny, negatywne wyniki substancji badanej uzyskane w okresie między ostatnim dopuszczalnym okresowym badaniem PC i niedopuszczalnym okresowym badaniem PC mogą być kwestionowane. Należy dokładnie rozważyć tego rodzaju skutki przy podejmowaniu decyzji czy należy włączyć równoległą PC czy tylko przeprowadzać PC na zasadzie okresowej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość wykorzystania mniejszej liczby zwierząt w ramach grupy równoległej PC, jeżeli jest to naukowo uzasadnione, oraz jeżeli laboratorium może wykazać, w oparciu o wcześniej zgromadzone dane, że można wykorzystać mniejszą liczbę myszy (22).

15. Choć substancja kontroli pozytywnej powinna być testowana w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje konsekwentną reakcję (np. aceton: oliwa z oliwek; w proporcji objętościowej 4:1, v/v), mogą jednak zaistnieć pewne sytuacje wynikające z przepisów, w których przetestowanie w niestandardowym nośniku (o formulacji odpowiedniej klinicznie/chemicznie) może być również konieczne (23). Jeżeli równoległą PC jest badana w innym nośniku niż substancja badana, wówczas należy włączyć oddzielną VC w odniesieniu do równoległej PC.

16. W przypadkach, gdy ocenia się substancje badane konkretnej klasy chemicznej lub zakres reakcji, substancje wzorcowe mogą być użyteczne także aby wykazać, że metoda badawcza jest odpowiednia dla wykrywania potencjalnego działania uczulającego na skórę przez tego rodzaju substancje. Odpowiednie substancje wzorcowe powinny posiadać następujące właściwości:

- strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do klasy badanej substancji;
- znane właściwości fizyczne i chemiczne;
- dane potwierdzające z LLNA: DA;
- dane potwierdzające z innych modeli zwierzęcych i/lub ludzkich.

PROCEDURA BADANIA

Liczba zwierząt i poziomy dawek

17. W każdej grupie dawkowania powinny być wykorzystane nie mniej niż cztery zwierzęta, z minimalną liczbą trzech stężeń substancji badanej oraz równoległą grupą NC otrzymującą jedynie nośnik substancji badanej i grupą kontrolną PC (równoległą lub najnowszą, na podstawie polityki laboratoryjnej, biorąc pod uwagę pkt 11-15). Należy rozważyć zbadanie wielu dawek PC, szczególnie gdy badanie PC jest prowadzone na zasadzie nieregularnej. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grup kontrolnych należy się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grup badanych.

18. Dobór dawek i wybór nośnika powinien być oparty na zaleceniach podanych w pozycjach (2) i (24) bibliografii. Kolejne dawki zazwyczaj wybiera się z odpowiedniego szeregu stężeń takich jak 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, itd. Do wyboru szeregu stężeń należy dołączyć odpowiednie naukowe uzasadnienie. O ile są dostępne, należy uwzględnić wszystkie istniejące informacje toksykologiczne (np. o ostrej toksyczności i o podrażnieniu skóry) oraz o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach badanej substancji (i/lub substancji zbliżonych pod względem budowy) przy wyborze trzech kolejnych stężeń, tak aby najwyższe stężenie maksymalizowało narażenie nie doprowadzając jednak do ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry (24) (25). W przypadku braku takich informacji, może okazać się konieczne przeprowadzenie badania wstępnego (zob. pkt 21-24)

19. Nośnik nie powinien zakłócać wyniku badania lub wpływać na niego oraz powinien być wybrany na podstawie maksymalizowania rozpuszczalności w celu uzyskania najwyższego osiągalnego stężenia, dając jednocześnie możliwość uzyskania roztworu/zawiesiny nadającej się do podania substancji badanej. Zalecanymi nośnikami są aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v), N,N-dimetyloformamid, metylo etylo keton, glikol propylenowy i sulfotlenek dimetylowy (6), ale mogą być użyte inne, jeśli przedstawi się wystarczające uzasadnienie naukowe. W niektórych sytuacjach może okazać się konieczne użycie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika odpowiedniego ze względów klinicznych, lub postaci handlowej, w której badana substancja wprowadzana jest na rynek. Szczególną uwagę należy zwrócić na zapewnienie, aby substancje hydrofilne zostały włączone do systemu nośnika, który nawilża skórę i nie spływa z niej natychmiast, przez włączenie odpowiednich środków zwiększających rozpuszczalność (np. 1% Pluronic® L92). A zatem należy unikać roztworów całkowicie wodnych.

20. Przetwarzanie węzłów chłonnych z poszczególnych myszy umożliwia ocenę zmienności pomiędzy zwierzętami oraz statystyczne porównanie różnicy między substancją badaną i pomiarami grupy VC (zob. pkt 33). Ponadto dokonanie oceny możliwości obniżenia liczby myszy w grupie PC jest wykonalne jedynie wówczas, gdy gromadzone są dane dotyczące poszczególnych zwierząt (22). Co więcej niektóre organy regulacyjne wymagają zbierania danych dotyczących poszczególnych zwierząt. Regularne gromadzenie danych dotyczących poszczególnych zwierząt stanowi o dobrostanie zwierząt dzięki temu, że unika się powielania badań, do którego dochodziłoby w przypadku, gdyby wyniki dotyczące substancji badanej pierwotnie zebrane w jeden sposób (np. poprzez połączenie danych dotyczących zwierząt) miały zostać rozpatrzone w późniejszym terminie przez organy regulacyjne zgodnie z innymi wymogami (np. w ramach danych dotyczących poszczególnych zwierząt).

Badanie wstępne

21. W przypadku braku informacji pozwalającej określić najwyższą dawkę, jaka ma zostać zbadana (zob. pkt 18), należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego poziomu dawki do badania w metodzie LLNA: DA. Celem badania wstępnego jest opracowanie wytycznych dotyczących wyboru maksymalnej dawki jaką należy stosować w głównym badaniu LLNA: DA, w przypadku gdy nie dysponuje się informacjami na temat stężenia powodującego toksyczność ogólnoustrojową (zob. pkt 24) i/lub nadmierne miejscowe podrażnienie skóry (zob. pkt 23). Maksymalny poziom badanej dawki powinien

wynosić 100% substancji badanej w przypadku cieczy lub maksymalne możliwe stężenie w przypadku ciał stałych lub zawiesin.

22. Badanie wstępne przeprowadza się w warunkach identycznych do tych, w jakich przeprowadza się główne badanie LLNA: DA, z tym że nie przeprowadza się oceny proliferacji węzła chłonnego oraz można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt w grupie dawkowania. Zaleca się jedno lub dwa zwierzęta w grupie dawkowania. Wszystkie myszy będą obserwowane codziennie pod kątem jakichkolwiek klinicznych oznak toksyczności ogólnoustrojowej lub miejscowego podrażnienia skóry w miejscu zastosowania. Masy ciała są rejestrowane przed badaniem i przed jego zakończeniem (dzień 8.). Obydwoje uszu każdej myszy bada się pod kątem wystąpienia rumienia i ocenia przy wykorzystaniu tabeli 1 (25). Pomiary grubości ucha są przeprowadzane przy wykorzystaniu grubościomierza (np. cyfrowych mikrometrów lub grubościomierza Peacock Dial) w dniu 1. (przed podaniem substancji), w dniu 3. (około 48 godzin następujących po podaniu pierwszej dawki) oraz w dniu 7. (24 godziny przed zakończeniem badania) i dniu 8. Ponadto, w dniu 8. grubość ucha można określić za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy, co powinno być przeprowadzone po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Nadmierne miejscowe podrażnienie skóry jest sygnalizowane przez rumień o wyniku ≥ 3 i/lub zwiększenie grubości ucha o $\geq 25\%$ w dniu pomiaru (26) (27). Najwyższa dawka wybrana do głównego badania LLNA: DA to następna niższa dawka w szeregu stężeń badania wstępnego (zob. pkt 18), która nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry.

Tabela 1 Wyniki dotyczące rumienia

Objawy	Wynik
Brak rumienia	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)	1
Wyraźny rumień	2
Rumień umiarkowany do mocnego	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację rumienia	4

23. Oprócz 25% zwiększenia grubości ucha (26) (27), do zidentyfikowania substancji drażniących w metodzie LLNA wykorzystywano też statystycznie istotne zwiększenie grubości ucha u myszy badanych w porównaniu do myszy kontrolnych (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). O ile jednak statystycznie znaczące zwiększenie może wystąpić przy grubości ucha mniejszej niż 25%, to nie udało się go powiązać z nadmiernym podrażnieniem (30) (31) (32) (33) (34).

24. Następujące obserwacje kliniczne mogą wskazywać na toksyczność ogólnoustrojową (35), jeśli są wykorzystywane jako część zintegrowanej oceny i w związku z tym mogą określać maksymalne dawki do stosowania w LLNA: DA: zmiany w funkcjach układu nerwowego (np. piloerekcja, ataksja, drżenia, oraz konwulsje); zmiany w zachowaniu (na przykład agresja, zmiany w czyszczeniu, wyraźna zmiana w poziomie aktywności); zmiany w sposobie oddychania (np. zmiany w częstotliwości i intensywności oddychania, takie jak duszność, dyszenie oraz rzęzenie) a także zmiany w konsumpcji żywności i wody. Ponadto w

ocenie należy wziąć pod uwagę oznaki stanów zwiększonej senności i/lub brak reakcji oraz wszelkie objawy kliniczne sygnalizujące coś więcej niż chwilowy ból i cierpienie, lub >5% spadek masy ciała od dnia 1. do dnia 8. czy śmiertelność. Zwierzęta konające oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu i zagrożenia należy humanitarnie uśmiercić (36).

Harmonogram doświadczalny głównego badania

25. Harmonogram doświadczalny badania jest następujący:

- Dzień 1:

indywidualnie określić i odnotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Nałożyć 1% roztworu wodnego dodecylo siarczanu sodu (SLS) na część grzbietową każdego ucha przy użyciu pędzla zanurzonego w roztworze SLS, tak aby cała grzbietowa część każdego ucha została pokryta za pomocą czterech do pięciu pociągnięć pędzla. Po godzinie od momentu podania SLS nakłada się 25 µl właściwego roztworu substancji badanej lub samego nośnika lub kontroli pozytywnej (równoległej lub najnowszej, na podstawie polityki laboratoryjnej, biorąc pod uwagę pkt 11-15), na część grzbietową każdego ucha.

- Dni 2, 3 i 7:

Powtórzyć przeprowadzoną w dniu 1. procedurę wstępnego poddania działaniu 1% wodnego roztworu SLS i nałożenia substancji badanej.

- Dni 4, 5 i 6:

Bez podawania.

- Dzień 8:

Zanotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Około 24 do 30 godzin po rozpoczęciu stosowania w dniu 7. należy uśmiercić zwierzęta w sposób humanitarny. Wyciąć uszne węzły chłonne z każdego ucha myszy i przetwarzać oddzielnie w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) dla każdego zwierzęcia. Informacje i schematy identyfikacji i rozbioru węzła chłonnego można znaleźć w pozycji (22). Do celów dalszego monitorowania miejscowych reakcji skóry w badaniu głównym, w protokole badania można uwzględnić dodatkowe parametry, takie jak punktacja rumienia ucha lub pomiar grubości ucha (zrobiony za pomocą grubościomierza lub za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy w czasie sekcji).

Przygotowanie zawiesiny komórek

26. Przygotowuje się jednokomórkową zawiesinę z komórek węzła chłonnego (LNC) usuniętych obustronnie dla każdego zwierzęcia, przez umieszczenie węzłów chłonnych pomiędzy dwoma szkiełkami mikroskopowymi i zastosowanie lekkiego nacisku w celu rozdrobnienia węzłów. Po upewnieniu się, że tkanki zostały rozprowadzone cienką warstwą, należy rozdzielić oba szkiełka. Zawiesić tkanki z obu szkiełek w PBS trzymając każde

szkiełko pod kątem nad szalką Petriego i płuczac przy użyciu PBS i jednocześnie zeskrobując tkankę ze szkiełka skrobakiem do komórek. Ponadto węzły chłonne u zwierząt z grupy kontroli negatywnej są niewielkie, tak więc ostrożne działanie ma istotne znaczenie dla uniknięcia sztucznego wpływu na wartości SI. Do płukania szkiełek należy wykorzystać całkowitą objętość 1 mL PBS. Zawiesinę LNC w szalce Petriego należy homogenizować lekko za pomocą skrobaka do komórek. 20 μ L alikwoty zawiesiny LNC zbiera się następnie za pomocą mikropipety, przy czym należy uważać aby nie zebrać widocznej dla oka membrany, a następnie miesza się z 1,98 mL PBS tak aby otrzymać 2 mL próbki. Następnie przygotowuje się drugą 2 mL próbkę zgodnie z tą samą procedurą, tak aby przygotowane zostały dwie próbki dla każdego zwierzęcia.

Określenie proliferacji komórkowych (pomiar zawartości ATP limfocytów)

27. Wzrost zawartości ATP w węzłach chłonnych jest mierzony za pomocą metody lucyferyny-lucyferazy z zastosowaniem zestawu do pomiaru ATP, który mierzy bioluminescencję w umownych jednostkach luminescencyjnych (RLU). Czas badania od momentu uśmiercenia zwierząt do pomiaru zawartości ATP dla każdego osobnika powinien być jednolity, w ciągu około 30 minut, ponieważ uważa się, że zawartość ATP stopniowo maleje wraz z upływem czasu od momentu uśmiercenia zwierząt (12). Zatem serię procedur, poczynając od usunięcia usznych węzłów chłonnych aż do pomiaru ATP należy zakończyć w ciągu 20 minut zgodnie z wcześniej ustalonym harmonogramem, takim samym dla każdego zwierzęcia. Pomiar luminescencji ATP należy przeprowadzić w każdej 2 mL próbce w taki sposób, aby w odniesieniu do każdego osobnika przeprowadzano łącznie dwa pomiary ATP. Ustala się wówczas średnią wartość luminescencji ATP i wykorzystuje ją w późniejszych obliczeniach (zob. pkt 30).

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

28. Zwierzęta poddaje się starannej obserwacji klinicznej raz dziennie pod kątem jakichkolwiek oznak klinicznych, czy to miejscowego podrażnienia w miejscu zastosowania czy też ogólnoustrojowej toksyczności. Wszystkie obserwacje kliniczne są systematycznie odnotowywane w postaci zapisów prowadzonych dla każdej myszy. Plany monitorowania powinny obejmować kryteria umożliwiające szybką identyfikację tych myszy, które wykazują oznaki toksyczności ogólnoustrojowej, nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry lub żrącego działania na skórę, w celu eutanazji (36).

Masy ciała

29. Jak wskazano w pkt 25, indywidualne masy ciała określone są na początku badania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu zwierząt.

OBLICZANIE WYNIKÓW

30. Wyniki dla każdej grupy dawkowania są wyrażane jako średni SI. SI otrzymuje się przez podzielenie średniej wartości RLU/mysz w obrębie każdej grupy dawkowania substancji badanej oraz grupy PC przez średnią RLU/mysz obliczoną dla grupy rozpuszczalnika/VC. Średnie SI dla grup VC wynosi zatem jeden.

31. Proces decyzyjny uznaje wynik za pozytywny gdy $SI \geq 1,8$ (10). Jednakże siła reakcji na dawkę, znaczenie statystyczne i spójność reakcji rozpuszczalnik/nośnik i PC mogą również

być stosowane przy ustalaniu, czy wynik graniczny (tj. wartość SI pomiędzy 1,8 a 2,5) można uznać za pozytywny (2) (3) (37).

32. W przypadku granicznego wyniku pozytywnego o wartości SI pomiędzy 1,8 i 2,5, użytkownicy mogą rozważyć dodatkowe informacje, takie jak relacja dawka-reakcja, oznaki toksyczności ogólnoustrojowej lub nadmiernego podrażnienia oraz, w stosownych przypadkach, istotność statystyczna wraz z wartościami SI w celu potwierdzenia, czy wyniki te są pozytywne (10). Należy również rozważyć różne właściwości substancji badanej, w tym rozważyć, czy jest ona strukturalnie pokrewna znanym czynnikom uczulającym, czy powoduje nadmierne podrażnienie skóry u myszy, oraz zaobserwowany charakter relacji dawka-reakcja. Te i inne względy omówione są szczegółowo gdzie indziej (4).

33. Gromadzenie danych dotyczących poszczególnych myszy umożliwi analizę statystyczną danych w odniesieniu do obecności i relacji dawka-reakcja. Ocena statystyczna może obejmować ocenę relacji między dawką a reakcją, jak również odpowiednio dostosowane porównania badanych grup (np. grupę dawkowania w parach w porównaniu do równoległej grupy kontrolnej otrzymującej nośnik/rozpuszczalnik). Analizy statystyczne mogą obejmować, np. regresję liniową lub badanie Williamsa w celu dokonania oceny tendencji w relacji między dawką a reakcją oraz badanie Dunnetta w odniesieniu do porównań par. Przy wyborze właściwej metody analizy statystycznej danych, prowadzący badanie powinien zachować świadomość możliwej nierówności wariancji lub innych powiązanych problemów, które mogą spowodować konieczność transformacji danych lub przeprowadzenia nieparametrycznej analizy statystycznej. W każdym przypadku prowadzący badanie musi liczyć się z koniecznością przeprowadzenia obliczeń SI i analiz statystycznych z wykorzystaniem pewnych punktów danych i bez nich (tzw. „wartości odbiegające”).

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

34. Dane powinny być podsumowane w formie tabelarycznej pokazującej wartości RLU odnoszące się do poszczególnych zwierząt, średnie wartości RLU/zwierzę w danej grupie, powiązany opis błędu (np. SD, SEM), oraz średnie SI dla każdej grupy dawkowania porównywane z równoległą grupą kontrolną z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika.

Sprawozdanie z badań

35. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

- numery identyfikujące (np. CAS lub WE, jeśli są dostępne); źródło: czystość; znane zanieczyszczenia; numer partii);
- cechy fizyczne i właściwości fizykochemiczne (np. lotność, stabilność, rozpuszczalność);
- jeżeli jest to mieszanina, skład i względne udziały procentowe składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

- - dane identyfikacyjne (czystość; stężenie, tam gdzie stosowne; wykorzystane objętości);
- uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta badane:

- źródło, z którego pochodzą myszy szczepu CBA;
- status mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany;
- liczba i wiek zwierząt;
- źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiska, pokarm itp.

Warunki badania:

- źródło, numer partii i dane producenta dotyczące zapewniania/kontroli jakości dla zestawu ATP;
- szczegóły przygotowania i stosowania substancji badanej;
- uzasadnienie doboru dawek (łącznie z wynikami z badania wstępnego, jeśli było przeprowadzane);
- nośnik i użyte stężenia substancji testowej oraz całkowita ilość zastosowanej substancji badanej;
- szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody);
- szczegóły dotyczące poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek;
- metody pomiaru toksyczności;
- kryteria uznawania badań za pozytywne lub negatywne;
- szczegóły dotyczące protokołu odchyłeń i wyjaśnienie, w jaki sposób odchylenie ma wpływ na planowanie badań i ich wyniki;

Sprawdzenie wiarygodności:

- podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności badań, w tym informacji o wykorzystanej substancji badanej, stężeniach i nośniku;
- dane dotyczące równoległej lub wcześniejszej kontroli pozytywnej i dotyczące równoległej negatywnej (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli z laboratorium testującego;
- jeżeli nie włączono równoległej grupy PC, data i sprawozdanie laboratoryjne z ostatniego okresowego PC i sprawozdanie wyszczególniające wcześniejsze dane dotyczące PC dla danego laboratorium, uzasadniające przyczyny dla których nie przeprowadzono PC równoległe;

Wyniki:

- masa poszczególnych myszy na początku dawkowania i przy planowanym uśmierceniu; jak również średnia i opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) w odniesieniu do każdej grupy dawkowania;
- przebieg czasowy pojawienia się i oznaki toksyczności, w tym podrażnień skóry w miejscu podania, jeśli takie wystąpiły, u każdego zwierzęcia;
- godzina uśmiercenia i godzina pomiaru ATP dla każdego zwierzęcia;
- tabela wartości RLU dla poszczególnych myszy i wartości SI dla każdej grupy dawkowania;
- średni oraz powiązany okres błędu (np. SD, SEM) dla RLU/mysz dla każdej grupy dawkowania i wyniki analizy obserwacji nietypowych dla każdej grupy dawkowania;

- obliczone SI i właściwe pomiary zmienności, uwzględniające zmienność pomiędzy zwierzętami w odniesieniu do grup substancji badanej i grup kontrolnych;
- relacja dawka-reakcja;
- analizy statystyczne, tam gdzie stosowne;

Omówienie wyników:

- krótki komentarz do wyników, analiza zależności reakcji od dawki oraz w stosownych przypadkach, analizy statystyczne, z wnioskiem czy substancja testowa powinna być uznana za czynnik uczulający skórę.

1.1. BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [<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. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [<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. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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., Kozłowski, 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. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/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, Paryż. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (38).

Substancja wzorcowa : Uczulająca lub nieuczulająca substancja wykorzystywana jako norma dla celów porównania z substancją badaną. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizykochemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądanych reakcji.

Falszywy wynik negatywny: substancja, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako negatywna lub nieaktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest pozytywna lub aktywna.

Falszywy wynik pozytywny: substancja, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako pozytywna lub aktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest negatywna lub nieaktywna.

Zagrożenie: Możliwość wywierania negatywnego wpływu na zdrowie lub środowisko. Niekorzystny wpływ przejawia się tylko wtedy, gdy istnieje wystarczające narażenie.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: Miernik zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję mogą przynieść jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest określana w procesach poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje w jakim stopniu badanie można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (38).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: Ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również odtwarzalnością laboratoryjną (38).

Wynik odbiegający: Wynik odbiegający jest obserwacją, która znacznie różni się od innych wartości w losowej próbie z populacji.

Zapewnienie jakości: Proces zarządzania, w którym przestrzeganie norm i wymogów w zakresie badań laboratoryjnych, oraz procedur dotyczących dokumentacji i dokładności przekazywania danych jest oceniane przez osoby niezależne od tych, które przeprowadzają badania.

Wiarygodność : Miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (38).

Działanie uczulające na skórę: Proces immunologiczny, do którego dochodzi w przypadku, gdy osobnik wrażliwy jest narażony miejscowo na wywołujący uczulenie chemiczny alergen, powodujący immunologiczną reakcję skórą, co może prowadzić do uczulania przez kontakt ze skórą.

Wskaźnik stymulacji (SI): Wartość obliczona dla oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę przez substancję badaną, który wyraża się stosunkiem proliferacji w grupach poddanych działaniu środka do proliferacji w równoległej grupie kontrolnej nośnika.

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.

B.51 Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych BrdU-ELISA

WSTĘP

1. Wytyczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów i metody badań UE są okresowo poddawane przeglądowi w związku z postępem naukowym, zmieniającymi się potrzebami regulacyjnymi, oraz troską o dobrostan zwierząt. Pierwsza metoda badania (TM) (B.42) przy określaniu działania uczulającego na skórę u myszy - badanie lokalnych węzłów chłonnych (LLNA; wytyczna OECD dotycząca badań nr 429) została poddana przeglądowi (1 i rozdział B.42 niniejszego załącznika). Szczegóły walidacji LLNA i przegląd powiązanej bibliografii opublikowano w (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). W LLNA radioizotopy tymidyny lub jodyny są stosowane do pomiaru proliferacji limfocytów i w związku z tym badanie ma ograniczone zastosowanie w przypadku, gdy nabycie, zastosowanie lub usuwanie promieniotwórczości jest problematyczne. Badanie LLNA BrdU-ELISA [test immunoabsorpcji enzymozależnej] jest niepromieniotwórczą modyfikacją metody LLNA TM, która wykorzystuje nieoznakowaną izotopem promieniotwórczym 5-bromo-2-dezoksyurydynę (BrdU) (Chemical Abstracts Service [nr CAS 59-14-3] w formie systemu badawczego opartego na ELISA, do pomiaru proliferacji limfocytów. Badanie LLNA BrdU-ELISA zostało zatwierdzone i poddane przeglądowi oraz zalecone przez międzynarodowy panel ds. wzajemnych przeglądów jako przydatne do rozpoznawania chemikaliów uczulających skórę oraz jej nieuczulających wraz z pewnymi ograniczeniami (10) (11) (12). Ta TM jest zaprojektowana dla celów oceny potencjału uczulenia skóry przez chemikalia (substancje i mieszaniny) u zwierząt. Rozdział B.6 niniejszego załącznika oraz wytyczna OECD dotycząca badań nr 406 wykorzystują badania na świnkach morskich, w szczególności test maksymalizacji na śwince morskiej oraz test Buehlera (13). Metoda LLNA (rozdział B.42 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 429) oraz jej dwa niepromieniotwórcze warianty: LLNA: BrdU-ELISA (rozdział B.51 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 B) oraz LLNA: DA (rozdział B.50 niniejszego załącznika; wytyczna OECD dotycząca badań nr 442 A) zapewniają bardziej ograniczone i udoskonalone wykorzystanie zwierząt w porównaniu do badań na świnkach morskich opisanych w B.6 i w wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (13).

2. Podobnie jak LLNA, metoda LLNA: BrdU-ELISA bada fazę indukcyjną uczulenia skóry i dostarcza danych ilościowych odpowiednich dla dokonania oceny dawka-reakcja. Ponadto, zdolność do wykrywania substancji działających uczulająco na skórę bez konieczności korzystania z izotopowego oznaczania DNA eliminuje możliwość narażenia zawodowego na działanie promieniotwórcze oraz kwestie związane z usuwaniem odpadów. To z kolei może pozwolić na zwiększone wykorzystanie myszy w celu wykrycia substancji działających uczulająco na skórę, co może doprowadzić do dalszego ograniczenia stosowania świnek morskich do badania odporności na działanie uczulające na skórę (tj. B6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13).

DEFINICJE

3. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Badanie LLNA BrdU-ELISA to zmieniona metoda LLNA umożliwiająca identyfikację potencjalnych chemikaliów uczulających skórę, z uwzględnieniem szczególnych ograniczeń. Nie oznacza to, że we wszystkich przypadkach należy stosować

LLNA: BrdU-ELISA zamiast LLNA lub badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13), a tylko, że badanie to ma tę samą wartość merytoryczną i może zostać zastosowane jako badanie alternatywne, którego pozytywne lub negatywne wyniki nie wymagają już dalszego potwierdzenia (10) (11). Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji przed rozpoczęciem badań. Informacje te powinny obejmować tożsamość i budowę chemiczną badanej substancji; jej właściwości fizyko-chemiczne; wyniki innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* badanej substancji i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie pokrewnych substancji chemicznych. Informacje te należy uwzględnić w celu ustalenia, czy LLNA: BrdU-ELISA jest odpowiednia do badania danej substancji (z uwagi na niekompatybilność niektórych rodzajów chemikaliów z metodą LLNA: BrdU-ELISA [zob. pkt 5] oraz przy wyborze dawki).

5. Badanie LLNA Będąc metodą *in vivo* BrdU-ELISA nie eliminuje wykorzystania zwierząt w określaniu alergicznego kontaktowego działania uczulającego. Może ona jednak ograniczyć stosowanie zwierząt do tego celu, w porównaniu z badaniami na świnkach morskich (B.6; wytyczna OECD dotycząca badań nr 406) (13). Co więcej, LLNA: BrdU-ELISA oferuje znacznie bardziej wyrafinowany sposób wykorzystywania zwierząt do badania alergicznego kontaktowego działania uczulającego, ponieważ w przeciwieństwie do B.6 i wytycznej OECD dotyczącej badania nr 406, LLNA: BrdU-ELISA nie wymaga, wywoływania reakcji nadwrażliwości skóry poprzez prowokację. Ponadto, LLNA: BrdU-ELISA nie wymaga zastosowania adiuwanta, jak wymaga tego test maksymalizacji na świnkach morskich (rozdział B.6 niniejszego załącznika, 13). Tym samym, LLNA: BrdU-ELISA zmniejsza cierpienie zwierząt. Niezależnie od przewagi LLNA: BrdU-ELISA nad metodami B.6 i wytyczną OECD dotyczącą badań nr 406 (13), należy przyznać, że istnieją pewne ograniczenia, które mogą spowodować konieczność wykorzystania B.6 lub wytycznej OECD dotyczącej badań nr 406 (np. w przypadku badania niektórych metali, z uwagi na fałszywe wyniki pozytywne w przypadku niektórych środków drażniących skórę [takich jak niektóre substancje powierzchniowo czynne] (6) (1, i rozdział B.42 niniejszego załącznika), lub rozpuszczalność badanej substancji). Ponadto klasy chemiczne lub substancje zawierające grupy funkcjonalne co do których wykazano, że działają jako potencjalne czynniki zakłócające (15), mogą wymagać użycia badań na świnkach morskich (tj. B.6; wytyczna OECD dotyczącej badań nr 406 (13)). Zalecono stosowanie ograniczeń wskazanych w LLNA (1 oraz rozdział B.42 w niniejszym załączniku) również w odniesieniu do LLNA: BrdU-ELISA (10). Poza tymi przypadkami zidentyfikowanych ograniczeń, LLNA: BrdU-ELISA powinna być stosowana do badania wszelkich substancji, chyba że istnieją właściwości związane z tymi substancjami, które mogą zakłócać dokładność LLNA: BrdU-ELISA. Ponadto należy uwzględnić możliwość otrzymania pozytywnych wyników granicznych gdy wartości wskaźnika stymulacji (SI) kształtują się pomiędzy 1,6 a 1,9 (zob. pkt 31 – 32). Opiera się to na bazie danych uzyskanej przy zatwierdzaniu 43 substancji z wykorzystaniem $SI \geq 1,6$ (zob. pkt 6), gdzie za pomocą LLNA: BrdU-ELISA poprawnie zidentyfikowano wszystkie 32 LLNA czynniki uczulające, lecz niewłaściwie oznaczono dwie z 11 LLNA substancji nieuczulających o wartościach SI pomiędzy 1,6 i 1,9 (tj. graniczne wartości dodatnie) (10). Jednak w związku z tym, że ten sam zestaw danych był stosowany do ustalania wartości SI i obliczania przewidywalnych właściwości badania, przytoczone wyniki mogą być zawyżonym szacunkiem prawdziwych przewidywalnych właściwości.

ZASADA METODY BADANIA

6. Podstawowa zasada leżąca u podstaw LLNA: BrdU-ELISA zakłada, że czynniki uczulające wywołują proliferację limfocytów w węzłach chłonnych odprowadzających limfę z miejsca przyłożenia substancji badanej. Ta proliferacja jest proporcjonalna do zastosowanej

dawki oraz potencjału zastosowanego alergenu i jest prostym środkiem uzyskania ilościowego pomiaru uczulenia. Proliferacja jest mierzona przez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej otrzymującej nośnik (VC). Określa się stosunek średniej proliferacji w każdej grupie poddanej działaniu środka do średniej proliferacji w równoległej grupie VC, który jest nazywany wskaźnikiem stymulacji (SI) i powinien wynosić $\geq 1,6$ zanim substancja badana zostanie zaklasyfikowana jako potencjalny czynnik uczulający skórę. Procedury opisane w niniejszym dokumencie są oparte na wykorzystaniu do pomiaru zawartości BrdU w celu wykrycia zwiększonej liczby komórek rozmnażających się wegetatywnie w odprowadzających usznych węzłach chłonnych. BrdU jest substancją analogiczną do tymidyny i jest na podobnej zasadzie włączana do DNA komórek rozmnażających się wegetatywnie. Pomiaru zjawiska włączania BrdU dokonuje się metodą ELISA, która wykorzystuje przeciwciała specyficzne dla BrdU oznakowane również za pomocą peroksydazy. Gdy dodaje się podłoże, peroksydaza reaguje z nim i daje w wyniku barwiony produkt, kwantyfikowany w danej absorpcji przy zastosowaniu czytnika do płytek ELISA.

OPIS BADANIA

Dobór gatunków zwierząt

7. Mysz jest gatunkiem preferowanym do tego badania. Badania walidacyjne dla LLNA: BrdU-ELISA były przeprowadzane wyłącznie na szczepie CBA/J, który z tego względu uznaje się za szczep preferowany (10) (12). Wykorzystuje się młode dorosłe samice myszy, które są nieródkami i nie są w ciąży. Na początku doświadczenia samice powinny mieć 8-12 tygodni, a zróżnicowanie mas ciała poszczególnych zwierząt powinno być minimalne i nie przekraczać 20% średniej masy ciała. Można ewentualnie wykorzystać inne szczepy i samce, jeżeli dysponuje się danymi świadczącymi o tym, że nie istnieją znaczące różnice w reakcji na LLNA: BrdU-ELISA.

Warunki w pomieszczeniach dla zwierząt i pożywienie

8. Myszy powinny być trzymane w grupach (16), chyba że istnieją odpowiednie naukowe przesłanki dla trzymania myszy pojedynczo. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30% i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70% poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50-60%. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Przygotowanie zwierząt

9. Zwierzęta wybierane są losowo i znakowane w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację (ale nie przez jakiegokolwiek znaki na uszach) i trzymane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem dawkowania w celu umożliwienia zaaklimatyzowania do warunków laboratoryjnych. Przed rozpoczęciem podawania bada się wszystkie zwierzęta w celu upewnienia się, że nie mają żadnych zauważalnych zmian skórnych.

Przygotowanie roztworów dozujących

10. Stałe substancje powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, przed zastosowaniem na uchu myszy. Chemikalia płynne można zastosować czyste lub rozcieńczone przed dawkowaniem. Chemikalia nierozpuszczalne, takie jak te najczęściej spotykane w wyrobach medycznych, należy poddać przesadnej ekstrakcji w odpowiednim rozpuszczalniku w celu wykrycia wszystkich możliwych do wyekstrahowania składników do badania przed zastosowaniem na uchu myszy. Substancje badane należy przygotowywać codziennie, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Sprawdzenie wiarygodności

11. Pozytywne substancje kontrolne (PC) wykorzystuje się do wykazania właściwego działania badania poprzez reakcję badanej substancji uczulającej z odpowiednią i powtarzalną czułością, dla której wielkość reakcji jest dobrze scharakteryzowana. Włączanie kolejnych PC jest zalecane, ponieważ potwierdza się w ten sposób kompetencje laboratorium do skutecznego przeprowadzenia każdego badania i umożliwia dokonanie oceny odtwarzalności i porównywalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej. Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać także PC dla każdego badania i w związku z tym zachęca się użytkowników do konsultacji z właściwymi organami przed rozpoczęciem LLNA: BrdU-ELISA. Odpowiednio zaleca się rutynowe wykorzystywanie równoległej PC, aby uniknąć potrzeby dodatkowych badań na zwierzętach do spełnienia tych wymagań, które mogą powstać w związku ze stosowaniem okresowej PC (zob. pkt 12). PC powinna dawać pozytywną reakcję na badanie LLNA: BrdU-ELISA przy takim poziomie narażenia, przy którym oczekuje się wzrostu $SI \geq 1,6$ w grupie kontroli negatywnej (NC). Dawkę PC należy dobrać w taki sposób, by nie powodować nadmiernego podrażnienia skóry lub ogólnoustrojowej toksyczności a indukcja była powtarzalna, ale nie nadmierna (tj. $SI > 14$ byłyby uznane za zbyt wysokie). Preferowane PC to 25% aldehyd cynamonowy heksylu (nr CAS 101-86-0) i 25% eugenol (nr CAS 97-53-0) w acetonie: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v). Mogą zaistnieć okoliczności, w których można użyć innych PC spełniających powyższe kryteria, pod warunkiem, że istnieje po temu odpowiednie uzasadnienie.

12. Podczas gdy włączenie równoległej grupy PC jest zalecane, mogą zaistnieć sytuacje, w których badanie okresowe PC (tj. w odstępach nie dłuższych niż 6 miesięcy) może okazać się wystarczające w przypadku laboratoriów przeprowadzających badanie LLNA: BrdU-ELISA regularnie (tj. przeprowadzających badanie LLNA: BrdU-ELISA nie rzadziej niż raz na miesiąc) i dysponują wcześniejszymi danymi z pozytywnych kontroli, świadczącymi o tym, że laboratorium jest w stanie uzyskiwać odtwarzalne i dokładne wyniki w pozytywnych kontrolach. Można wykazać odpowiedni poziom biegłości w wykonywaniu badania LLNA BrdU-ELISA uzyskując stałe pozytywne wyniki PC w co najmniej 10 niezależnych badaniach przeprowadzonych w rozsądnym terminie (tj. w okresie krótszym niż rok).

13. Należy zawsze włączać równoległą grupę PC, jeśli zachodzi proceduralna zmiana w LLNA: BrdU-ELISA (np. zmiana przeszkolonego personelu, zmiany w metodzie badania materiałów i/lub odczynników, zmiany w metodzie badania urządzenia, zmiana źródła zwierząt badanych), a przedmiotowe zmiany powinny być udokumentowane w laboratoryjnych sprawozdaniach. Należy zwrócić uwagę na wpływ tych zmian na odpowiedniość ustalonych wcześniej danych przy określaniu konieczności zgromadzenia nowej bazy danych aby udokumentować spójność wyników PC.

14. Badacze powinni być świadomi, że decyzja o przeprowadzeniu badania PC na zasadzie okresowej zamiast równoległej wywiera wpływ na odpowiedniość i akceptowalność

negatywnych wyników badań uzyskanych bez równoległej PC w okresie pomiędzy każdym okresowym badaniem PC. Na przykład, jeżeli w okresowych PC uzyskany zostaje wynik fałszywie negatywny, negatywne wyniki substancji badanej uzyskane w okresie między ostatnim dopuszczalnym okresowym badaniem PC i niedopuszczalnym okresowym badaniem PC mogą być kwestionowane. Należy dokładnie rozważyć tego rodzaju skutki przy podejmowaniu decyzji czy należy włączyć równoległą PC czy tylko przeprowadzać PC na zasadzie okresowej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość wykorzystania mniejszej liczby zwierząt w ramach grupy równoległej PC, jeżeli jest to naukowo uzasadnione, oraz jeżeli laboratorium może wykazać, w oparciu o wcześniej zgromadzone dane, że można wykorzystać mniejszą liczbę myszy (17).

15. Choć substancja kontroli pozytywnej powinna być testowana w nośniku, o którym wiadomo, że wywołuje konsekwentną reakcję (np. aceton: oliwa z oliwek; w proporcji objętościowej 4:1, v/v), mogą jednak zaistnieć pewne sytuacje wynikające z przepisów, w których przetestowanie w niestandardowym nośniku (o formułacji odpowiedniej klinicznie/chemicznie) może być również konieczne (18). Jeżeli równoległą PC jest badana w innym nośniku niż substancja badana, wówczas należy włączyć oddzielną VC w odniesieniu do równoległej PC.

16. W przypadkach, gdy ocenia się substancje badane konkretnej klasy chemicznej lub dające pewien zakres reakcji, substancje wzorcowe mogą służyć także temu aby wykazać, czy metoda badawcza jest odpowiednia dla dokonania oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę tego rodzaju badanych substancji. Odpowiednie substancje wzorcowe powinny posiadać następujące właściwości:

- strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do klasy badanej substancji;
- znane właściwości fizyczne i chemiczne;
- dane potwierdzające z LLNA: BrdU-ELISA;
- dane potwierdzające z innych modeli zwierzęcych i/lub ludzkich.

PROCEDURA BADANIA

Liczba zwierząt i poziomy dawek

17. W każdej grupie dawkowania powinny być wykorzystane nie mniej niż cztery zwierzęta, z minimalną liczbą trzech stężeń substancji badanej oraz równoległą grupą NC otrzymującą jedynie nośnik substancji badanej i grupą kontrolną PC (równoległą lub najnowszą, na podstawie polityki laboratoryjnej, biorąc pod uwagę pkt 11-15). Należy rozważyć zbadanie wielu dawek PC, szczególnie gdy badanie PC jest przeprowadzane na zasadzie nieregularnej. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grup kontrolnych należy się obchodzić w sposób identyczny jak ze zwierzętami grup badanych.

18. Wybór dawek i nośnika powinien być oparty na zaleceniach podanych w pozycjach 2 i 19. Kolejne dawki zazwyczaj wybiera się z odpowiedniego szeregu stężeń takich jak 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, itd. Do wyboru szeregu stężeń należy dołączyć odpowiednie naukowe uzasadnienie. O ile są dostępne, należy uwzględnić wszystkie istniejące informacje toksykologiczne (np. o ostrej toksyczności i o podrażnieniu skóry) oraz o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach badanej substancji (i/lub substancji zbliżonych pod względem budowy) przy wyborze trzech kolejnych stężeń, tak aby najwyższe

stężenie maksymalizowało narażenie nie doprowadzając jednak do ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry (19)(20 i rozdział B.4 niniejszego załącznika). W przypadku braku takich informacji, może okazać się konieczne przeprowadzenie badania wstępnego (zob. pkt 21-24)

19. Nośnik nie powinien zakłócać wyniku badania lub wpływać na niego oraz powinien być wybrany na podstawie maksymalizowania rozpuszczalności w celu uzyskania najwyższego osiągalnego stężenia, dając jednocześnie możliwość uzyskania roztworu/zawiesiny nadającej się do podania substancji badanej. Zalecanymi nośnikami są aceton: oliwa z oliwek (w proporcji objętościowej 4:1 v/v), N,N-dimetyloformamid, metylo etylo keton, glikol propylenowy i sulfotlenek dimetylowy (6), ale mogą być użyte inne, jeśli przedstawi się wystarczające uzasadnienie naukowe. W niektórych sytuacjach może okazać się konieczne użycie, jako dodatkowej kontroli, rozpuszczalnika odpowiedniego ze względów klinicznych, lub postaci handlowej, w której badana substancja wprowadzana jest na rynek. Szczególną uwagę należy zwrócić na zapewnienie, aby hydrofilne substancje badane zostały włączone do systemu nośnika, który nawilża skórę i nie spływa z niej natychmiast, przez włączenie odpowiednich środków zwiększających rozpuszczalność (np. 1% Pluronic® L92). A zatem należy unikać roztworów całkowicie wodnych.

20. Przetwarzanie węzłów chłonnych z poszczególnych myszy umożliwia ocenę zmienności pomiędzy zwierzętami oraz statystyczne porównanie różnicy między substancją badaną i pomiarami grupy VC (zob. pkt 33). Ponadto dokonanie oceny możliwości obniżenia liczby myszy w grupie PC jest wykonalne jedynie wówczas, gdy gromadzone są dane dotyczące poszczególnych zwierząt (17). Co więcej niektóre organy regulacyjne wymagają zbierania danych dotyczących poszczególnych zwierząt. Regularne gromadzenie danych dotyczących poszczególnych zwierząt stanowi o dobrostanie zwierząt dzięki temu, że unika się powielania badań, do którego dochodziłoby w przypadku, gdyby wyniki dotyczące substancji badanej pierwotnie zebrane w jeden sposób (np. poprzez połączenie danych dotyczących zwierząt) miały zostać rozpatrzone w późniejszym terminie przez organy regulacyjne zgodnie z innymi wymogami (np. w ramach danych dotyczących poszczególnych zwierząt).

Badanie wstępne

21. W przypadku braku informacji pozwalającej określić najwyższą dawkę, jaka ma zostać zbadana (zob. pkt 18), należy przeprowadzić badanie wstępne w celu określenia właściwego poziomu dawki do badania w metodzie LLNA: BrdU-ELISA. Celem badania wstępnego jest uzyskanie wytycznych na temat wyboru maksymalnej dawki jaka może być stosowana w głównym badaniu LLNA: BrdU-ELISA, w przypadku gdy nie dysponuje się informacjami na temat stężenia powodującego toksyczność ogólnoustrojową (zob. pkt 24) i/lub nadmierne miejscowe podrażnienie skóry (zob. pkt 23). Maksymalny poziom badanej dawki powinien wynosić 100% stężenia substancji badanej w przypadku cieczy lub maksymalne możliwe stężenie w przypadku ciał stałych lub zawiesin.

22. Badanie wstępne przeprowadza się w warunkach identycznych do tych, w jakich przeprowadza się główne badanie LLNA: BrdU-ELISA, z tym że nie przeprowadza się oceny proliferacji węzła chłonnego oraz można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt w grupie dawkowania. Zaleca się jedno lub dwa zwierzęta w grupie dawkowania. Wszystkie myszy będą obserwowane codziennie pod kątem jakichkolwiek klinicznych oznak toksyczności ogólnoustrojowej lub miejscowego podrażnienia skóry w miejscu zastosowania. Masy ciała są rejestrowane przed badaniem i przed jego zakończeniem (dzień 6.). Obydwoje uszu każdej

myszki bada się pod kątem wystąpienia rumienia i ocenia przy wykorzystaniu tabeli 1 (pkt 20 oraz rozdział B.4 niniejszego załącznika). Pomiary grubości ucha są przeprowadzane przy wykorzystaniu grubościomierza (np. cyfrowych mikrometrów lub grubościomierzem Peacock Dial) w dniu 1. (przed podaniem substancji), w dniu 3. (około 48 godzin następujących po podaniu pierwszej dawki) oraz w dniu 6. Ponadto, w dniu 6. grubość ucha można określić za pomocą kolczykownicy do pomiaru masy, co powinno być przeprowadzone po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Nadmierne miejscowe podrażnienie skóry jest sygnalizowane przez rumień o wyniku ≥ 3 i/lub zwiększenie grubości ucha o $\geq 25\%$ w dniu pomiaru (21) (22). Najwyższa dawka wybrana do głównego badania LLNA: BrdU-ELISA to następna niższa dawka w szeregu stężeń badania wstępnego (zob. pkt 18), która nie wywołuje ogólnoustrojowej toksyczności i/lub nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry.

Tabela 1 Wyniki dotyczące rumienia

Objawy	Wynik
Brak rumienia	0
Bardzo lekki rumień (prawie niewidoczny)	1
Wyraźny rumień	2
Rumień umiarkowany do mocnego	3
Mocny rumień (czerwień przypominająca barwę mięsa czerwonego) do form obrzęku wykluczających klasyfikację rumienia	4

23. Oprócz 25% zwiększenia grubości ucha (21) (22), do zidentyfikowania substancji drażniących w metodzie LLNA wykorzystywano też statystycznie istotne zwiększenie grubości ucha u myszy badanych w porównaniu do myszy kontrolnych (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). O ile jednak statystycznie znaczące zwiększenie może wystąpić przy grubości ucha mniejszej niż 25%, to nie udało się go powiązać z nadmiernym podrażnieniem (25) (26) (27) (28) (29).

24. Następujące obserwacje kliniczne mogą wskazywać na toksyczność ogólnoustrojową (30), jeśli są wykorzystywane jako część zintegrowanej oceny i w związku z tym mogą określać maksymalne dawki do stosowania w LLNA: BrdU-ELISA: zmiany w funkcjach układu nerwowego (np. piloerekcja, ataksja, drżenia, oraz konwulsje); zmiany w zachowaniu (na przykład agresja, zmiany w czyszczeniu, wyraźna zmiana w poziomie aktywności); zmiany w sposobie oddychania (np. zmiany w częstotliwości i intensywności oddychania, takie jak duszność, dyszenie oraz rzęzenie) a także zmiany w konsumpcji żywności i wody. Ponadto w ocenie należy wziąć pod uwagę oznaki stanów zwiększonej senności i/lub brak reakcji oraz wszelkie objawy kliniczne sygnalizujące coś więcej niż chwilowy ból i cierpienie, lub >5% spadek masy ciała od dnia 1 do dnia 6. czy śmiertelność. Zwierzęta konające oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu i zagrożenia należy humanitarnie uśmiercić (31).

Harmonogram doświadczalny głównego badania

25. Harmonogram doświadczalny badania jest następujący:

- Dzień 1:

indywidualnie określić i odnotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. Stosuje się 25 μ l właściwego roztworu lub samego nośnika, lub kontroli pozytywnej (równoległej lub najnowszej, na podstawie polityki laboratoryjnej, bierze się pod uwagę pkt 11-15), na część grzbietową każdego ucha.

- Dzień 2 i 3:

Powtórzyć procedurę stosowania przeprowadzoną w dniu 1.

- Dzień 4:

Bez podawania.

- Dzień 5:

Wstrzyknąć 0,5 mL (5 mg/mysz) roztworu BrdU (10 mg/mL) wewnątrztrzewnowo.

- Dzień 6:

Zanotować wagę każdego zwierzęcia oraz wszelkie obserwacje kliniczne. W około 24 godziny (24 h) po wstrzyknięciu BrdU, należy uśmiercić w sposób humanitarny zwierzęta. Wyciąć uszne węzły chłonne z każdego ucha myszy i przetwarzać oddzielnie w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) dla każdego zwierzęcia. Informacje i schematy identyfikacji i rozbioru węzła chłonnego można znaleźć w pozycji (17). Do celów dalszego monitorowania miejscowych reakcji skóry w badaniu głównym, w protokole badania można uwzględnić dodatkowe parametry, takie jak punktacja rumienia ucha lub pomiar grubości ucha (zrobiony za pomocą grubościomierza lub za pomocą kołczykownicy do pomiaru masy w czasie sekcji).

Przygotowanie zawiesiny komórek

26. Zostaje przygotowana jedna wspólna porcja zawiesiny z komórek węzła chłonnego (LNC) usuniętych obustronnie u każdej myszy przez delikatne mechaniczne rozdzielanie agregatów na siateczce ze stali nierdzewnej o oczkach wielkości 200 μ m lub za pomocą innych możliwych do przyjęcia technik służących tworzeniu jednokomórkowych zawiesin (np. wykorzystując jednorazowe plastikowe tłuczki do zgniecenia węzłów chłonnych a następnie przesiewając je przez nylonową siatkę #70). Procedura przygotowania zawiesiny LNC ma zasadnicze znaczenie w tym badaniu, zatem każdy operator powinien ustanowić technikę z wyprzedzeniem. Ponadto węzły chłonne u zwierząt z grupy kontroli negatywnej są niewielkie, tak więc ostrożne działanie ma istotne znaczenie dla uniknięcia sztucznego wpływu na wartości SI. W każdym przypadku, docelowa objętość zawiesiny LNC powinna zostać dostosowana do określonej zoptymalizowanej objętości (około 15 mL). Objętość zoptymalizowana opiera się na osiągnięciu średniej absorpcji w grupie NC w zakresie 0,1-0,2.

Określenie proliferacji komórkowych (pomiar zawartości BrdU w DNA limfocytów)

27. BrdU mierzy się za pomocą ELISA przy użyciu zestawu dostępnego w handlu (np. Roche Applied Science, Mannheim, Niemcy, nr w katalogu 11 647 229 001). Krótko rzecz ujmując 100 μ L zawiesiny LNC dodaje się do zagłębień w płaskodennej płytce w trzech egzemplarzach. Po utrwaleniu i denaturacji LNC, dodaje się przeciwciało anty-BrdU do każdego zagłębienia i umożliwia reakcję. Następnie przeciwciało anty-BrdU jest usuwane poprzez płukanie, dodaje się roztwór podłoża i umożliwia wytworzenie chromogenu. Następnie mierzy się absorbancję przy 370 nm ze wzorcową długością fali 492 nm. We wszystkich przypadkach należy zoptymalizować warunki badania (zob. pkt 26).

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

28. Zwierzęta poddaje się starannej obserwacji klinicznej raz dziennie pod kątem jakichkolwiek oznak klinicznych, czy to miejscowego podrażnienia w miejscu zastosowania czy też ogólnoustrojowej toksyczności. Wszystkie obserwacje kliniczne są systematycznie odnotowywane w postaci zapisów prowadzonych dla każdej myszy. Plany monitorowania powinny obejmować kryteria umożliwiające szybką identyfikację tych myszy, które wykazują oznaki toksyczności ogólnoustrojowej, nadmiernego miejscowego podrażnienia skóry lub żrącego działania na skórę, w celu eutanazji (31).

Masy ciała

29. Jak wskazano w pkt 25, indywidualne masy ciała określone są na początku badania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu zwierząt.

OBLICZANIE WYNIKÓW

30. Wyniki dla każdej grupy dawkowania są wyrażane jako średni SI. SI otrzymuje się dzieląc średnią wartość wskaźnika proliferacyjnego BrdU w obrębie każdej grupy dawkowania substancji badanej i grupie PC przez średnią wartość wskaźnika proliferacyjnego BrdU w grupie badanej z zastosowaniem rozpuszczalnika/VC. Średnie SI dla grup VC wynosi zatem jeden.

Wskaźnik proliferacyjny BrdU definiuje się jako:

$$\text{wskaźnik proliferacyjny BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

gdzie; em = długość fali emisji; a ref = wzorcowa długości fali.

31. W procesie decyzyjnym wynik uznawany jest za pozytywny jeśli $\text{SI} \geq 1,6$ (10). Jednakże siła reakcji na dawkę, znaczenie statystyczne i spójność reakcji rozpuszczalnik/nośnik i PC mogą również być stosowane przy ustalaniu, czy wynik graniczny (tj. wartość SI pomiędzy 1,6 a 1,9) można uznać za pozytywny (3) (6) (32).

32. W przypadku granicznego wyniku pozytywnego o wartości SI pomiędzy 1,6 i 1,9, użytkownicy mogą rozważyć dodatkowe informacje, takie jak relacja dawka-reakcja, oznaki toksyczności ogólnoustrojowej lub nadmiernego podrażnienia oraz, w stosownych przypadkach, istotność statystyczna wraz z wartościami SI w celu potwierdzenia, czy wyniki te są pozytywne (10). Należy również rozważyć różne właściwości substancji badanej, w tym rozważyć, czy jest ona strukturalnie pokrewna znanym czynnikom uczulającym, czy

powoduje nadmierne podrażnienie skóry u myszy, oraz zaobserwowany charakter relacji dawka-reakcja. Te i inne względy omówione są szczegółowo gdzie indziej (4).

33. Gromadzenie danych dotyczących poszczególnych myszy umożliwi analizę statystyczną danych w odniesieniu do obecności i relacji dawka-reakcja. Ocena statystyczna może obejmować ocenę relacji między dawką a reakcją, jak również odpowiednio dostosowane porównania badanych grup (np. grupę dawkowania w parach w porównaniu do równoległej grupy kontrolnej otrzymującej nośnik/rozpuszczalnik). Analizy statystyczne mogą obejmować, np. regresję liniową lub badanie Williamsa w celu dokonania oceny tendencji w relacji między dawką a reakcją oraz badanie Dunnetta w odniesieniu do porównań par. Przy wyborze właściwej metody analizy statystycznej danych, prowadzący badanie powinien zachować świadomość możliwej nierówności wariancji lub innych powiązanych problemów, które mogą spowodować konieczność transformacji danych lub przeprowadzenia nieparametrycznej analizy statystycznej. W każdym przypadku prowadzący badanie musi liczyć się z koniecznością przeprowadzenia obliczeń SI i analiz statystycznych z wykorzystaniem pewnych punktów danych i bez nich (tzw. „wartości odbiegające”).

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

34. Dane powinny być podsumowane w formie tabelarycznej pokazującej wartości wskaźnika proliferacyjnego BrdU odnoszące się do poszczególnych zwierząt, średnie wartości wskaźnika proliferacyjnego BrdU/zwierzę w danej grupie, powiązany opis błędu (np. SD, SEM), oraz średnie SI dla każdej grupy dawkowania w porównaniu do równoległej grupy kontrolnej z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika.

Sprawozdanie z badań

35. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne:

- numery identyfikujące (np. CAS lub WE, jeśli są dostępne); źródło: czystość; znane zanieczyszczenia; numer partii);
- cechy fizyczne i własności fizykochemiczne (np. lotność, stabilność, rozpuszczalność);
- jeżeli jest to mieszanina, skład i względne udziały procentowe składników.

Rozpuszczalnik/nośnik:

- - dane identyfikacyjne (czystość; stężenie, tam gdzie stosowne; wykorzystane objętości);
- uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta badane:

- źródło, z którego pochodzą myszy szczepu CBA;
- status mikrobiologiczny zwierząt, jeśli jest znany;
- liczba i wiek zwierząt;
- źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiska, pokarm itp.

Warunki badania:

- źródła, numer partii i dane producenta dotyczące zapewniania/kontroli jakości dla zestawu ELISA;
- szczegóły przygotowania i stosowania substancji badanej;
- uzasadnienie doboru dawek (łącznie z wynikami z badania wstępnego, jeśli było przeprowadzane);
- nośnik i użyte stężenia substancji testowej oraz całkowita ilość zastosowanej substancji badanej;
- szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody);
- szczegóły dotyczące poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek;
- metody pomiaru toksyczności;
- kryteria uznawania badań za pozytywne lub negatywne;
- szczegóły dotyczące protokołu odchyleń i wyjaśnienie, w jaki sposób odchylenie ma wpływ na planowanie badań i ich wyniki;

Sprawdzenie wiarygodności:

- podsumowanie wyników ostatniego sprawdzenia wiarygodności badań, w tym informacji o wykorzystanej substancji badanej, stężeniach i nośniku;
- dane dotyczące równoległej lub wcześniejszej kontroli pozytywnej i dotyczące równoległej negatywnej (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli z laboratorium testującego;
- jeżeli nie włączono równoległej grupy PC, data i sprawozdanie laboratoryjne z ostatniego okresowego PC i sprawozdanie wyszczególniające wcześniejsze dane dotyczące PC dla danego laboratorium, uzasadniające przyczyny dla których nie przeprowadzono PC równoległe;

Wyniki:

- masa poszczególnych myszy na początku dawkowania i przy planowanym humanitarnym uśmierceniu; jak również średnia i opis powiązanego błędu (np. SD, SEM) w odniesieniu do każdej grupy dawkowania;
- przebieg czasowy pojawienia się i oznaki toksyczności, w tym podrażnień skóry w miejscu podania, jeśli takie wystąpiły, u każdego zwierzęcia;
- tabelę wskaźników proliferacyjnych BrdU dla poszczególnych myszy i wartości SI dla każdej grupy dawkowania;
- średni oraz powiązany okres błędu (np. SD, SEM) dla wskaźnika proliferacyjnego BrdU//mysz dla każdej grupy dawkowania i wyniki analizy obserwacji nietypowych dla każdej grupy dawkowania;
- obliczone SI i właściwe pomiary zmienności, uwzględniające zmienność pomiędzy zwierzętami w odniesieniu do grup substancji badanej i grup kontrolnych;
- relacja dawka-reakcja;
- analizy statystyczne, tam gdzie stosowne;

Omówienie wyników:

- krótki komentarz do wyników, analiza zależności reakcji od dawki oraz w stosownych przypadkach, analizy statystyczne, z wnioskiem czy substancja testowa powinna być uznana za czynnik uczulający skórę.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paryż. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [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. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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. Dostępny na stronie: [<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., 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.
- (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. Dostępny na stronie: [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, Paryż. Dostępny na stronie: [<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, Paryż. Dostępny na stronie: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania (33).

Substancja wzorcowa : Uczulająca lub nieuczulająca substancja wykorzystywana jako norma dla celów porównania z substancją badaną. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizyczne/chemiczne; (iv) dane uzupełniające, dotyczące znanych skutków; (oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądaných reakcji.

Falszywy wynik negatywny: Substancja badana, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako negatywna lub nieaktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest pozytywna lub aktywna (33).

Falszywy wynik pozytywny: Substancja badana, która w wyniku zastosowania metody badania została oznaczona niewłaściwie jako pozytywna lub aktywna, podczas gdy w rzeczywistości jest negatywna lub nieaktywna (33).

Zagrożenie: Możliwość wywierania negatywnego wpływu na zdrowie lub środowisko. Niekorzystny wpływ przejawia się tylko wtedy, gdy istnieje wystarczające narażenie.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna: Miernik zakresu, w jakim różne wykwalifikowane laboratoria, przy użyciu tego samego protokołu i testując tę samą badaną substancję mogą przynieść jakościowo i ilościowo podobne wyniki. Odtwarzalność międzylaboratoryjna jest określana w procesach poprzedzających walidację i obejmujących walidację i wskazuje w jakim stopniu badanie można z powodzeniem przekazywać między laboratoriami: nazywana jest również odtwarzalnością międzylaboratoryjną (33).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna: Ustalenie stopnia, w jakim wykwalifikowani pracownicy w tym samym laboratorium mogą z powodzeniem odtworzyć wyniki, stosując szczegółowy protokół w różnych momentach. Nazywana również odtwarzalnością laboratoryjną (33).

Wynik odbiegający: Wynik odbiegający jest obserwacją, która znacznie różni się od innych wartości w losowej próbie z populacji.

Zapewnienie jakości: Proces zarządzania, w którym przestrzeganie norm i wymogów w zakresie badań laboratoryjnych, oraz procedur dotyczących dokumentacji i dokładności przekazywania danych jest oceniane przez osoby niezależne od tych, które przeprowadzają badania.

Wiarygodność : Miernik zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w dłuższym okresie czasu, w

przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej (33).

Działanie uczulające na skórę: Proces immunologiczny, do którego dochodzi w przypadku, gdy osobnik wrażliwy jest narażony miejscowo na wywołujący uczulenie chemiczny alergen, powodujący immunologiczną reakcję skórą, co może prowadzić do uczulania przez kontakt ze skórą.

Wskaźnik stymulacji (SI): Wartość obliczona dla oceny potencjalnego działania uczulającego na skórę przez substancję badaną, który wyraża się stosunkiem proliferacji w grupach poddanych działaniu środka do proliferacji w równoległej grupie kontrolnej nośnika.

Substancja badana (określana także jako badana substancja chemiczna): Każda substancja lub mieszanina, badana za pomocą niniejszej TM.”